



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΔΠΜΣ ΑΓΡΟΧΗΜΕΙΑΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ

Προσδιορισμός υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε οίνους με εκχύλιση
QuEChERS και χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρία μάζας
υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας

ΚΟΛΟΚΑ Λ. ΟΥΡΑΝΙΑ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ» με σκοπό την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων με εκχύλιση QuEChERS και με χρήση υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας σε οίνους. Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής χημείας και Χημείας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον κ. Κωνσταντίνου Ιωάννη, Καθηγητή του εργαστηρίου Βιομηχανικής χημείας Τμήματος Χημείας και επιβλέποντα καθηγητή της ερευνητικής εργασίας, για την ανάθεση αυτής της μελέτης, καθώς και για την καθοδήγηση, την αμέριστη συμπαράσταση και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της συγκεκριμένης εργασίας.

Ευχαριστώ όλα τα μέλη και το προσωπικό του εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας και ιδιαίτερα την Δρ. Χριστίνα Κοσμά για την καθοδήγηση και τις πολύτιμες συμβουλές της κατά τη διάρκεια εκπόνησης της έρευνας. Επίσης τους συμφοιτητές μου και τους φίλους μου, ιδιαίτερα την Μαριωάννα Κουλαμά που μου προσέφερε πολύτιμη βοήθεια και μου συμπαραστάθηκε καθ' όλη τη διάρκεια της προσπάθειάς μου αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης την μονάδα Περιβαλλοντικής, Οργανικής και Βιοχημικής Ανάλυσης υψηλής ευκρίνειας Orbitrap – LC – MS για την πρόσβαση στις υπηρεσίες της.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την εθνική υποδομή Ένδελεχής Έλεγχος Τροφίμων – Foodomics για την υποστήριξη της μεταπτυχιακής διατριβής.

Περίληψη

Στην διατριβή μελετήθηκε η τροποποίηση και εφαρμογή της εκχύλισης QuEChERS, μιας γρήγορης, εύκολης, φθηνής, αποτελεσματικής, ανθεκτικής και ασφαλούς διαδικασίας εκχύλισης σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης - φασματομετρία μάζας- υψηλής ακρίβειας και διακριτικής ικανότητας (UHPLC-Orbitrap-MS), για τον προσδιορισμό παρασιτοκτόνων διαφορετικών χημικών κατηγοριών σε λευκό και κόκκινο οίνο. Η στρατηγική βελτιστοποίησης περιελάμβανε την μελέτη των διαφορετικών τεχνικών QuEChERS που έχουν προταθεί στην βιβλιογραφία και την βελτιστοποίηση παραγόντων που επιδρούν στην απόδοση της εκχύλισης QuEChERS όπως π.χ. το είδος και η ποσότητα των προσροφητικών υλικών για το στάδιο του καθαρισμού του δείγματος, τη τελική συγκέντρωση του δείγματος κ.α. προκειμένου να επιτευχθούν χαμηλές συγκεντρώσεις συν-εκχυλιζόμενων συστατικών στα τελικά εκχυλίσματα και αποδεκτά υψηλές ανακτήσεις, χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και αποδεκτά υψηλή ακρίβεια και αναπαραγωγιμότητα για τον προσδιορισμό των παρασιτοκτόνων. Η ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των παρασιτοκτόνων βασίστηκε στον χρόνο κατακράτησης, στην ακριβή μάζα του ψευδομορικού ιόντος ενώ περαιτέρω επιβεβαίωση επιτεύχθηκε με την καταγραφή των χαρακτηριστικών θυγατρικών ιόντων θραυσματοποίησης των ψευδομοριακών ιοντών. Η μέθοδος αξιολογήθηκε προσδιορίζοντας τα κριτήρια ποιότητας για την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων όπως η γραμμικότητα, η ανάκτηση, η επίδραση μήτρας (ME), η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) και η διευρυμένη αβεβαιότητα. Η γραμμικότητα σε όλες τις περιπτώσεις εμφάνισε συντελεστές προσδιορισμού (R^2) υψηλότερους από 0,99. Οι ανακτήσεις σε όλες τις περιπτώσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 71 και 125%, ενώ οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) βρέθηκαν χαμηλότερες από 11%, σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων εμβολιασμού 10, 100 και 500 $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις από 0.4 έως 21.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και από 2.5 έως 73 $\mu\text{g}/\text{kg}$, αντίστοιχα. Και στους δύο τύπους οίνου για τις περισσότερες από τις ενώσεις (22 και 21 ενώσεις σε λευκό και κόκκινο οίνο, αντίστοιχα) παρατηρήθηκαν χαμηλές επιδράσεις μήτρας (μεταξύ -3 και 20%) και οι υπόλοιπες ενώσεις (16 και 17 ενώσεις σε λευκό και κόκκινο οίνο, αντίστοιχα). παρουσίασαν μέτρια επίδραση μήτρας. Οι διευρυμένες

αβεβαιότητες σε επίπεδο συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ κυμάνθηκαν από 11,1 έως 40,6% και 10,4 έως 43,6%, για τον λευκό και τον κόκκινο οίνο, αντίστοιχα, ενώ οι τιμές του λόγου Horwitz (HorRat, λόγος της παρατηρούμενης αναπαραγωγιμότητας προς την προβλεπόμενη από την εξίσωση Horwitz) ήταν πολύ ικανοποιητικές ($<0,8$) σε όλες τις περιπτώσεις. Η επικυρωμένη μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία σε δείγματα οίνων από παραγωγούς και από την αγορά. Ανιχνεύθηκαν υπολείμματα δύο μυκητοκτόνων, cyprodinil και metalaxyl, σε σχετικά χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης ($<$ όριο ποσοτικοποίησης – 7,2 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ και $<$ όριο ποσοτικοποίησης – 43 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) σε σύγκριση με τα MRL που ορίζει η ΕΕ για τα οиноποιήσιμα σταφύλια.

Abstract

In this study, the quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe (Quechers) extraction procedure and Ultra-High Performance Liquid Chromatography-Orbitrap-Mass Spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS) were combined to obtain a sensitive and rapid method for the determination of multiclass pesticides in white and red wines. The optimization strategy involved the selection of different QuEChERS procedures and sorbents for the cleanup step in order to achieve acceptably high recoveries, low co-extractives in the final extracts and low detection and quantification limits. Identification was based on both accurate mass measurements and retention time, while further confirmation was achieved by MS² fragmentation and the produced daughter-ion fragments. The method was evaluated in terms of linearity, matrix effects (ME), recovery, precision, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ), and expanded uncertainty. Linearity in all cases showed coefficients of determination (r^2) higher than 0.99. The obtained recoveries in all cases varied between 71 and 125%, while %RSD values were lower than 11%, at three spiking concentration levels of 10, 100 and 500 µg/Kg. LODs and LOQs ranged in all cases from 0.4 to 21.5 µg/Kg and from 2.5 to 73 µg/Kg, respectively. In both types of wine most of the compounds (22 and 21 compounds in white and red wine, respectively) presented low matrix effect (between -3 and 20%) and the rest of the compounds presented medium matrix effect) (16 and 17 compounds in white and red wine, respectively). The expanded uncertainties ranged in concentration 10 µg / Kg between 11.1 and 40.6% , 10.4 and 43.6%, for white and red wine, respectively, while the HorRat values were <0.8 in all cases. The validated method was successfully applied to real samples (home-made and commercial wines) revealing the presence of two fungicides, cyprodinil and metalaxyl, in relatively low concentration levels (< LOQ – 7,2 µg/Kg και < LOQ – 43 µg/Kg) compared to the MRLs defined by the EU for vinification grapes.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	1
1.1 Γενικά περί οίνου	11
1.2 Προέλευση του οίνου και της αμπελουργίας	11
1.3 Χημική σύσταση οίνου	12
1.4 Ονοματοδοσία και ταξινόμηση οίνου	14
1.5 Διεθνής και Εγχώρια Αγορά Οίνου.....	15
1.6 Γενικά περί παρασιτοκτόνων	17
1.6.1 Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων	17
1.6.2 Χημική ταξινόμηση παρασιτοκτόνων	17
1.6.3 Τύχη των παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον	18
1.6.4 Τρόποι εφαρμογής των παρασιτοκτόνων σε φυτά.....	18
1.6.5 Χρήση παρασιτοκτόνων στο αμπέλι	19
1.6.6 Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια των παρασιτοκτόνων και οι σχετικές νομοθεσίες τους.....	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΟΙΝΟ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	26
2.1 Προκατεργασία - εκχύλιση δειγμάτων για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα.....	26
2.2 Τεχνικές εκχύλισης δείγματος.....	27
2.3 Τεχνικές εκχύλισης.....	27
2.3.1. ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ (Liquid - Liquid Extraction LLE)	27
2.3.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid Phase Extraction, SPE).....	28
2.3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΦΑΣΗ (Matrix solid-phase dispersion MSPD).....	29
2.3.4. ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid Phase Microextraction, SPME)	31
2.3.5 Μέθοδος εκχύλισης QuEChERS.....	37
2.4 Μέθοδος εκχύλισης QuEChERS σε υπόστρωμα οίνου	42
2.5 Φασματομετρία Μάζας	48
2.5.1 Ο φασματογράφος μαζών.....	48
2.5.2 Πηγή Ιόντων	49
2.5.3 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο (ESI).....	52
2.5.4 Αναλυτές μαζών	53
2.5.5 Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας LC-hybrid LTQ/Orbitrap-MS.....	54
2.6 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου.....	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	57
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΛΕΥΚΟ ΚΑΙ ΚΟΚΚΙΝΟ ΟΙΝΟ	57
3.1 Πρότυπες ουσίες - διαλύτες - αντιδραστήρια - υλικά - όργανα – συσκευές.....	57
3.2 Τα βήματα της εκχύλισης QuEChERS που βελτιστοποιήθηκαν	59
3.2.1 Δοκιμές μέθοδου εκχύλισης QuEChERS σε υπόστρωμα οίνου	59
3.2.2 Επιλογή προσροφητικών υλικών για την απομάκρυνση παρεμποδίζουσων – συνεκχυλιζόμενων ουσιών.	63
3.2.3 Βελτιστοποίηση του όγκου και διαλύτη τελικού δείγματος	65
3.3 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης UHPLC (LTQ) Orbitrap ..	67
3.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε οίνο	73
3.4.1 Επίδραση της μήτρας	74
3.4.2 Επικύρωση γραμμικότητας με πρότυπα διαλύματα.....	76
3.4.3 Ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου σε δείγματα οίνου.....	78
3.5 Εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης Quechers σε πραγματικά δείγματα οίνου.....	90
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	95
ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	97
ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	103
ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ.....	103
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	104

Περιεχόμενα σχημάτων

Σχήμα 1: Τα κυριότερα συστατικά του οίνου (Sohaib Haseeb et al., 2019).....	13
Σχήμα 2: Σχεδιάγραμμα παγκόσμιας παραγωγής οίνου (εκ. εκατόλιτρα) τα έτη 2000 – 2018 (OIV, 2019)	15
Σχήμα 3: Παραγωγή οίνου στην Ελλάδα έτη 1995-2016(OIV, 2017).....	16
Σχήμα 4: Βασικά βήματα αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα (Beyer and Biziuk, 2008).	27
Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) (Sandoval, 2017)	29
Σχήμα 6: Στάδια της εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD) (Freitas et al., 2018)	30
Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) (Schmidt and Podmore, 2015)	31
Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων εκδοχών της μεθόδου QuEChERS (Original QuEChERS Method, AOAC 2007.01 Official Method, EN 15662 The European Official Method) και των σταδίων εκχύλισης, καθαρισμός και ανάλυσης (Rejczak and Tuzimski, 2015).	38
Σχήμα 9: Βήματα μεθόδου εκχύλισης QuEChERS	39
Σχήμα 10: Τμήματα φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου (Δελγιαννάκης, 2010).....	49
Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση του υβριδικού φασματογράφου μάζας LTQ-Orbitrap	55
Σχήμα 12: Τα στάδια που πραγματοποιήθηκαν στις τρεις κύριες εκδοχές μεθόδου εκχύλισης QuEChERS.	60
Σχήμα 13: Ποσοστά ανάκτησης (%) με εφαρμογή των διαφορετικών μεθόδων QuEChERS. (α) Μέθοδος Α ("Original"), (β) Μέθοδος Β ("AOAC 2007.01") και (γ) Μέθοδος C ("Buffered CEN 15662") σε λευκό οίνο.	62
Σχήμα 14: Ποσοστά ανάκτησης (%) με εφαρμογή των διαφορετικών μεθόδων QuEChERS. (α) Μέθοδος Α ("Original"), (β) Μέθοδος Β ("AOAC 2007.01") και (γ) Μέθοδος C ("Buffered CEN 15662") σε κόκκινο οίνο.	62
Σχήμα 15: Ανάκτηση (%) που αποκτήθηκαν για διαφορετικά στάδια καθαρισμού. (α) MgSO ₄ / PSA και (β) PSA και (γ) χωρίς καθαρισμό σε λευκό οίνο.	64
Σχήμα 16: Ανάκτηση (%) που αποκτήθηκαν για διαφορετικά στάδια καθαρισμού. (α) MgSO ₄ / PSA και (β) PSA και (γ) χωρίς καθαρισμό και (δ) GCB σε κόκκινο οίνο.	65
Σχήμα 17: Ανάκτηση (%) που αποκτήθηκαν για διαφορετικά στάδια επεξεργασίας τελικού δείγματος (α) συμπύκνωση 80:20 και (β) αραίωση 50:50 σε λευκό οίνο.	66
Σχήμα 18: Τελικό πρωτόκολλο εκχύλισης δειγμάτων οίνου με την βελτιστοποιημένη μέθοδο QuEChERS	67
Σχήμα 19: Επίδραση της μήτρας – υποστρώματος (%ME) σε λευκό (α) και κόκκινο οίνο (β) αντίστοιχα.	75
Σχήμα 20: Αβεβαιότητα προσδιορισμού U% υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων για λευκό (α) και κόκκινο (β) οίνο σε συγκεντρώσεις 10 και 100 µg/kg	89
Σχήμα 21: (a) Χρωματογράφημα επιλεγμένων ιόντων (Extracted Ion Chromatogram, XIC), (b) Πλήρης σάρωση ακριβούς φάσματος μάζας ιόντων και (c) φάσμα MS / MS θυγατρικών ιόντων, που ελήφθησαν για (A) metalaxyl (B) cyprodinil σε δείγματα κόκκινου οίνου.	94

Περιεχόμενα πινάκων

Πίνακας 1: Παρασιτοκτόνα, χημική ταξινόμησή τους και γενικά χαρακτηριστικά τους. (Pazzirota et al., 2013; Tuzimski et al., 2016; Tianyang Guo et al., 2019; Pubchem.gr)	21
Πίνακας 2: MRLs (mg/kg) για παρασιτοκτόνα που ερευνήθηκαν στην παρούσα εργασία, για επιτραπέζια και οινοποιήσιμα αμπέλια (Ec.europa.eu,/mrls-2019-en , Berset et al, 2017).	24
Πίνακας 3: Ανασκόπηση μεθόδων εκχύλισης υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε δείγματα οίνου.	33
Πίνακας 4: Ανασκόπηση μεθόδων εκχύλισης QuEChERS υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε δείγματα οίνου.	44
Πίνακας 5: Κύριες τεχνικές ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας.	51
Πίνακας 6: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των κυριότερων τεχνικών ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας (Parasuraman et al., 2004; Ardrey, 2003; Finehout and Lee, 2004).	52
Πίνακας 7: Τυπικά χαρακτηριστικά για διάφορους αναλυτές μαζών (De Hoffmann and Stroodant, 2007).	53
Πίνακας 8: Οι συνθήκες των παραμέτρων που επιλέχθηκαν για την χρωματογραφική ανάλυση.	68
Πίνακας 9: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης για τον θετικό ιοντισμό στο σύστημα UHPLC/LTQ-ORBITRAP.	69
Πίνακας 10: Χρόνοι κατακράτησης (t_R), θεωρητικές και πειραματικές μάζες, σχετικό σφάλμα μαζών (Mass Accuracy) και αριθμός ισοδυνάμων διπλών δεσμών και δακτυλίων (Ring Double Bond equivalents, RDBE) των ψευδο-μοριακών ιόντων, θυγατρικών ιόντων (Frangmentation ions) κατά τον θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων στο σύστημα UHPLC/LTQ-ORBITRAP.	71
Πίνακας 11: Επικύρωση της γραμμικότητας με πρότυπα διαλύματα	77
Πίνακας 12: Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου: Γραμμικότητα (Linearity (r^2)), Όρια ανίχνευσης (LODs), όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), μέσες ανακτήσεις (REC) (%) και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) (%) τριών διαφορετικών επιπέδων ($n = 6$) που μελετήθηκαν για την ίδια ημέρα και σε διαφορετικές ημέρες, καθώς και μέγιστα επίπεδα υπολειμμάτων (MRL), για υπολείμματα παρασιτοκτόνων σε λευκό οίνο.	80
Πίνακας 13: Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου: Γραμμικότητα (Linearity (r^2)), Όρια ανίχνευσης (LODs), όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), μέσες ανακτήσεις (REC) (%) και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) (%) τριών διαφορετικών επιπέδων ($n = 6$) που μελετήθηκαν για την ίδια ημέρα και σε διαφορετικές ημέρες, καθώς και μέγιστα επίπεδα υπολειμμάτων (MRL), για υπολείμματα παρασιτοκτόνων σε κόκκινο οίνο.	82
Πίνακας 14: Αβεβαιότητα προσδιορισμού U (%) υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων για τον λευκό και τον κόκκινο οίνο στις συγκεντρώσεις 10 και 100 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ ($k = 2$, επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) καθώς και τιμές HorRat σε 10 $\mu\text{g} / \text{Kg}$.	88
Πίνακας 15: Ανίχνευση και επίπεδα συγκεντρώσεων υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων στα δείγματα λευκού και κόκκινου οίνου και τα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων τους (MRL) για οινοποιήσιμα σταφύλια.	91
Πίνακας 16: Κύρια χαρακτηριστικά πρόσφατων μελετών σχετικά με την εκχύλιση Quechers και τις τεχνικές υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας για την ανάλυση των παρασιτοκτόνων στον οίνο.	93

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΟΙΝΟΣ ΚΑΙ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ

1.1 Γενικά περί οίνου

Ο οίνος είναι οινοπνευματώδες ποτό, προϊόν της ζύμωσης των σταφυλιών ή του χυμού τους. Αποτελεί ιδιαίτερα σημαντικό καταναλωτικό προϊόν διατροφής, δημοφιλές ποτό που συνοδεύει ένα ευρύ φάσμα ευρωπαϊκών και μεσογειακών γεύσεων και ένα γεωργικό προϊόν που αντικατοπτρίζει τα ιδιαίτερα περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά ενός τόπου όπως τα χαρακτηριστικά του εδάφους, τις κλιματολογικές συνθήκες κ.α. Ο τύπος και η δομή του σταφυλιού, οι καλλιεργητικές πρακτικές που εφαρμόζουν οι παραγωγοί στον αμπελώνα και οι τεχνικές ζύμωσής του, οι κλιματολογικοί παράγοντες του τόπου καλλιέργειας της αμπέλου, είναι κάποιοι από τους παράγοντες που συμβάλλουν στην ποιότητα του οίνου. Ο οίνος εμφανίζεται σε θρησκευτικές τελετές σε πολλούς πολιτισμούς, ενώ το εμπόριο του είναι ιστορικής σπουδαιότητας για πολλές περιοχές (Margalit, 2012 ; Soleas et al., 1997; McGovern, 2003).

Το αμπέλι κατέχει, σύμφωνα με τους παλαιοντολόγους, προϊστορία πολλών εκατομμυρίων ετών. Πριν ακόμα από την εποχή των παγετώνων ευδοκίμοιζε στην πολική ζώνη, κυρίως στην Ισλανδία, στη Βόρεια Ευρώπη αλλά και τη βορειοδυτική Ασία. Οι παγετώνες περιόρισαν σημαντικά την εξάπλωσή του και επέβαλαν κατά κάποιο τρόπο την γεωγραφική απομόνωση πολλών ποικιλιών, μέρος των οποίων εξελίχθηκαν και σε διαφορετικά είδη. Στην πορεία των χρόνων, διάφορα είδη άγριων αμπέλων μετακινήθηκαν προς θερμότερες ζώνες, κυρίως προς την ευρύτερη περιοχή του νοτίου Καυκάσου. Στην περιοχή αυτή, μεταξύ Ευξείνου Πόντου, Κασπίας θάλασσας και Μεσοποταμίας, γεννήθηκε το είδος Άμπελος η οينوφόρος (λατ. *Vitis vinifera*), οι διαφορετικές ποικιλίες του οποίου καλλιεργούνται μέχρι και σήμερα (Haseeb et al., 2019). Στη συνέχεια θα παρουσιαστεί μία μικρή ιστορική αναδρομή (Kiple and Ornelas, 2001; Haseeb et al., 2019) η οποία θα αποδείξει τη διαχρονικότητα της αμπελοοινικής παράδοσης όπως εξελίχτηκε στις διάφορες περιόδους της ιστορίας για να καταλήξει στη σημερινή της μορφή.

1.2 Προέλευση του οίνου και της αμπελουργίας

Ο οίνος καταναλώνεται εδώ και πολλά χρόνια. Οι αρχαίοι Ρωμαίοι και Έλληνες εντοπίζουν τον οίνο στις προϊστορικές τους ημέρες, με ενδιαφέροντες μύθους για την

προέλευσή του (Sandler and Pinder, 2003). Τα πρώτα αποδεικτικά στοιχεία οινοποίησης από καλλιεργημένα αμπέλια χρονολογούνται μεταξύ 5.400 και 5.000 π.Χ. στο Ιράν (Johnson, 1989). Ωστόσο, ορισμένοι ερευνητές πιστώνουν άλλες περιοχές του Καυκάσου, που βρίσκονται στα σύνορα της Ευρώπης και της Ασίας, ως τόπο ανακάλυψης και εξημέρωσης της αμπέλου. Η οινοποίηση εξαπλώθηκε σε όλη τη Μεσοποταμία, τη Συρία, την Αίγυπτο και γύρω από την περιοχή της Μεσογείου. Όταν οι Ρωμαίοι κατέλαβαν την Ελλάδα το κρασί έγινε ένα σημαντικό προϊόν που καταναλώνονταν σχεδόν με κάθε γεύμα και συνδέθηκε με θεότητες όπως ο Θεός Διόνυσος. Η ευρεία επιρροή της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας συντελεί στην εξάπλωση της οινοποίησης σε διάφορα μέρη της Ευρώπης. Με την πτώση της Ρωμαϊκής Αυτοκρατορίας και την επακόλουθη εξάπλωση του Χριστιανισμού, μοναστήρια σε όλη την Ευρώπη άρχισαν να προστατεύουν και να διατηρούν αμπελώνες. Καθώς η οινοποίηση και η κατανάλωσή της εξαφανίστηκαν από τη Μέση Ανατολή και τη Βόρεια Αφρική λόγω της εξάπλωσης του Ισλάμ, οι Ευρωπαίοι επέκτειναν την πρακτική στην Αμερική μέσω των Ισπανών ιεραποστόλων, ξεκινώντας με το Μεξικό και στη συνέχεια νότια στο Περού, τη Χιλή και την Αργεντινή. (Kiple and Ornelas, 2001 ; Haseeb et al., 2019)

Η ιστορία της σύγχρονης ελληνικής οινοπαραγωγής και η ανάπτυξη του εμφιαλωμένου οίνου ξεκινά τα τελευταία χρόνια, τη δεκαετία του '60. Την περίοδο αυτή αρχίζουν να γίνονται και οι πρώτες σοβαρές επενδύσεις σε εγκαταστάσεις και μηχανολογικό εξοπλισμό. Παράλληλα, γίνεται και μερική ανασύσταση αμπελώνων με φύτευση εκλεκτών ποιοτικά ποικιλιών αμπέλου βάσει αξιολογήσεων που πραγματοποιήθηκαν από το Ινστιτούτο Οίνου, ενώ ήδη από την πρώτη δεκαετία θεσμοθετούνται οι περιοχές για την παραγωγή οίνων Ονομασίας Προελεύσεως από το Υπουργείο Γεωργικής ανάπτυξης (Κοπιδάκης , 1995; Hugh, 1998).

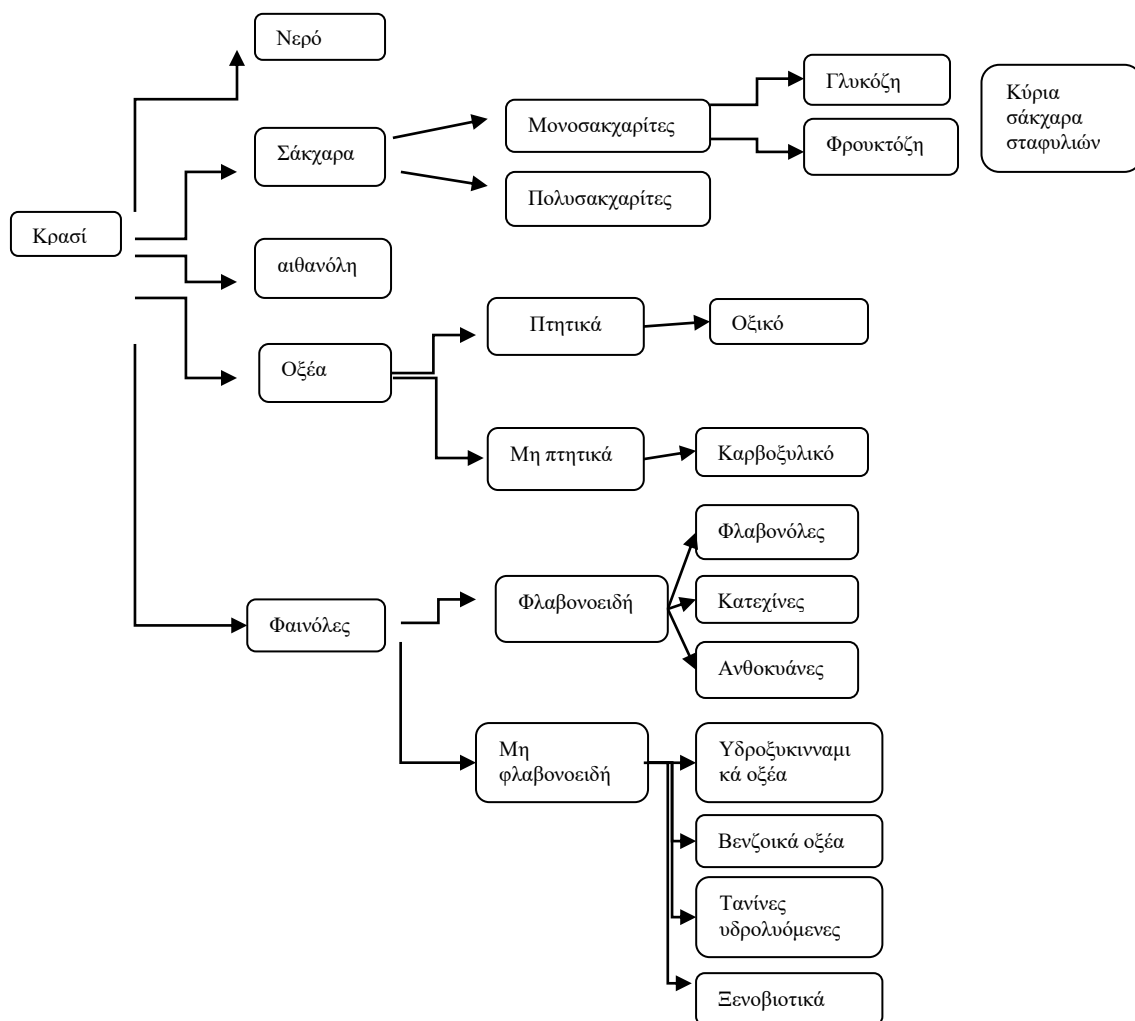
1.3 Χημική σύσταση οίνου

Η σύνθεση του οίνου βασίζεται στα συστατικά του σταφυλιού, σε προϊόντα που παράγονται κατά την ζύμωση και σε ενώσεις που σχηματίζονται κατά την αποθήκευση και την ωρίμανση του οίνου (Σχήμα 1). Περισσότερες από 500 ενώσεις έχουν προσδιοριστεί αναλυτικά στον οίνο.

Οι ρώγες του σταφυλιού, που αποτελεί και την πρώτη ύλη του οίνου, περιέχουν:

- σάκχαρα

- οργανικά οξέα
- νερό (πάνω από 70%)
- φαινολικές ενώσεις, με κυριότερες τις τανίνες, τις ανθοκυανίνες και τις πολυφαινόλες
- αρωματικές ενώσεις, π.χ. αλκοόλες, εστέρες, τερπένια, θειόλες, μεθόξυπυραζίνες κτλ.



Σχήμα 1: Τα κυριότερα συστατικά του οίνου (Sohaib Haseeb et al., 2019)

Η περιεκτικότητα σε αυτές τις ουσίες εξαρτάται κάθε φορά από την ποικιλία, το υπέδαφος, τις κλιματικές συνθήκες, την χρονική στιγμή ωρίμανσης του σταφυλιού αλλά και από την οινοποιητική διαδικασία. Μετά την διαδικασία της συγκομιδής, ακολουθεί η γλυκοποίηση, διαδικασία κατά την οποία εξάγεται το γλεύκος από το σταφύλι. Κατά τη γλυκοποίηση, επιβάλλεται η αφαίρεση των κοτσανιών

(αποβοστρύχωση) του σταφυλιού, καθώς είναι επιζήμια τόσο για την γεύση του οίνου, όσο και για την υγεία του καταναλωτή. Το οινόπνευμα που περιέχει ο οίνος παράγεται από τα σάκχαρα του μούστου με την αντίδραση της αλκοολικής ζύμωσης, που επιτελείται από ειδικά ένζυμα, τις ζυμάσες των ζυμομυκήτων. Εκτός από αιθυλική αλκοόλη παράγεται και διοξείδιο του άνθρακα αλλά και μια σειρά δευτερευόντων προϊόντων και ενώσεων με καθοριστική σημασία πολλές φορές για την ποιότητα του οίνου, όπως οι φαινολικές ενώσεις, οι τανίνες που είναι υπεύθυνες για τη στυφή γεύση των ερυθρών οίνων, οι ανθοκυανίνες, που είναι υπεύθυνες για το χρώμα, καθώς και αρωματικές ενώσεις, οι οποίες ευθύνονται για ορισμένα αρώματα του. (Tsakires, 1998)

1.4 Ονοματοδοσία και ταξινόμηση οίνου

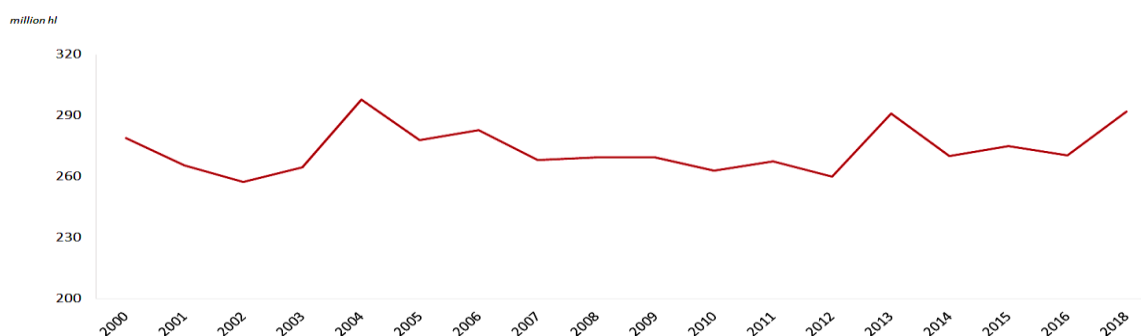
Ο οίνος οφείλει την ονομασία του είτε στην ποικιλία των σταφυλιών, είτε στον τόπο παραγωγής του. Ιστορικά, οίνοι που παράχθηκαν στην Αυστραλία, τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής και τη Γερμανία πήραν το όνομά τους αποκλειστικά από την ποικιλία σταφυλιών τους, ενώ οίνοι που παράχθηκαν στην Γαλλία, την Ισπανία, την Ιταλία ή την Ελλάδα προσδιορίστηκαν κυρίως από το γεωγραφικό τόπο παραγωγής τους (OIV 2019).

Σημαντικό διακριτικό κάθε οίνου είναι το χρώμα του, που τα διακρίνει σε λευκά, κόκκινα και ροζέ. Είναι λανθασμένη η γενικευμένη άποψη πως το χρώμα του σταφυλιού καθορίζει το χρώμα του οίνου. Στην πραγματικότητα οι χρωστικές ουσίες του σταφυλιού περιέχονται στα στερεά μέρη του, τα στέμφυλα. Όταν τα στέμφυλα συμμετέχουν στην διαδικασία της ζύμωσης παρέχουν το χρώμα στον οίνου. Ο μούστος τόσο των κόκκινων όσο και των ανοιχτόχρωμων ποικιλιών διαθέτει το ίδιο ανοιχτό χρώμα. Ο κόκκινος οίνος παράγεται από ποικιλίες κόκκινων (ή μαύρων) σταφυλιών με την προϋπόθεση ότι τα στερεά τους μέρη συμμετέχουν στη ζύμωση, ενώ λευκός οίνος μπορεί να παραχθεί από οποιαδήποτε ποικιλία εφόσον τα στερεά μέρη των σταφυλιών διαχωριστούν στη διαδικασία της ζύμωσης. Οι ροζέ οίνοι, παράγονται όπως και τα κόκκινα, με τη διαφορά ότι τα στερεά μέρη των σταφυλιών παραμένουν στη ζύμωση για ένα πολύ σύντομο χρονικό διάστημα, συνήθως μικρότερο από μία ημέρα. Ταξινομούνται επίσης σύμφωνα με το έτος της συγκομιδής των σταφυλιών και συνηθίζεται οι οίνοι να παράγονται από σταφύλια συγκομιδής ενός έτους και χρονολογούνται με βάση το έτος αυτό.

1.5 Διεθνής και Εγχώρια Αγορά Οίνου

Η ανάπτυξη της παγκόσμιας έκτασης του αμπελώνα είναι 7,4 εκ. εκτάρια το έτος 2018. Οι χώρες που αντιπροσωπεύουν το 50% του παγκόσμιου αμπελώνα είναι κυρίως η Ισπανία, η Γαλλία, η Ιταλία, η Κίνα και η Τουρκία. Η Ισπανία που παραμένει στην πρώτη θέση, όσον αφορά την καλλιεργούμενη έκταση, αφού συγκεντρώνει το 13% της παγκόσμιας έκτασης. Ακολουθεί η Κίνα με έκταση 12% της παγκόσμιας έκτασης, η Γαλλία με ποσοστό 11%, η Ιταλία με 9% και η Τουρκία με 6 %.

Η παγκόσμια παραγωγή σταφυλιών το 2018 είναι 77,8 εκ. τόνους και η παγκόσμια παραγωγή κρασιού ήταν για το 2018 (Σχήμα 2), 292 εκ. εκατόλιτρα, με πρώτες χώρες παραγωγής κρασιού την Ιταλία, την Γαλλία και την Ισπανία, από τις μεγαλύτερες της τελευταίας εικοσαετίας. Με αύξηση της παραγωγής οίνου κατά 12% σε σύγκριση με το προηγούμενο έτος, η Ιταλία είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός στον κόσμο, ακολουθούμενη από τη Γαλλία και την Ισπανία.

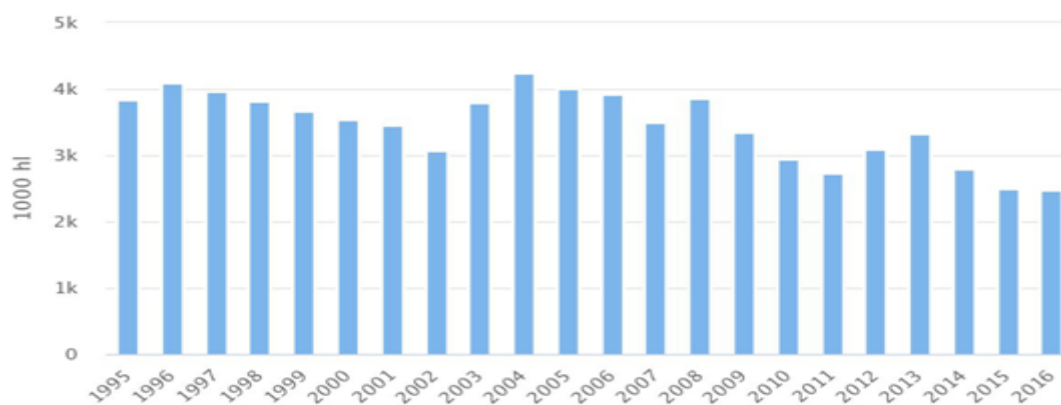


Σχήμα 2: Σχεδιάγραμμα παγκόσμιας παραγωγής οίνου (εκ. εκατόλιτρα) τα έτη 2000 – 2018 (ΟΙΥ, 2019)

Η παγκόσμια κατανάλωση παρουσιάζει μικρή αυξητική τάση της τάξεως 2%, με παγκόσμια κατανάλωση οίνου στα 246 εκ. εκατόλιτρα το 2018. Οι Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής επιβεβαίωσαν τη θέση τους ως η μεγαλύτερη χώρα κατανάλωσης οίνου (+7,6%). Η κατανάλωση ήταν υψηλότερη στην Ιταλία (14,9%) και στην Ισπανία (6,7%), αλλά συνέχισε να μειώνεται στη Γαλλία (-2,6%). Το επίπεδο της κατανάλωσης οίνου στην Κίνα εκτιμάται ότι παρουσίασε μικρή αύξηση (+1,3%) (ΟΙΥ, 2019).

Η Ευρωπαϊκή παραγωγή οίνου καλύπτει το 60% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής, ενώ η Ελληνική παραγωγή αντιπροσωπεύει το 1,7% περίπου της Ευρωπαϊκής παραγωγής οίνου και το 1% περίπου της παγκόσμιας παραγωγής οίνου (ΟΙΥ, 2019).

Όσον αφορά την Ελλάδα, οι μεγαλύτερες εκτάσεις των οινάμπελων, βρίσκονται στην περιφέρεια της Πελοποννήσου, η οποία καλύπτει περίπου το 18% των συνολικών εκτάσεων, η περιφέρεια της Δυτικής Ελλάδας με ποσοστό 15,9%, η Στερεά Ελλάδα και η Κρήτη, με ποσοστά 11,7% και 11,6% αντίστοιχα, ενώ ακολουθούν η Κεντρική Μακεδονία (με ποσοστό 10,4%) και η Θεσσαλία (με ποσοστό 10%) (statistics.gr). Η παραγωγή οίνου στην Ελλάδα (Σχήμα 3) παρουσιάζει διακυμάνσεις ανά χρονιά, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε καιρικές συνθήκες, σε ασθένειες των αμπελώνων κ.α. Η Ελλάδα βρίσκεται στην λίστα οινοπαραγωγών χωρών, καθώς και στη λίστα με τους μεγαλύτερους καταναλωτές οίνου παγκοσμίως, π.χ. το 2018 παράχθηκαν 2,2 εκατ. εκατόλιτρα και καταναλώθηκαν 2,1 εκατ. εκατόλιτρα οίνου (OIV, 2019).



Σχήμα 3: Παραγωγή οίνου στην Ελλάδα έτη 1995-2016(OIV, 2017)

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η εξέλιξη των εξαγωγών του οίνου διαχρονικά αλλά και σε σύγκριση με το προηγούμενο έτος. Οι πρώτες χώρες εξαγωγής των ελληνικών οίνων στην Ε.Ε., οι οποίες απορροφούν το 89,67% των συνολικών εξαγωγών για το 2019 είναι κατά φθίνουσα σειρά: Γερμανία, Κύπρος, Γαλλία, Ηνωμένο Βασίλειο, Βέλγιο, Κάτω Χώρες (keosoe.gr). Στην γερμανική αγορά καταγράφεται μείωση το 2019 έναντι του 2018 κατά 5,07%. Η σύγκριση με το μέσο όρο 5ετίας καταδεικνύει διαχρονική αύξηση των εξαγόμενων ελληνικών οίνων σε αξία κατά 4,54%, και μείωση σε ποσότητα κατά 2,94% (keosoe.gr). Η αγορά της Κύπρου συνεχίζει να αποτελεί σημαντικότατο εξαγωγικό προορισμό για τον ελληνικό οίνο, αφού φέτος κατατάσσεται στη δεύτερη θέση σε επίπεδο ΕΕ. Οι μεταβολές σε ποσότητα εξαγόμενου οίνου ακολούθησαν σημαντική ανοδική πορεία το 2019 έναντι του 2018 κατά 11,59% (keosoe.gr). Εντυπωσιακή είναι η μείωση των εξαγωγών στην αγορά της Γαλλίας, γεγονός που αιτιολογεί εν μέρει και την μείωση των εξαγωγών οίνου προς χώρες της

Ε.Ε., αφού το 2019 σε σύγκριση με την 5ετία 2014–2018 έχουμε μείωση κατά 33,92% σε ποσότητα εξαγωγής οίνου (keosoe.gr). Μικρή αύξηση παρουσιάζεται στις εξαγόμενες ποσότητες οίνων το 2019 έναντι του 2018 σε ΗΠΑ και Καναδά κατά 4,6% (keosoe.gr).

1.6 Γενικά περί παρασιτοκτόνων

1.6.1 Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) έχει ορίσει ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα (παρασιτοκτόνα) κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή ή τον έλεγχο τυχόν επιβλαβών οργανισμών, όπως φορείς ανθρώπινων ή ζωικών ασθενειών, ανεπιθύμητα είδη φυτών ή ζώων, που είτε είναι βλαπτικά κατά τη διάρκεια ανάπτυξης του φυτού ή παρεμβαίνουν στην παραγωγή, την επεξεργασία, την αποθήκευση, τη μεταφορά, ή την πώληση τροφίμων, γεωργικών προϊόντων, ξυλείας και προϊόντων της, ή ζωοτροφές, ή ουσίες που χορηγούνται σε ζώα για την καταπολέμηση εντόμων, αραχνοειδών, ή άλλων παρασίτων εντός ή επί του σώματός τους. Ο όρος περιλαμβάνει τις ουσίες που προορίζονται για ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών, αποφυλλωτικά, ξηραντικά, ή παράγοντες για το αραίωμα καρπών και προστασία από πρόωρη πτώση του φρούτου. Επίσης οι ουσίες που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες, είτε πριν είτε μετά τη συγκομιδή για να προστατεύσουν τα προϊόντα από αλλοίωση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της μεταφοράς.

Ανάλογα με το σκοπό για τον οποίο προορίζονται και τη δράση τους, τα παρασιτοκτόνα διακρίνονται στις ακόλουθες κύριες κατηγορίες: (Αλμπάνης, 1987):

- Εντομοκτόνα (insecticides), για την καταπολέμηση των εντόμων
- Μυκητοκτόνα (fungicides), για χρήση κατά των μυκήτων
- Ζιζανιοκτόνα (herbicides), για την παρεμπόδιση της παράλληλης με τα καλλιεργούμενα είδη ανάπτυξης ανεπιθύμητων φυτών (ζιζάνια)
- Ακαρεοκτόνα (acaricides), για την καταπολέμηση των ακάρεων
- Βακτηριοκτόνα (bactericides), για χρήση κατά των βακτηρίων
- Μαλακιοκτόνα (molluscicides) για τον έλεγχο της ανάπτυξης σαλιγκαριών και γαστερόποδων του γένους limacidac.

1.6.2 Χημική ταξινόμηση παρασιτοκτόνων

Τα παρασιτοκτόνα, ανάλογα με τη δραστική ουσία που περιέχουν, κατατάσσονται στις ακόλουθες κύριες κατηγορίες (Αλμπάνης, 1997):

1. Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες
2. Οργανοφωσφορικοί εστέρες
3. Καρβαμιδικά και αλειφατικά οξέα και οι εστέρες τους
4. Ενώσεις των χλωρό- και αμινο- τριαζινών
5. Παράγωγα διπυριδιλίου
6. Χλωροφαινοξυ - οξέα
7. Υποκατεστημένα αμίδια
8. Παράγωγα νιτροανιλίνης
9. Ενώσεις της ουρίας
10. Συνθετικά πυρεθρινοειδή και φυσικές πυρεθρίνες
11. Φερομόνες
12. Ανόργανα άλατα των μετάλλων As, Zn, Cu

1.6.3 Τύχη των παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον

Οι περιβαλλοντικές διεργασίες από τις οποίες εξαρτάται η συμπεριφορά και η τύχη των παρασιτοκτόνων στο περιβάλλον ταξινομούνται σε δύο κατηγορίες (Aktar et al., 2009):

➤ Διεργασίες μεταφοράς

Τα παρασιτοκτόνα απομακρύνονται από το σημείο εφαρμογής και κατανέμονται στα επιφανειακά και υπόγεια νερά, στο έδαφος, στα ιζήματα και στην ατμόσφαιρα. Οι διεργασίες μεταφοράς των παρασιτοκτόνων περιλαμβάνουν μεταφορά με τον αέρα, εξάτμιση, έκπλυση, επιφανειακή απορροή, προσρόφηση και πρόσληψη από τα φυτά.

➤ Διεργασίες αποδόμησης

Τα παρασιτοκτόνα μετατρέπονται σε απλούστερες ενώσεις, οι οποίες ονομάζονται μεταβολίτες ή προϊόντα διάσπασης, ή αποικοδομούνται πλήρως προς ανόργανες ενώσεις. Οι κύριες διεργασίες αποδόμησης των παρασιτοκτόνων περιλαμβάνουν τη φωτοδιάσπαση, την υδρόλυση, την οξειδοαναγωγή και τη μικροβιακή διάσπαση

1.6.4 Τρόποι εφαρμογής των παρασιτοκτόνων σε φυτά

Η εφαρμογή παρασιτοκτόνων σε φυτά πραγματοποιείται: (α) σε μορφή σκόνης πάνω στα φυτά (επίπαση), (β) με διασπορά, εφαρμόζοντας τα παρασιτοκτόνα σε κοκκώδη μορφή απευθείας επάνω στα φυτά ή στο έδαφος, (γ) με απευθείας χρήση στις ρίζες των

φυτών και (δ) με ψεκασμό του φυτού. Ποσότητα του παρασιτοκτόνου δύναται να προσροφηθεί μέσω του φυλλώματος ή και του ριζικού συστήματος του φυτού (Wang and Liu, 2007). Οι παράγοντες που επηρεάζουν την διεργασία πρόσληψης του παρασιτοκτόνου από το φυτό είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, η περιεχόμενη οργανική ύλη και οι μικροοργανισμοί του εδάφους. Η πρόσληψη των παρασιτοκτόνων από τα φύλλα του φυτού εξαρτάται από την επιφάνεια και τα χαρακτηριστικά του φύλλου, την ποσότητα και τις φυσικοχημικές ιδιότητες των εφαρμοζόμενων παρασιτοκτόνων και τις περιβαλλοντικές συνθήκες, ενώ η πρόσληψη από τις ρίζες του φυτού εξαρτάται από τη διαλυτότητα των παρασιτοκτόνων στο νερό και τη διαπερατότητα της μεμβράνης των επιφανειακών κυττάρων από τα μόρια του παρασιτοκτόνου (Sicbaldi et al., 1997).

1.6.5 Χρήση παρασιτοκτόνων στο αμπέλι

Η προστασία των καλλιεργειών αμπέλου από διάφορες ασθένειες που προκαλούνται από έντομα, μύκητες και άλλους παράγοντες, έχει καταστεί ουσιαστικό ζήτημα. Οι παράγοντες που προσβάλλουν άμεσα την σάρκα του σταφυλιού έχουν τον μέγιστο αντίκτυπο στην ποιότητα του. Οι κυριότεροι παθογενείς μύκητες του σταφυλιού είναι οι *Botrytis cinerea* (γκρίζα σήψη), *Plasmopara viticola* (μούχλα) και *Uncinula necator* (μύκητας γένους *oidium*). Το αμπέλι είναι επίσης ευάλωτο σε πολυάριθμα ζωικά και φυτικά παράσιτα. Οι σκόροι (*Lobesia botrana*, *Clypea ambiguella*) και τα ζώφια (*Eotetranychus carpini*, *Panonychus ulmi*, *Tetranychus urticae*) είναι τα πιο κοινά φυτοφάγα έντομα. Για την καταπολέμηση τους εφαρμόζονται ευρέως διάφορες χημικές ενώσεις όπως είναι τα παρασιτοκτόνα, κυρίως μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα (Zhang et al., 2019).

Η αυξανόμενη χρήση παρασιτοκτόνων στις καλλιέργειες των αμπελώνων έχει δημιουργήσει μεγάλη ανησυχία κατά πόσο διασφαλίζεται η ανθρώπινη υγεία και ασφάλεια του καταναλωτή, καθώς τα υπολείμματα τους στα αμπέλια μπορούν να μεταφερθούν στον οίνο και κατά συνέπεια στον ανθρώπινο οργανισμό (Zhang et al., 2019).

Η σωστή χρήση των παρασιτοκτόνων και η οινοπαραγωγική διαδικασία (σύνθλιψη, πίεση, σταθεροποίηση, κ.τ.λ.) συντελούν την μείωση, ακόμη και την εξάλειψη των υπολειμμάτων τους στον οίνο. Ενδέχεται πάραυτα να βρεθούν υπολείμματά τους, κυρίως μυκητοκτόνων και εντομοκτόνων, στον οίνο με κίνδυνο την υγεία του

καταναλωτή (Pizzuti et al., 2014; Millan et al., 2003; Teixeira et al., 2004; Oliva et al., 2000). Τα επίπεδα υπολειμμάτων των παρασιτοκτόνων στον οίνο αναμένονται να είναι πολύ χαμηλότερα σε σχέση με το αμπέλι (Correia et al., 2000).

Τα παρασιτοκτόνα που ερευνώνται στην παρούσα εργασία δίνονται στον Πίνακα 1, η χημική ταξινόμησή τους και τα χαρακτηριστικά τους, όπως η πολικότητα-λιποφιλία τους ($\log K_{ow}$), η σταθερά διάστασης (pK_a) και διαλυτότητά τους σε μεθανόλη.

Πίνακας 1: Παρασιτοκτόνα, χημική ταξινόμησή τους και γενικά χαρακτηριστικά τους. (Pazzirota et al., 2013; Tuzimski et al., 2016; Tianyang Guo et al., 2019; Pubchem.gr)

Παρασιτοκτόνα	Μοριακός τύπος	Μοριακό βάρος (g/mol)	logK _{ow}	pka	Διαλυτότητα σε MeOH
Εντομοκτόνα					
• Οργανοφωσφορικά					
Fenthion sulfoxide	C ₁₀ H ₁₅ O ₄ PS ₂	294.33	1.92	-	≥1000
Fenthion	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂	278.3	4.09	-	≥1000
Phosalone	C ₁₂ H ₁₅ ClNO ₄ PS ₂	367.81	4.38	-3.3	≥1000
Chlorpyrifos	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	350.6	4.96	-4.2	≥1000
Chlorpyrifos-methyl	C ₇ H ₇ Cl ₃ NO ₃ PS	322.5	4.31	-	≥1000
Dimethoate	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂	229.3	0.78	2	≥1000
Coumaphos	C ₁₄ H ₁₆ ClO ₅ PS	362.77	4.13	7.3	≥1000
Diazinon	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	304.35	3.81	2.6	≥1000
Dichlorvos	C ₄ H ₇ ClO ₄ P	220.97	1.43	-	≥1000
Azinphos-methyl	C ₁₀ H ₁₂ N ₃ O ₃ PS ₂	317.3	2.75	-	≥1000
Ethion	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	384.5	5.073	-	≥1000
Terbufos	C ₉ H ₂₁ O ₂ PS ₃	288.4	4.48	-	≥1000
• Καρβαμικά					
Carbaryl	C ₁₂ H ₁₁ NO ₂	201.22	2.36	10.4	≥1000
Νεοκοτινοειδή					
Acetamiprid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	222.67	0.80	0.7	≥1000
Thiacloprid	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	252.72	1.26	1.62	≥1000
Imidacloprid	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	255.661	0.57	1.56-11.12	≥1000
Thiamethoxam	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	291.72	-0.13	-	≥1000
• Τετραζινικά					
Clofentezine	C ₁₄ H ₈ Cl ₂ N ₄	303.1	3.1	-1.68	≥1000
• Φαινυλαιθερικά					
Pyriproxyfen	C ₂₀ H ₁₉ NO ₃	321.4	5.37	6.87	≥1000
Μυκητοκτόνα					
• Στρουμπιλουρίνες					
Pyraclostrobin	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄	387.8	3.99	-	≥1000
Azoxystrobin	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403.4	2.50	0.94	≥1000
Trifloxystrobin	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₄ O ₄	408.4	4.5	-	≥1000
• Βενζιμιδαζολικά					
Carbendazim	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂	191.187	1.48	4.29	≥1000
• Αμινοπυριδινικά					
Bupirimate	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S	316.42	2.7	4.4	≥1000
Cyprodinil	C ₁₄ H ₁₅ N ₃	225.29	3.59	4.44	≥1000
• Τριαζολικά					
Tebuconazole	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	307.82	3.7	2.3	≥1000
Myclobutanil	C ₁₅ H ₁₇ ClN ₄	288.77	2.94	2.3	≥1000
Fenbuconazole	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄	336.8	3.23	2.34	≥1000
Triadimenol mix	C ₁₄ H ₁₈ ClN ₃ O ₂	295.76	2.9	-	≥1000
Difenoconazole	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	406.3	4	1.07	≥1000
• Φαινυλαμίδια					
Metalaxyl	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	279.33	1.65	10.3	≥1000
Benalaxyl	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	325.4	3.4	-	≥1000
• Ακεταμίδια					

Cymoxanil	C ₇ H ₁₀ N ₄ O ₃	198.18	0.67	9.7	≥1000
• Καρβοξαμิดικά					
Iprovalicarb	C ₁₈ H ₂₈ N ₂ O ₃	320.4	1.6 – 3.18	5.88	≥1000
Boscalid	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343.2	2.96	10.7	≥1000
Ζιζανιοκτόνα					
• Παράγωγα της σουλφονυλουρίας					
Rimsulfuron	C ₁₄ H ₁₇ N ₅ O ₇ S ₂	431.4	0.034	4	≥1000
• Αρυλοφαινοξυπροπ ανοικά					
Quizalofop-p-ethyl	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	372.8	4.28	-	≥1000
Fluazifop-p-butyl	C ₁₉ H ₂₀ F ₃ NO ₄	383.4	4.5	-	≥1000

*Logkow= συντελεστής οκτανόλης-νερού

*pka= σταθερά διάστασης οξέος

1.6.6 Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια των παρασιτοκτόνων και οι σχετικές νομοθεσίες τους

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών (FAO) σε συνεργασία με την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO), συνέστησαν ειδική επιτροπή που μελετά τα θέματα που σχετίζονται με την ποιότητα των τροφίμων. Τα υπολείμματα παρασιτοκτόνων, ειδικότερα, αποτελούν αντικείμενο ειδικής υποεπιτροπής της Codex Committee on Pesticide Residues (CCPR), αποτελούμενης από επιστήμονες όλων των χωρών οι οποίοι ύστερα από συντονισμένες έρευνες και μελέτες των τοξικολογικών ιδιοτήτων των δραστικών ουσιών, καθορίζει την αποδεκτή ημερήσια δόση (ADI) ή τα ανώτατα αποδεκτά όρια υπολειμμάτων (MRL) για κάθε μία από αυτές. Η Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων με ειδικές οδηγίες καθορίζει τα MRLs και επιβάλλει στα κράτη-μέλη με παρακολούθηση των προϊόντων, να εξακριβώνουν αν τα προϊόντα ανταποκρίνονται στα όρια που θεσπίστηκαν. Τα θέματα που αφορούν τα γεωργικά φάρμακα εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ρυθμίζονται βάσει της οδηγίας 91/414/EEC περί φυτοπροστατευτικών προϊόντων και του κανονισμού ΕΚ αριθ. 396/2005 για τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων, με στόχο την προστασία του ανθρώπου και των ζώων.

Στη χώρα μας για κάθε ουσία που χρησιμοποιείται ως φυτοπροστατευτικό προϊόν ακολουθείται διαδικασία αξιολόγησης σύμφωνα με το νόμο 721/77 και το προεδρικό διάταγμα 115/97 (συμμόρφωση με την οδηγία 91/414/ΕΟΚ όπως έχει συμπληρωθεί) και ακολουθεί απόφαση έγκρισης από το Α.ΣΥ.ΓΕ.Φ (Ανώτατο Συμβούλιο Γεωργικών Φαρμάκων).

Παρά την εφαρμογή των κανόνων της ορθής γεωργικής πρακτικής και την πιστή εφαρμογή των οδηγιών που αναγράφονται στην ετικέτα του παρασιτοκτόνου από τους γεωργούς - χρήστες, υπάρχει πιθανότητα να εντοπιστεί υπόλειμμα παρασιτοκτόνου στο γεωργικό προϊόν. Η χώρα μας σε μεγάλο βαθμό έχει εναρμονίσει τη νομοθεσία της και εφαρμόζει τα Ανώτατα Αποδεκτά όρια υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων, ώστε τα τρόφιμα να είναι ασφαλή για τον καταναλωτή.

Στον οίνο δεν έχουν οριστεί ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων (MRL) από την Ε.Ε, ως εκ τούτου δεχόμαστε τα όρια που έχουν οριστεί για τα παρασιτοκτόνα σε οινοποιήσιμα αμπέλια. Ακολουθεί πίνακας με τα MRLs για τα παρασιτοκτόνα σε επιτραπέζια και οινοποιήσιμα αμπέλια και τους κανονισμούς που τα διέπουν (Πίνακας 2).

Πίνακας 2: MRLs (mg/kg) για παρασιτοκτόνα που ερευνήθηκαν στην παρούσα εργασία, για επιτραπέζια και οινοποιήσιμα αμπέλια (Ec.europa.eu,/mrls-2019-en , Berset et al, 2017)

Παρασιτοκτόνα	EU MRLs σε επιτραπέζια αμπέλια mg/kg	EU MRLs σε οινοποιήσιμα αμπέλια mg/l	
Acetamiprid	0.5	0.5	Regulation 2019/88
Azoxystrobin	3	3	Regulation 2019/552
Azinthos-methyl	0.05	0.05	Regulation 2008/839
Benalaxyl	0.3	0.3	Regulation 2013/1175
Boscalid	5	5	Regulation 2016/156
Bupirimate	1.5	1.5	Regulation 2018/1266
Carbendazim	0.3	0.5	Regulation 2011/559
Chlorpyrifos	0.01	0.01	Regulation 2018/686
Chlorpyrifos-methyl	0.01	0.01	Regulation 2011/559
Cyprodinil	3	3	Regulation 2019/168
Cymoxanil	0.3	0.3	Regulation 2017/195
Coumaphos	0.1	0.1	Regulation 2017/623
Clofentezine	0.02	1.0	Regulation 2015/846
Dimethoate	0.01	0.01	Regulation 2017/1135
Diazinon	0.01	0.01	Regulation 2013/834
Dichlorvos	0.01	0.01	Regulation 2008/839
Difenoconazole	3.0	3.0	Regulation 2019/552
Ethion	0.01	0.01	Regulation 2011/310
Fenthion	0.01	0.01	Regulation 2011/310
Fenthion sulfoxide	0.01	0.01	Regulation 2011/310
Fenbuconazole	1	1	Regulation 2011/540
Fluazifop-p-butyl	0.01	0.01	Regulation 2018/1514
Imidacloprid	1	1	Regulation 2014/491
Iprovalicarb	2	2	Regulation 2013/777
Methoxyfenozide	1.0	1.0	Regulation 2015/1040
Metalaxyl	2	1	Regulation 2017/1164
Myclobutanil	1	1	Regulation 2016/567
Pyraclostrobin	1	2	Regulation 2019/1015
Pyriproxyfen	0.05	0.05	Regulation 2019/1589

Phosalone	0.01	0.01	Regulation 2006/1010
Quizalofop-p-ethyl	0.02	0.02	Regulation 2019/973
Rimsulfuron	0.01	0.01	Regulation 2019/168
Thiacloprid	0.01	0.01	Regulation 2019/50
Thiamethoxam	0.4	0.4	Regulation 2018/524
Terbufos	0.01	0.01	Regulation 2008/149
Tebuconazole	0.5	1	Regulation 2016/1
Triadimenol mix	0.3	0.3	Regulation 2017/627
Trifloxystrobin	3.0	3.0	Regulation 2019/1791

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΟΙΝΟ ΚΑΙ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

2.1 Προκατεργασία - εκχύλιση δειγμάτων για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα

Η προκατεργασία – εκχύλιση του δείγματος αποτελεί την πιο βασική διαδικασία που καθορίζει την χρωματογραφική ανάλυση, με απώτερο σκοπό την παραλαβή ενός κλάσματος, από το συνολικό δείγμα, σχετικά απαλλαγμένο από παρεμποδίζουσες – συνεκχυλιζόμενες ουσίες που οφείλονται στη μήτρα, κατάλληλο για έγχυση στη χρωματογραφική στήλη. Είναι ένα πολύ σημαντικό στάδιο που συμβάλει καθοριστικά στην εξαγωγή ορθών και αναπαραγώγιμων αποτελεσμάτων, πολλές φορές χρονοβόρο, το οποίο υπόκειται σε βελτιστοποίηση των διαφόρων παραμέτρων. Τα βασικά βήματα της αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα δίνεται στο Σχήμα 4.

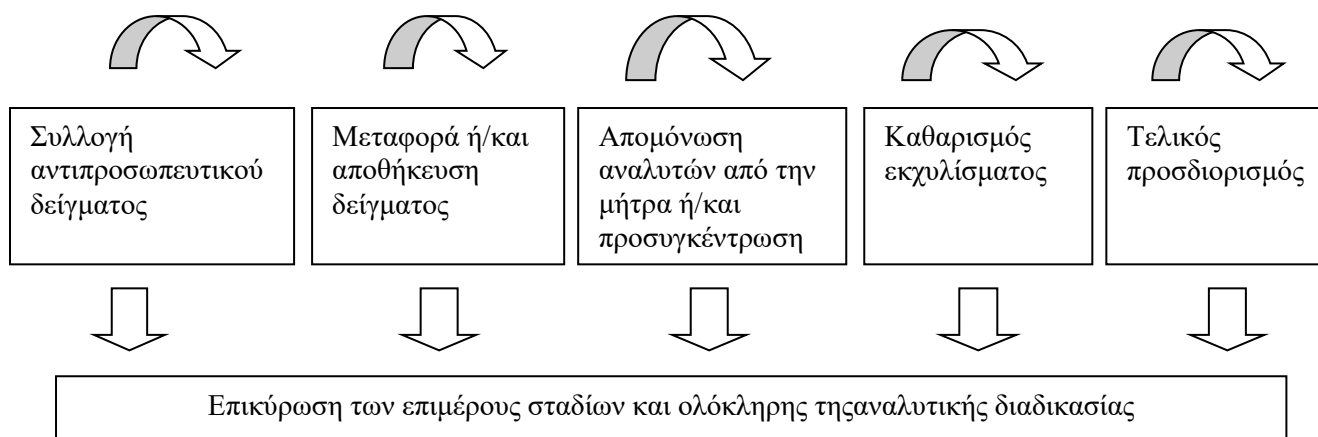
Λόγω των πολύ χαμηλών επιπέδων ανίχνευσης που απαιτούνται, της τάξεως των νάνο ή πίκο, γραμμαρίων (ng, pg), και της πολυπλοκότητας της μήτρας, ο προσδιορισμός υπολειμμάτων σε τρόφιμα αποτελεί συχνά πρόκληση για τους ερευνητές. Οι παραδοσιακές μέθοδοι εκτός από χρονοβόρες, απαιτούν μεγάλους όγκους διαλυτών που αυξάνουν την επικινδυνότητα, τοξικότητα, κόστος της μεθόδου, παράγονται εξ ίσου μεγάλους όγκους αποβλήτων, ενώ συχνά είναι αναγκαία περισσότερα του ενός στάδια καθαρισμού.

Για τον λόγο αυτό αναπτύσσονται ή βελτιώνονται νέοι τρόποι προκατεργασίας – εκχύλισης δειγμάτων τροφίμων με σκοπό να υπερκεραστούν τα μειονεκτήματα των παραδοσιακών προσεγγίσεων. Ιδιαίτερη βάση δίνεται:

- στην ασφάλεια του ερευνητή
- στη μείωση του όγκου των διαλυτών
- στη μείωση του χρόνου προκατεργασίας και
- στη δυνατότητα αυτοματοποίησης της όλης διαδικασίας χωρίς ωστόσο να επηρεαστεί η ορθότητα και η πιστότητα των αποτελεσμάτων.
- σε βελτίωση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης
- στη βελτίωση της ορθότητας της επαναληψιμότητας

2.2 Τεχνικές εκχύλισης δείγματος

Η πορεία ποσοτικής παραλαβής και μείωσης της συγκέντρωσης συνεκχυλιζόμενων ενώσεων των αναλυτών από το τρόφιμο περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια. Το πρώτο στάδιο είναι αυτό της εκχύλισης των αναλυτών από τη μήτρα από έναν οργανικό διαλύτη ή μίγμα διαλυτών και το δεύτερο στάδιο είναι αυτό του καθαρισμού. Η μεταφορά του αναλύτη στον διαλύτη εκχύλισης σε υψηλά ποσοστά και η εξάλειψη σε όσο το δυνατό μεγαλύτερο βαθμό της μεταφοράς παρεμποδίζουσων ουσιών από τη μήτρα. Οι βέλτιστες συνθήκες εκχύλισης είναι προφανές ότι διαφέρουν, ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών, όπως η πολικότητα-λιποφιλία τους και η σταθερά διάστασης τους (pK_a), και του υποστρώματος (π.χ. ποσοστό περιεχόμενου νερού, λίπους, ύπαρξη χρωστικών κ.τ.λ), ωστόσο στις περισσότερες περιπτώσεις γίνεται κάποιος συμβιβασμός προκειμένου να επιτευχθεί η ανάπτυξη μιας κοινής μεθόδου για ένα μεγάλο αριθμό ενώσεων. Τα βήματα της αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα παρουσιάζονται στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 4).



Σχήμα 4: Βασικά βήματα αναλυτικής διαδικασίας για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα (Beyer and Biziuk, 2008).

2.3 Τεχνικές εκχύλισης

2.3.1. ΥΓΡΗ-ΥΓΡΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗ (Liquid - Liquid Extraction LLE)

Για πολλά χρόνια, η συγκεκριμένη τεχνική αποτελούσε την κύρια τεχνική εκχύλισης δειγμάτων τροφίμων και περιβάλλοντος. Η εκχύλιση υγρού-υγρού περιλαμβάνει την απομάκρυνση οργανικών ενώσεων με διαλύτη μη αναμίξιμο με το υπόστρωμα του δείγματος και στηρίζεται στις σχετικές διαλυτότητες του συστατικού ανάμεσα στο διαλύτη εκχύλισης και στο υπόστρωμα του δείγματος. Από τους μη πολικούς διαλύτες πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι είναι το εξάνιο, ο αιθέρας και ο οξικός αιθυλεστέρας ενώ οι αναμίξιμοι με το νερό διαλύτες, όπως μεθανόλη και η ακετόνη χρησιμοποιούνται για εκχύλιση πολικών ενώσεων.

Υπάρχει η τάση αντικατάστασης της κλασσικής εκχύλισης υγρού- υγρού, διότι η τεχνική παρουσιάζει σημαντικά μειονεκτήματα όπως (Farajzadeh et al., 2015):

- δεν προσφέρεται για όλες τις ομάδες ενώσεων
- οι διαλύτες εκχύλισης που χρησιμοποιούνται έχουν μικρή εκλεκτικότητα
- απαιτούνται μεγάλες ποσότητες δείγματος και μεγάλος όγκος οργανικού διαλύτη
- υπάρχει πιθανότητα σχηματισμού γαλακτωμάτων
- είναι αρκετά χρονοβόρα μέθοδος
- έκθεση του αναλυτή σε διαλύτες

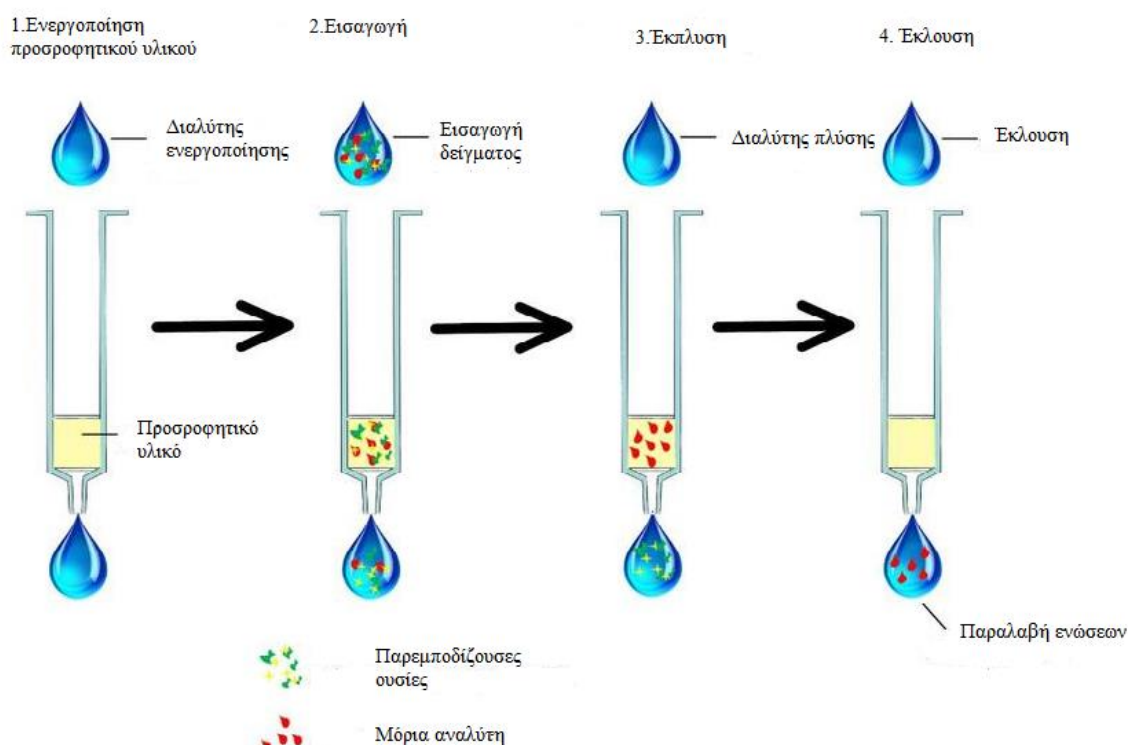
Ως παραδείγματα εφαρμογών της τεχνικής αυτής περιλαμβάνεται η εκχύλιση υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε οίνο (De Melo Abreu et al., 2006), και μέλι (De Pinho et al., 2010).

2.3.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid Phase Extraction, SPE)

Η τεχνική εκχύλισης δια στερεάς φάσης αντικατέστησε την κλασσική εκχύλιση υγρού-υγρού και βασίζεται στην προσρόφηση (δέσμευση) των προσδιοριζόμενων ενώσεων και συστατικών του δείγματος με ανάλογη πολικότητα σε ένα στερεό προσροφητικό υλικό (π.χ. C8, C18, SDB, κ.α.)

Η διαδικασία περιλαμβάνει τα παρακάτω στάδια (Σχήμα 5):

- Ενεργοποίηση – έκλυση του προσροφητικού υλικού με τη βοήθεια ενός διαλύτη (CH_3OH , CH_3CN , H_2O , κ.α.)
- Εισαγωγή του δείγματος
- Έκπλυση του προσροφητικού υλικού με μια σειρά διαφορετικών διαλυτών για την απομάκρυνση παρεμποδίζουσων ενώσεων
- Έκλυση με κατάλληλο διαλύτη για παραλαβή των ενώσεων



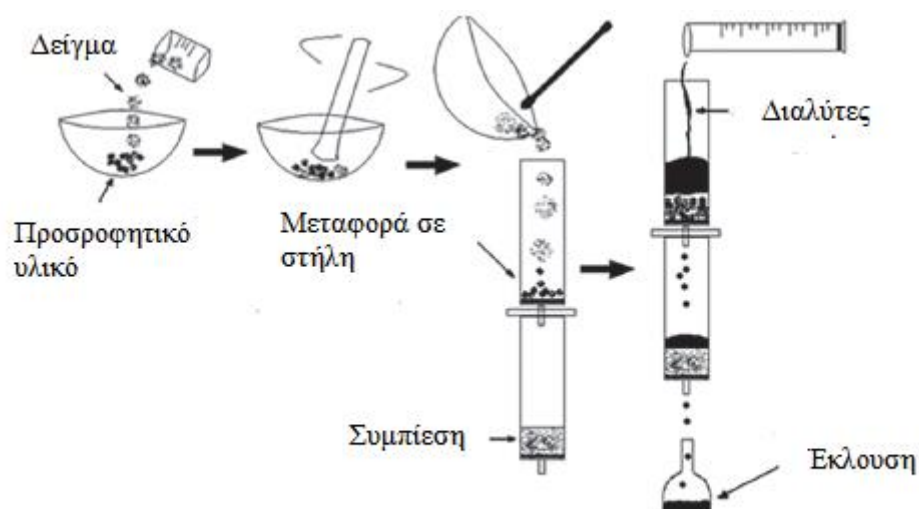
Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) (Sandoval, 2017)

Ο μηχανισμός συγκράτησης των ενώσεων στο προσροφητικό υλικό, είναι ο ίδιος με εκείνο της υγρής χρωματογραφίας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενώσεων, στατικής φάσης και διαλυτών βασίζονται συνήθως σε δυνάμεις van der Waals (διπόλου-δίπολου) δεσμών υδρογόνου, ηλεκτροστατικής φύσεως δυνάμεις και συνδυασμών μεταξύ τους (Wells and Yu, 2000). Εφαρμογές της τεχνικής αυτής περιλαμβάνουν και εκχύλιση υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε οίνο, (Carpinteiro et al., 2010), σε φρούτα και λαχανικά (Hernandez et al., 2006).

2.3.3. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΣΕ ΣΤΕΡΕΑ ΦΑΣΗ (Matrix solid-phase dispersion MSPD)

Η εκχύλιση με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD) αναπτύχθηκε πρώτη φορά το 1989 (Barker, 1989; Kristenson, 2006) για την εκχύλιση

παρασιτοκτόνων από ομογενοποιημένο δείγμα τροφίμου το οποίο βρίσκεται σε διασπορά πάνω σε ένα φέρον στερεό, όπως το πυριτικό μαγνήσιο (Florisil) ή οξείδιο του πυριτίου (Bogialli and Di Corda, 2007). Το ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετείται σε μια στήλη και τα παρασιτοκτόνα εκλούνται εκλεκτικά με οργανικούς διαλύτες (Σχήμα 6). Με αυτό τον τρόπο, η εκχύλιση του δείγματος και ο καθαρισμός του εκχυλίσματος επιτυγχάνονται ταυτόχρονα με καλή επαναληψιμότητα και ανάκτηση. Επιπρόσθετα, τόσο ο χρόνος ανάλυσης όσο και η ποσότητα του οργανικού διαλύτη μειώνονται.



Σχήμα 6: Στάδια της εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD) (Freitas et al., 2018)

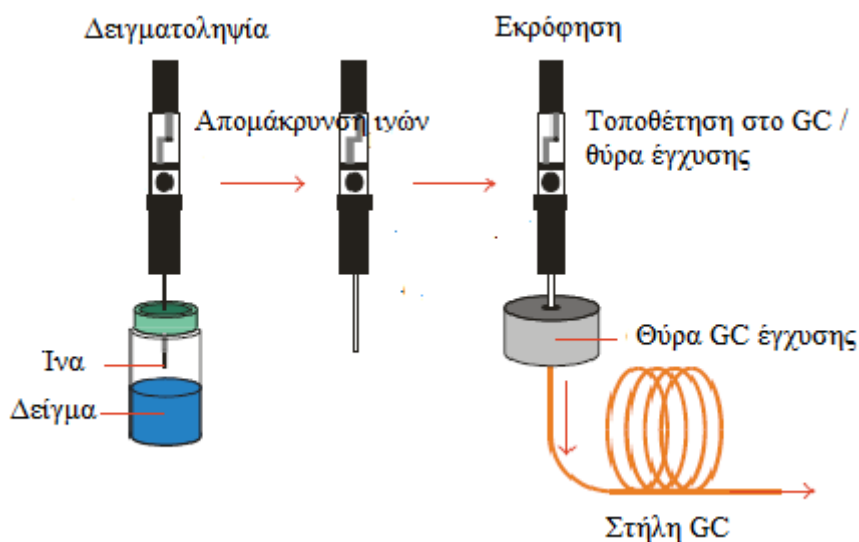
Εφαρμογές της τεχνικής αυτής περιλαμβάνουν την εκχύλιση υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε φρούτα και λαχανικά (Fernandez et al., 2000), γάλα (Muccio et al., 1996), αυγά (Valsamaki et al., 2006) και ψάρια (Carro, 2005). Σε πολλές περιπτώσεις χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση του λίπους όπως στην περίπτωση του προσδιορισμού παρασιτοκτόνων σε καρπό ελιάς και ελαιόλαδο (Ferrer et al., 2005).

Αν και η εκχύλιση με διασπορά υποστρώματος σε στερεά φάση (MSPD) είναι μια καλή τεχνική για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα, δεν μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί και είναι αρκετά χρονοβόρα σε περιπτώσεις ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Επιπρόσθετα απαιτείται ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού των εκχυλισμάτων σε περιπτώσεις λιπαρών δειγμάτων.

2.3.4. ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid Phase Microextraction, SPME)

Μία από τις σχετικά νέες τεχνικές που χρησιμοποιούνται την τελευταία 15-ετία και έχουν ως χαρακτηριστικό την χρήση μικρής ποσότητας δείγματος είναι η Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME). Η τεχνική αυτή μοιάζει με την εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), διαφέρει ως προς το προσροφητικό υλικό το οποίο βρίσκεται στην επιφάνεια ίνας και όχι πακεταρισμένο σε στήλη ή τοποθετημένο πάνω σε δίσκο εκχύλισης, όπως γίνεται στην εκχύλιση στερεής φάσης (SPE). Η Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME) είναι μια μη εξαντλητική μέθοδος εκχύλισης και χρησιμοποιείται για υγρά, αέρια και στερεά δείγματα, ενώ η SPE είναι μέθοδος εξαντλητικής εκχύλισης και χρησιμοποιείται κυρίως σε υγρά δείγματα (Mester et al., 2001)

Η τεχνική βασίζεται στο διαχωρισμό του συστατικού στόχου, σε ακινητοποιημένη στερεή φάση. Μετά την επίτευξη ισορροπίας ή με την πάροδο καθορισμένου χρονικού διαστήματος οι ενώσεις που έχουν προσροφηθεί στην ίνα, εκροφούνται θερμικά με την έκθεση της ίνας στην περιοχή που γίνεται η έγχυση του δείγματος σε αέριο Χρωματογράφο (GC) ή υγρό Χρωματογράφο Υψηλής Απόδοσης ώστε να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν (Σχήμα 7) (Eisert and Pawliszyn, 1997).



Σχήμα 7: Σχηματική απεικόνιση της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) (Schmidt and Podmore, 2015)

Η τεχνική της Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME) εφαρμόζεται περισσότερο για τον προσδιορισμό πτητικών και ημι – πτητικών οργανικών ενώσεων.

Στον Πίνακα 3 παραθέτεται ανασκόπηση των μεθόδων εκχύλισης για τον προσδιορισμό παρασιτοκτόνων και άλλων οργανικών επιμολυντών σε υπόστρωμα οίνου, οι ενώσεις που μελετήθηκαν, οι ανακτήσεις, η χρωματογραφική μέθοδος ανάλυσης καθώς και τα όρια αντίχνευσης και ποσοτικοποίησης των ενώσεων που μελετώνται.

Πίνακας 3: Ανασκόπηση μεθόδων εκχύλισης υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε δείγματα οίνου.

Υπόστρωμα	Φυτοφάρμακα	Τεχνική εκχύλισης	Μέθοδος	Ανάλυση	Ανάκτηση	LOD/LOQ	Βιβλιογραφία
Οίνος	Famoxadone	LLE	EA+Hex (50+50, v/v)	GC/ECD και GC-MS	91–115 (≤11.7) 84– 108 (≤6.8)	LOD (GC- ECD): 60 μg/L, LOD (GC-MS): 20 μg/L	de Melo Abreu et al. (2006)
Οίνος	11 παρασιτοκτόνα	LLE	EA+ Hex (1+1, v/v), GCB/PSA SPE	GC/MS	100 (≤16)	LOD ≤ 10 μg/kg	González- Rodríguez et al. (2009)
Οίνος	46 παρασιτοκτόνα	SPE	SPE Oasis HLB cartridges	HPLC/ MS/MS	70–110 (20)	LOD: 0.3–3 μg/L LOQ: 1–10 μg/L	Economoul et al. (2009)

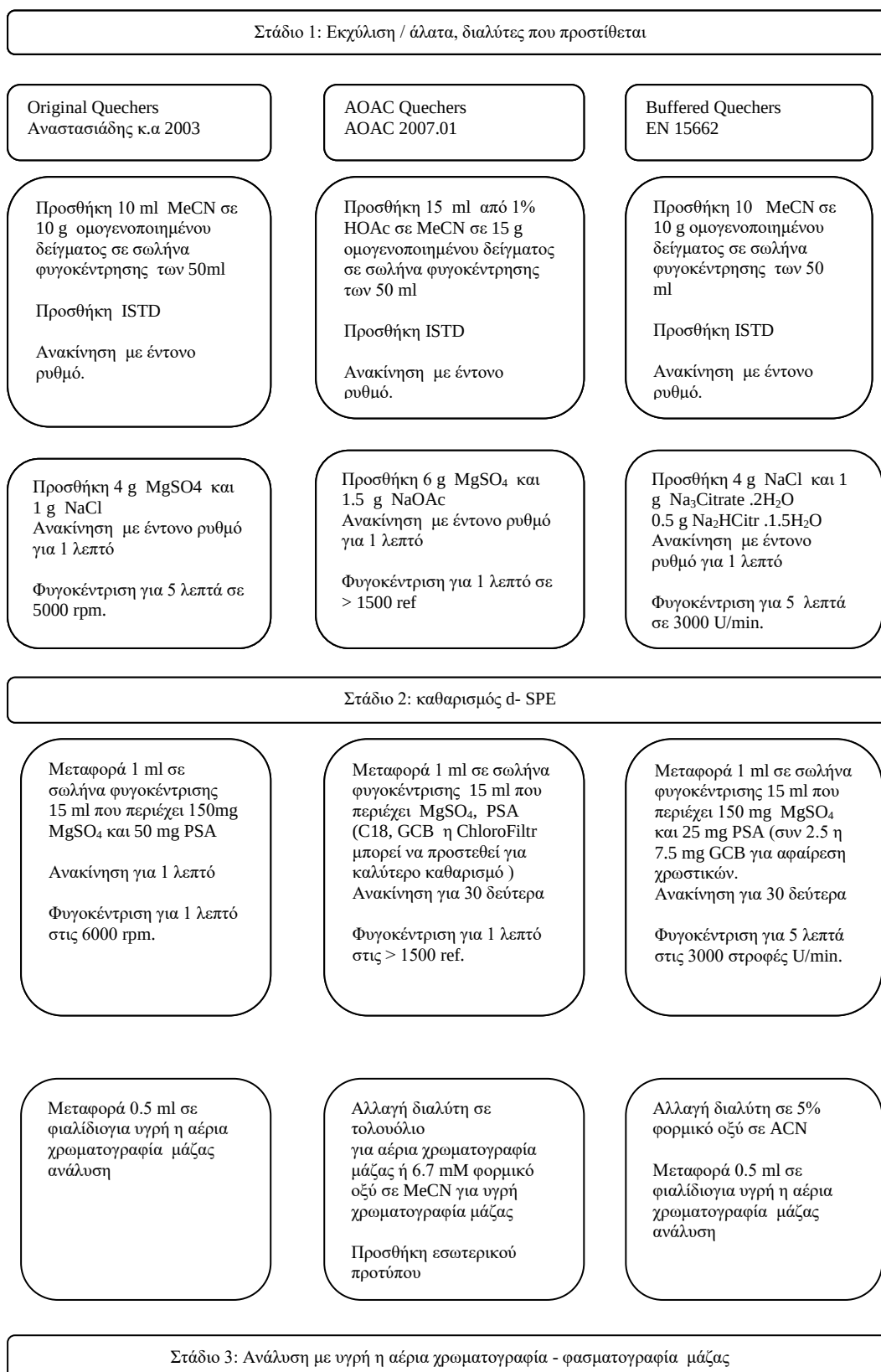
Οίνο	2,4,6-trichlorophenol, 2,3,4,6-tetrachlorophenol, 2,4,6-tribromophenol, 2,4,6-trichloroanisole, 2,3,4,6-tetrachloroanisole, 2,4,6-tribromoanisole	SBSE and SPME	PDMS	GC/MS/MS	SBSE: (0.23–13.34) SPME: (0.01–14.21)	LOD (SBSE): 10–710 µg/L, LOD (SPME): 220–880 µg/L	Maggi et al. (2008)
------	---	---------------	------	----------	---------------------------------------	---	---------------------

Υπόστρωμα	Φυτοφάρμακα	Τεχνική εκχύλισης	Μέθοδος	Ανάλυση	Ανάκτηση	Βιβλιογραφία	
Οίνος	13 εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα	SPME	PDMS	GC/MS	SBSE: 0.2– 55.3 (0.3– 19.2); MASE: 13.6– 103.1 (2.6– 18.4)	LOD (wine): 2–33 µg/L; LOQ (wine): 7– 109 µg/L; LOD	Urruty and Montury (1996) Zambonin et al. (2004)
Οίνος	12 παρασιτοκτόνα	SPME	PDMS/D VB	DVB MEKC/ DAD		LOQ: 54– 113 µg/L	Ravelo-Pérez et al. (2007)
Οίνος	11 παρασιτοκτόνα	SPME	PDMS/D VB	MEKC/ DAD	90-107	LOD: 0.049– 1.69 mg/L	Ravelo-Pérez, et al. (2008)
Οίνος	12 παρασιτοκτόνα	SPME	PDMS	GC/TSD	(≤5)	LOD: 0.00– 0.38 µg/L	Hu, Liu, Zhou, and Guan (2006)

Οίνος	procymidone, pentachloroanilin e and methylpentachlor ophenylsulfide	MSPD	Florisil	GC/ECD	82.4–93.7 (<8)	LOD: 0.1– 0.4 µg/L	Zhu et al. (2007)
Οίνος κόκκινος	25 παρασιτοκτόνα	SPE	SPE Oasis HLB cartridges	GC/MS	76- 84	LOD:0,01-25 µg/L,LOQ:0, 01-25 µg/L	Maja Pelajic(2016)
Οίνος	9 μυκητοκτόνα	SPE		LC–ESI- MS/MS	> 72%	LOQs:0.01– 0.79 ng/mL	Carpinteiro I.(2010)
Οίνος/ σταφύλια	11 μυκητοκτόνα	SPE	(GCB/PS A) SPE	GC-ITMS	60%	LOQ:0,001- 0,058,λευκο LOQ:0,002- 0,068 Κόκκινο	Rosa Ma.(2009)

2.3.5 Μέθοδος εκχύλισης QuEChERS

Η τεχνική εκχύλισης QuEChERS είναι μία σχετικά νέα τεχνική, μετρά μία 15-ετία εφαρμογής, με ευρύ φάσμα αναφορών για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα. Αποτελεί ακρωνύμιο των λέξεων ‘Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe’ δηλαδή, γρήγορη, εύκολη, οικονομική, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής. Δημοσιεύθηκε πρώτη φορά το 2003 από τους Anastassiades et al. (Anastassiades et al., 2003) (Σχήμα 8). Έχει εξελιχθεί, βελτιστοποιηθεί και τροποποιηθεί με ποικίλους τρόπους ώστε να εφαρμόζεται, εκτός από τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων, στον προσδιορισμό κτηνιατρικών φαρμάκων (Lopes, 2012), μυκοτοξινών (Arroyo-Manzanare et al., 2013), πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) (Sadowska-Rociek et al., 2013), δισφαινόλης A και B (Cunha et al, 2012).κ.α. Η εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης QuEChERS εκτός των αρχικών υποστρωμάτων τροφίμων φρούτων και λαχανικών έχει επεκταθεί σχεδόν στο σύνολο των υποστρωμάτων όπως ψάρι (Lazartigues et al., 2011), γάλα (Wei et al., 2014) , λάδι (Chamkasema and Harmona, 2015), οίνο (Oliva et al., 2018) κ.α.



Σχήμα 8: Σχηματική απεικόνιση των τριών κύριων εκδοχών της μεθόδου QuEChERS (Original QuEChERS Method, AOAC 2007.01 Official Method, EN 15662 The European Official Method) και των σταδίων εκχύλισης, καθαρισμός και ανάλυσης (Rejczak and Tuzimski, 2015).

Η διαδικασία της εκχύλισης QuEChERS αποτελείται από δύο απλά στάδια. Αρχικά το ομογενοποιημένο δείγμα εκχυλίζεται και οι αναλύτες κατανέμονται μεταξύ του προστιθέμενου οργανικού διαλύτη και του υδατικού υποστρώματος στο οποίο έχουν προστεθεί άλατα για να υποβοηθήσει την παραπάνω κατανομή. Στη συνέχεια το υπερκείμενο συλλέγεται και ακολουθεί καθαρισμός με την τεχνική της εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσεως (dispersive solid phase extraction, d-SPE). Η τεχνική συμφωνεί με τους στόχους της προκατεργασίας ενός δείγματος έχοντας τον ελάχιστο αριθμό βημάτων, μειώνοντας τον απαιτούμενο χρόνο, καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της. Πιο αναλυτικά τα διαδοχικά βήματα της μεθόδου απεικονίζονται στο Σχήμα 9.

1.Εισαγωγή υποστρώματος



2.Εισαγωγή διαλύτη



3.Ανάδευση με το χέρι



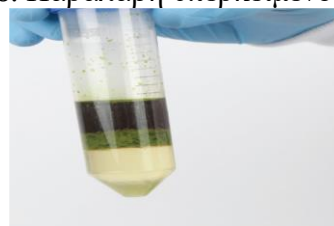
4. Προσθήκη αλάτων



5.Φυγοκέντριση-Διαχωρισμός Φάσεων



6. Παραλαβή υπερκείμενου



Σχήμα 9: Βήματα μεθόδου εκχύλισης QuEChERS

Το αρχικό βήμα αποτελεί η εκχύλιση του ομογενοποιημένου δείγματος με κάποιον οργανικό διαλύτη και ταυτόχρονα η υγρή-υγρή κατανομή (liquid-liquid partitioning) παρουσία ποσότητας αλάτων, όπως άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4), χλωριούχο νάτριο (NaCl) κιτρικά άλατα (trisodium citrate, sodium citrate dibasic sesquihydrate). Ακολούθως το δείγμα ανακινείται για κάποιο χρονικό διάστημα και φυγοκεντρείται. Το υπερκείμενο διάλυμα που προκύπτει υπόκειται σε καθαρισμό και περαιτέρω εκχύλιση με τη χρήση της εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσεως (d-SPE). Στην d-SPE μια μικρή ποσότητα προσροφητικής ουσίας (πρωτοταγής – δευτεροταγής αμίνη, primary-secondary amine, PSA) και άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) προστίθενται στο εκχύλισμα του δείγματος. Κατά τη διάρκεια της δεύτερης εκχύλισης απομακρύνονται η ποσότητα υδατικής φάσης και τα συστατικά της μήτρας του υποστρώματος που έχουν συνεκχυλιστεί. Ακολουθεί και πάλι ανακίνηση και φυγοκέντρηση του δείγματος, διαχωρισμός των φάσεων. Στο υπερκείμενο υγρό σε μερικές περιπτώσεις, ρυθμίζεται το pH και αναλύεται με αέρια ή υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης – φασματομετρία μάζας.

Κρίσιμος παράγοντας στην τεχνική QuEChERS αποτελεί ο οργανικός διαλύτης εκχύλισης καθώς από αυτόν εξαρτάται το ποσοστό των αναλυτών που θα παραλάβουμε και επομένως η ανάκτηση της μεθόδου. Συνήθως χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο, ακετόνη ή οξικός αιθυλεστέρας. Η ακετόνη αναμειγνύεται εύκολα με το νερό δυσκολεύοντας τον διαχωρισμό τους, ο οξικός αιθυλεστέρας είναι λιγότερο αναμίξιμος με το νερό αλλά δεν παραλαμβάνει ποσοτικά τις πολικές ενώσεις, ενώ τα εκχυλίσματα ακετονιτρίλιου περιέχουν λιγότερες παρεμποδίζουσες - συνεκχυλιζόμενες ουσίες (matrix interferences), διαχωρίζεται εύκολα από το νερό υπό την επίδραση της εξαλάτωσης (salting out) και τον καθιστούν ιδανικό στην τεχνική εκχύλισης QuEChERS.

Η προσθήκη αλάτων κατά το στάδιο της εκχύλισης οδηγεί σε καλύτερη εκχύλιση και διαχωρισμό των φάσεων αλλά και τη σταθεροποίηση κάποιων αναλυτών, παρέχοντας υψηλότερη ανάκτηση και εκλεκτικότητα για ευρύ φάσμα ενώσεων. Το θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) μειώνει τον όγκο της υδατικής φάσης βοηθώντας την κατανομή των πολικών αναλυτών στην οργανική φάση. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) βελτιώνει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης, καθώς με μεταβολή της ποσότητας αυτού δύναται να ελεγχθεί η πολικότητα της μεθόδου και επομένως η ποσότητα των παρεμποδίζουσων ουσιών στο εκχύλισμα.

Η τεχνική d-SPE προτιμάται εν αντιθέσει με την τεχνική της SPE για το στάδιο του καθαρισμού καθώς η τελευταία απαιτεί περισσότερο χρόνο και κόπο από τον αναλυτή, μεγαλύτερους όγκους σε διαλύτες, μεγαλύτερο κόστος υλικών και απαιτείται επίσης συγκεκριμένη οργανολογία (συσκευή υγρής – στερεής εκχύλισης).

Ο προσδιορισμός υπολειμμάτων διάφορων ενώσεων σε τρόφιμα έχει να αντιμετωπίσει μεγάλες παρεμποδίσεις από τα πολυπληθή συστατικά της πολύπλοκης μήτρας του δείγματος. Η τεχνική QuEChERS παρέχει πολλές παραλλαγές ως προς τον καθαρισμό (clean-up) ώστε να ανταποκρίνεται καλύτερα στην εκάστοτε ανάλυση.

- Ψύξη του δείγματος: χρησιμοποιείται η ψύξη του ομογενοποιημένου δείγματος σε χαμηλές θερμοκρασίες (-80°C) ώστε συστατικά της μήτρας, όπως λίπη, κηροί, σάκχαρα, να απομακρυνθούν. Η οργανική φάση μπορεί δε να αποθηκευτεί στην κατάψυξη ώστε τα συστατικά της μήτρας με χαμηλή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο να καθιζάνουν.
- Χρήση μίγματος PSA/MgSO₄ ως προσροφητικά στην d-SPE: το MgSO₄ απομακρύνει τυχόν επιπλέον υγρασία ενώ η PSA, ως ασθενής ιονανταλλάκτης, απομακρύνει λιπαρά οξέα, σάκχαρα και πολικά οργανικά οξέα (Payá et al., 2007).
- Χρήση μίγματος PSA/C18 (ODS, octadecylsilane): χρησιμοποιείται συνδυασμός δύο προσροφητικών υλικών για δείγματα με υψηλά ποσοστά λιπαρών υλών (Jia W. et al., 2014).
- Χρήση μίγματος PSA/GCB (Graphitized Carbon Black): χρησιμοποιείται συνδυασμός δύο προσροφητικών υλικών για δείγματα με μέτρια έως και υψηλά επίπεδα χλωροφύλλης, καροτινοειδών (Li et al., 2009) και γενικά χρωστικών.
- Προσθήκη νερού: συνίσταται σε τρόφιμα με χαμηλό ποσοστό υγρασίας (<80%), πριν από όλη την διαδικασία (Nannou et al. , 2019).

Τέλος τα πλεονεκτήματα της τεχνικής QuEChERS, έναντι των άλλων τεχνικών εκχύλισης είναι (Martinez et al., 2005):

- Η περιορισμένη χρήση διαλυτών και αποβλήτων είναι περιορισμένη.
- Απαιτείται ελάχιστος εργαστηριακός εξοπλισμός για τα βήματα προκατεργασίας και εκχύλισης.
- Απαιτείται μικρό κόστος αντιδραστηρίων και αναλωσίμων.
- Είναι δυνατή η επεξεργασία 10-20 προζυγισμένων δειγμάτων ταυτοχρόνως μέσα σε 30-40 λεπτά.

- Δεν απαιτούνται ιδιαίτερες ικανότητες, δεξιότητες και εκπαίδευση για τον αναλυτή ώστε να πραγματοποιήσει την προκατεργασία
- Η προσθήκη του ακετονιτριλίου γίνεται απευθείας στον δοκιμαστικό σωλήνα χωρίς να έρχεται σε άμεση επαφή ο αναλυτής.
- Η τεχνική είναι συμβατή τόσο με αέρια χρωματογραφία όσο και με υγρή χρωματογραφία.
- Επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις (>85%) για φυτοφάρμακα μεγάλου εύρους πολικότητας και πτητικότητας ακόμα και για πολύ δύσκολους αναλύτες.

2.4 Μέθοδος εκχύλισης QuEChERS σε υπόστρωμα οίνου

Στην ανάλυση παρασιτοκτόνων σε οίνο έχουμε διάφορες αναφορές για τις τρεις κύριες εκδοχές (α) την αυθεντική-πρωταρχική μέθοδο (original QuEChERS), (β) την οξιτισμένη μέθοδο (σύμφωνα με την AOAC) και (γ) την μέθοδο με την προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH (buffered QuEChERS) (Πίνακας 4). Με την μέθοδο εκχύλισης QuEChERS σε μήτρα οίνου μπορεί να πραγματοποιηθεί πολύ-υπολειμματική ανάλυση παρασιτοκτόνων, μυκητοκτόνων, εντομοκτόνων και μυκοτοξινών. Είναι εύκολη, γρήγορη μέθοδος, με πολύ καλές ανακτήσεις για τις ενώσεις που μελετώνται.

Η αυθεντική-πρωταρχική μέθοδος εκχύλισης QuEChERS είναι μία βασική μέθοδος στην οποία το στάδιο της εκχύλισης περιλαμβάνει την προσθήκη αλάτων, MgSO_4 και NaCl , ενώ το δεύτερο στάδιο του καθαρισμού περιλαμβάνει την προσθήκη MgSO_4 και PSA. Η πρωτοταγής-δευτερογενής αμίνη (PSA) είναι ένας ροφητής με ικανότητα αφαίρεσης σακχάρων, οργανικών οξέων, λιπαρών οξέων και πολικών χρωστικών ουσιών, όπως ανθοκυανίνες (Dias et al., 2016; Słowik-Borowiec et al., 2018). Το άνυδρο MgSO_4 υποβοηθά την κατανομή στον οργανικό διαλύτη στο πρώτο στάδιο ενώ στο δεύτερο δεσμεύει - μειώνει την υδατική φάση που έχει κατανεμηθεί στον οργανικό διαλύτη. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί σε υπόστρωμα οίνου με πολύ καλές ανακτήσεις παρασιτοκτόνων σε ποσοστά που κυμαίνονται μεταξύ 69-119 %, ενώ μπορεί να παραβλεφτεί η διαδικασία του καθαρισμού, αφού τα αποτελέσματα μπορεί να είναι ικανοποιητικά και χωρίς αυτό το στάδιο για λόγους απλούστευσης της διαδικασίας, μείωση χρόνου προκατεργασίας και του κόστους (Jia et al. 2019).

Η μέθοδος εκχύλισης AOAC QuEChERS έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στην ανίχνευση παρασιτοκτόνων σε οίνο (Tuzimski and Rejczak, 2016; Tianyang et al., 2019). Η προσθήκη 1% οξικού οξέος σε 10 ml ακετονιτρίλιο μαζί με την προσθήκη οξικού

νατρίου, προάγει την επίδραση εξαλάτωσης και ρυθμίζει το pH του εκχυλίσματος σε τιμή περίπου 5, βοηθώντας την εκχύλιση παρασιτοκτόνων ευαίσθητων σε χαμηλό pH ή εκείνων που παρουσιάζουν προβλήματα σταθερότητας (Rizzeti et al., 2016; Nannou et al., 2018). Στο δεύτερο στάδιο του καθαρισμού έχουμε προσθήκη MgSO_4 και PSA. Μπορεί να γίνει περαιτέρω καθαρισμός με την προσθήκη ροφητών όπως C18, GCB για να ελαχιστοποιηθούν οι παρεμποδίζουσες ουσίες όπως χρωστικές ουσίες, ανθοκυανίνες, σε κόκκινο και λευκό οίνο (Wang and Cheung, 2016).

Στην μέθοδο εκχύλισης QuEChERS με ρύθμιση του pH (Buffered) προστίθεται άλατα MgSO_4 , NaCl και κιτρικά άλατα στο στάδιο της εκχύλισης. Στην διαδικασία του καθαρισμού γίνεται προσθήκη αλάτων, MgSO_4 και PSA. Δύναται να πραγματοποιηθεί προσθήκη και άλλων ροφητών όπως GCB, κυρίως σε κόκκινο οίνο για να απομακρυνθούν οι χρωστικές ουσίες του (ανθοκυανίνες) (Paya et al., 2007). Οι ανακτήσεις των παρασιτοκτόνων με εφαρμογή της εκχύλισης Buffered QuEChERS είναι πολύ υψηλές, της τάξεως των 98 % (Paya et al., 2007).

Υπάρχουν αρκετές αναφορές για χρήση της μεθόδου εκχύλισης QuEChERS σε οίνο. Στον Πίνακα 4 παραθέτονται η μέθοδος εκχύλισης QuEChERS για υπολείμματα παρασιτοκτόνων σε οίνο, οι ενώσεις που μελετήθηκαν, η μέθοδος καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε, η μέθοδος ανάλυσης χρωματογραφίας, οι ανακτήσεις, καθώς και τα LOQ, LOD των ενώσεων που μελετήθηκαν.

Πίνακας 4: Ανασκόπηση μεθόδων εκχύλισης QuEChERS υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε δείγματα οίνου.

Υπόστρωμα	Παρασιτοκτόνα	Τεχνική εκχύλισης	Μέθοδος	Οργανολογία Ανάλυσης	Ανάκτηση (%)	LOD/LOQ	Αναφορά
Οίνος	36 μυκοτοξίνες	Quechers	d-SPE	UPLC-MS/MS	70-120	LOD<2μg/ kg	Pizzutti Ionara R. et al., 2014
Οίνος	6 μυκητοκτόνα	Quechers AOAC	d-SPE	HPLC-DAD LC-QqQ-MS	71 – 86	LOD:0,020- 0,140ng/ml,LOQ: 0.061-0.424 ng/mL	Tuzimski T. and Rejczak T. 2016
Οίνος και σταφύλια	13 φυτοφάρμακα	Quechers Buffered	d-SPE	LC- MS/MS	36-117	LOD:0,2-1,1 LOQ:10	Pazzirota T. et al. 2013
Οίνος / Σταφύλια	27 φυτοφάρμακα	Quechers Original	d-SPE	LP/GC/ MS	52–121 (4–19)	LOQ: 1.3–19.0 μg/kg	Cunha et al. (2009)
Σταφύλια	Flusilazole	Quechers Original	d-SPE	HPLC- DAD	86-90	LOD:0.008 LOQ:0.02 mg/kg,	Malhat F. et al. 2015
Λευκός και κόκκινος Οίνος	187 φυτοφάρμακα	Quechers AOAC	d-SPE	UPLC/ESI- MS/MS	71-120	-	Wang Jian and Cheung Wendy 2016

Κόκκινος Οίνος	42 φυτοφάρμακα	Quechers Buffered	d-SPE	LC-MS/MS	98	-	Paula Paya et al. 2007
Οίνος	49 φυτοφάρμακα 17 μυκοτοξίνες	Quechers Original	d-SPE	UHPLC- MS/MS	69-119	LOD:0,05-20 µg/l	Jia He et al. 2019
Κόκκινος Οίνος και σταφύλια	9 μυκητοκτόνα	Quechers Buffered	d-SPE	LC-MS/MS QqQ	73.2 σταφύλια/ 76.7 κρασί	LOD,LOQ:0.003- 0.01 mg/kg	Oliva J. et al. 2018
Κόκκινος Οίνος	36 φυτοφάρμακα	Quechers AOAC	d-SPE	PS-MS/MS	75-120	LODs: 0.1 and 100 ng/mL, LOQs: 0.3 and 300 ng/mL.	Tianyang Guo et al. 2019
Σταφύλια/ φρούτα/λαχανικά	166 φυτοφάρμακα	Quechers AOAC		UHPLC/ ESI Q- Orbitrap	81 - 110	-	Wang J. et al., 2012
Κόκκινος Οίνος	24 φυτοφάρμακα	Quechers AOAC	d-SPE	LC-MS/MS	70-120	≤2ng/ml	Oliver Mike, 2013
Σταφύλια/ Λαχανικά	451 φυτοφάρμακα	Quechers AOAC	d-SPE	UHPLC/ESI Q- Orbitrap MS	94.5 στα φρούτα/ 90.7% στα λαχανικά	-	Jian Wang et al., 2014
Οίνος	Ωχρατοξίνη A	Quechers Buffered	d-SPE	LC-MS/MS	50-120	LOD:0.1-2.2, LOQ:0.4-7.4	Fernandes J. P. Et al., 2013

Σταφύλια και Οίνος	20 μυκοτοξίνες	Quechers Original	d-SPE	UHPLC		LOD:0.06– 10μg/L, LOQ:0.18–30 μg/L	Zhang Bo et al., 2018
					66–106		
Κόκκινος Οίνος	50 φυτοφάρμακα	Quechers Buffered	d-SPE	DART-MS/MS		LOD:0.5–50 ng/mL LOQ:1– 100 ng/mL	Tianyang Guo et al., 2016
					75-120		
Οίνος	Φυτοφάρμακα, βιολογικά φυτοφάρμακα και μυκοτοξίνες	Quechers AOAC	d-SPE	UHPLC– MS/MS		LOQ:3-10μg/kg	Gonzalez Romero R. et al., 2011
					71-108		
σταφύλια και Οίνος	131 φυτοφάρμακα	Quechers Buffered	d-SPE	GC-μECD/ NPD		LOQ:0.002–0.041 mg/kg σε σταφύλια 0.009–0.023 mg/kg στο κρασί	Słowik-Borowiec M. et al., 2018
					70-120		
Οίνος	Chlorpyrifos (CP) και μεταβολίτης Chlorpyrifos- oxon (CPO)	Quechers Buffered	d-SPE	GC-HP-ECD	92.3 ± 18.2% για CP 96.6 ± 16.1% για	LOD:0,04 LOQ:0.15 ng/mL for CP , LOD: 0.49 LOQ:1.62 ng/mL for CPO	Fusun Okcu Pelit et al, 2012

CPO							
Κόκκινο, λευκό οίνο βιολογικό/ σταφύλια	27 φυτοφάρμακα	Quechers Original	d-SPE	LP-GC/MS	57-120 στα σταφύλια- 70-120 στο κρασί	LOQ:0.02- 5μg/g	Cunha S.C. et al., 2009
Οίνος	44 φυτοφάρμακα	Quechers AOAC	d-SPE	LC-MS/MS και GC/MS	64.5–141.1	LOQ:0.7-80μg/l (LC/MS) LOQ:78-625μg/l (GC-MS)	Vargas Thais de Souza et al., 2018
Κόκκινος Οίνος	173 φυτοφάρμακα	Quechers Buffered	d-SPE	UHPLC- MS/MS και GC/MS/MS	75 -100	LOQ:2.60-21.39 μg/kg	Santana-Mayor A. et al, 2020

2.5 Φασματομετρία Μάζας

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry, MS) ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια (συστατικά) ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης και εφαρμόζεται ευρέως σε πολλούς τομείς της τεχνολογίας και της έρευνας. Η πρόοδος στη μικροηλεκτρονική και οι αυξανόμενες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση, έχουν προωθήσει την ανάπτυξη της τεχνικής και την έχουν καταστήσει απαραίτητο εργαλείο για μεγάλο φάσμα ερευνητικών δραστηριοτήτων. Κύριο πεδίο εφαρμογής είναι οι επιστήμες ζωής, των τροφίμων, οι περιβαλλοντικές επιστήμες και οι ομικές τεχνολογίες. Αυτό συμβαίνει γιατί η φασματομετρία μαζών προσφέρει πληροφορίες για (Δεληγιαννάκης κ.α., 2010):

- την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων
- τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων
- την παρουσία και το ποσοστό ισοτόπων
- τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging)

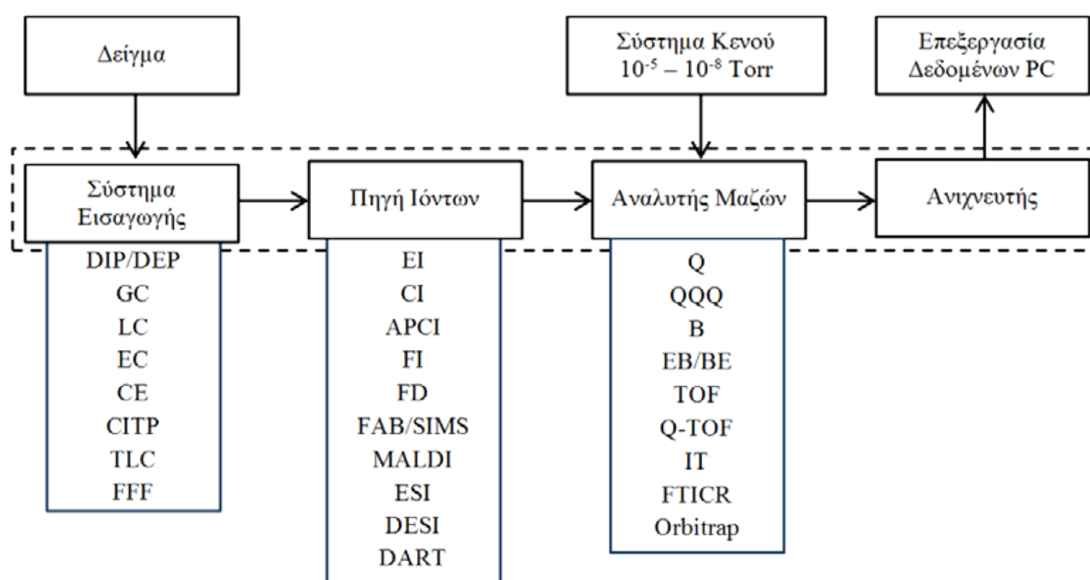
Η φασματομετρία μαζών στην ανάλυση τροφίμων, περιβαλλοντικών δειγμάτων κ.α. έχει τα παρακάτω χαρακτηριστικά:

- μεγάλη εκλεκτικότητα, που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, γεγονός που επιτρέπει την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Η δυνατότητα αυτή έχει ως αποτέλεσμα την απόλυτη κυριαρχία των τεχνικών υγρής ή αέριας χρωματογραφίας – φασματογραφίας μάζας.
- πολύ υψηλή ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} mol.
- η φασματομετρία μαζών μπορεί θεωρητικά να δράσει σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector) και επομένως να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ενώσεως.
- τη δυνατότητα εύρεσης δομής αγνώστων ενώσεων, η οποία έχει βρει μεγάλη εφαρμογή στις ομικές τεχνολογίες, καθώς επιτυγχάνει αποδοτική εύρεση δομής πεπτιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεοτιδίων (Δεληγιαννάκης κ.α., 2010).

2.5.1 Ο φασματογράφος μαζών

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται, όπως φαίνεται στο Σχήμα 10 (Δεληγιαννάκης, 2010), από τα εξής επιμέρους τμήματα:

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Το δείγμα εισάγεται σε αέρια ή υγρή μορφή.
- Την πηγή ιόντων, όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα.
- Τον αναλυτή μαζών. Εδώ λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο μάζας / φορτίου (m/z).
- Τον ανιχνευτή, που συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.
- Το σύστημα κενού. Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.
- Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό.



Σχήμα 10: Τμήματα φασματογράφου μαζών με τις συντομογραφίες των κυριότερων τεχνικών κάθε σταδίου (Δεληγιαννάκης, 2010)

2.5.2 Πηγή Ιόντων

Η επιλογή της τεχνικής ιονισμού που θα εφαρμοστεί είναι μεγάλης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει. Για την ίδια ένωση, το λαμβανόμενο φάσμα μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικό με εφαρμογή διαφορετικών τεχνικών και συνθηκών ιονισμού. Ένας διαχωρισμός των τεχνικών ιονισμού μπορεί να γίνει σε "μαλακές" και "σκληρές"

τεχνικές. Στις σκληρές τεχνικές ιονισμού χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια που προκαλεί διάσπαση της σε θυγατρικά ιόντα (θραύση). Μαλακές καλούνται οι τεχνικές που επιτυγχάνουν τον ιονισμό σε ηπιότερες συνθήκες με μικρή ή μηδαμινή θραύση και την παραγωγή μοριακών ή ψευδομοριακών ιόντων.

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται οι κύριες τεχνικές ιοντισμού που εφαρμόζονται, οι διατάξεις με τις οποίες συνήθως συνδυάζονται, τα είδη των ιόντων που παράγονται καθώς και οι κατηγορίες των αναλυόμενων ενώσεων (Δεληγιαννάκης κ.α., 2010).

Οι κύριες πηγές ιονισμού είναι οι εξής: 1. μέθοδοι αέριας φάσης (EI - Electron Impact), 2. μέθοδοι εξάχνωσης (MALDI - Matrix Assisted Laser Desorption Ionization) και 3. μέθοδοι ψεκασμού (APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization, ESI- Electrospray Ionization). Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των κυριότερων τεχνικών ιονισμού στη φασματομετρία μάζας παρουσιάζονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 5: Κύριες τεχνικές ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας

Τεχνική Ιοντισμού	Κύρια Ιόντα	Αναλυτής Μαζών	Τάξεις ενώσεων
Ιοντισμός ηλεκτρονίων	M^+ , θυγατρικά ιόντα	Q, TOF, IT, B	Μη πολικές, κάποιες πολικές <500 datlon
Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI)	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	TOF, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή Έως 106 datlon
Electrospray (DESI, ESI)	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$ ιόντα προσθήκης π.χ. $[M+NH_4]^+$	Q, TOF, IT, FTICR, Orbitrap	Πολικές, κάποιες μη πολικές οργανικές, πρωτεΐνες <200.000 datlon
Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI)	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	Q, TOF, IT	Μη πολικές, κάποιες πολικές <1000 datlon

Πίνακας 6: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των κυριότερων τεχνικών ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας (Parasuraman et al., 2004; Ardrey, 2003; Finehout and Lee, 2004)

	Πλεονεκτήματα	Πηγές ιοντισμού	Μειονεκτήματα
Μέθοδοι αέριας φάσης	- Μεγάλη ευαισθησία - Δυνατότητα δημιουργίας βάσης δεδομένων για τον προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων - Συμβατό με αέρια χρωματογραφία	Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI)	- Περιορισμένο εύρος ανίχνευσης μαζών - Πιθανότητα καταστροφής δειγμάτων λόγω υψηλής θερμοκρασίας πριν την εξάτμιση - Υψηλή θραυσματοποίηση, ανικανότητα προσδιορισμού μοριακού ιόντος
Μέθοδοι εξάχνωσης	- Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 300000 Da - Μεγάλη ευαισθησία - Τεχνική ήπιου ιοντισμού - Ανεκτικότητα σε ύπαρξη αλάτων, συγκέντρωση τάξης mmole	Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI)	- Χαμηλή ανάλυση - Πιθανότητα χημικής αποικοδόμησης ουσίας λόγω ακτινοβολίας - Υψηλός θόρυβος μήτρας που μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα σε ανίχνευση μαζών μικρότερων από 1000 Da
Μέθοδοι ψεκασμού – ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση	- Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 2000 Da - Μεγάλη ευαισθησία - Τεχνική πολύ ήπιου ιοντισμού - Συμβατό με υγρή χρωματογραφία	Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI)	- Πιθανότητα χημικής αποικοδόμησης ουσίας λόγω θερμότητας - Η ευαισθησία ποικίλει ανάλογα με την ουσία που μελετάται
Μέθοδοι ψεκασμού – ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση	- Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 700000 Da - Μεγάλη ευαισθησία - Τεχνική πολύ ήπιου ιοντισμού - Κατάλληλο για υγρή χρωματογραφία	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)	- Μη ανεκτικότητα σε ύπαρξη αλάτων - Η καθαρότητα των ουσιών που εισέρχονται στην πηγή είναι σημαντική

2.5.3 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Ο Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Το διάλυμα του δείγματος αντλείται μέσω ανοξειδωτής τριχοειδούς βελόνας ή τριχοειδούς σωλήνα όταν η πηγή είναι συνδεδεμένη σε υγρή χρωματογραφία, με ταχύτητα $\mu\text{L}/\text{min}$. Η βελόνα βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που περιβάλλει την βελόνα. Οι φορτισμένες μικρές σταγόνες που

παράγονται διέρχονται μέσω ενός τριχοειδούς, όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και τα μόρια του αναλύτη φορτίζονται. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται «εξάτμιση με ιοντισμό» και εντάσσεται στις μαλακές/ήπιες τεχνικές ιοντισμού.

Καθώς η διάμετρος της σταγόνας μειώνεται λόγω της εξάτμισης του διαλύτη η πυκνότητα του φορτίου αυξάνει και λαμβάνει χώρα ο σχηματισμός ιόντων σε αέριο περιβάλλον. Χαρακτηριστικό μειονέκτημα του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό είναι η περιορισμένη θραύση μεγάλων και θερμικά ασταθών βιομορίων. Είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στην παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων άλατος και στην παρουσία μη πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων καθώς και σε παρεμποδίσεις από το μητρικό υλικό (Ho et al., 2003).

2.5.4 Αναλυτές μαζών

Υπάρχουν τρεις μεγάλες κατηγορίες αναλυτών μαζών και τα τυπικά χαρακτηριστικά τους, όπως η διακριτική ικανότητα, η ακρίβεια μάζας και η ευαισθησία παρουσιάζονται στον Πίνακα 7. Οι αναλυτές μαζών χωρίζονται σε (De Hoffmann and Stroodant, 2007):

- Αναλυτές σάρωσης, όπως ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (Q) και οι αναλυτές μαγνητικού τομέα.
- Παλμικοί αναλυτές μαζών, όπως η τετραπολική παγίδα ιόντων (Ion trap, IT), οι αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF).
- Υβριδικοί αναλυτές που περιλαμβάνουν συνδυασμό αναλυτών σε σειρά, όπως LIT - Orbitrap και Q-TOF.

Πίνακας 7: Τυπικά χαρακτηριστικά για διάφορους αναλυτές μαζών (De Hoffmann and Stroodant, 2007).

Φασματομέτρο μαζών	Διακριτική ικανότητα(FWHM)	Ακρίβεια μάζας(ppm)	Ευαισθησία(g)
Quadrupole(Q)	2000	50	10 ⁻¹⁵
Time of flight(TOF)	5000	10	10 ⁻¹²
Orbitrap	150000	<5	10 ⁻¹⁵

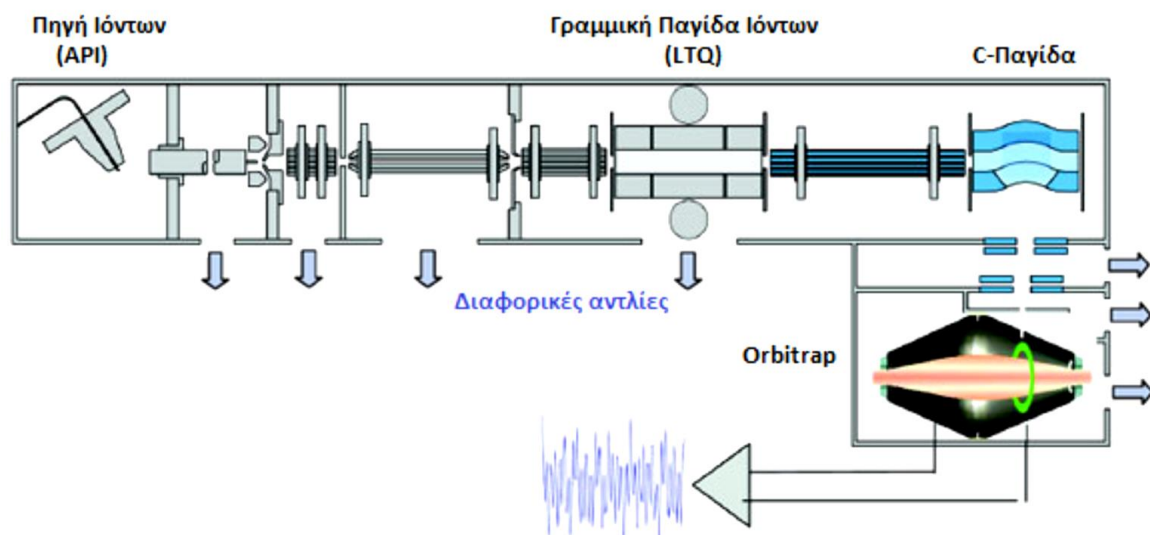
2.5.5 Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας LC-hybrid LTQ/Orbitrap-MS

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας, έχει αποδειχθεί ως ένας πολύ αποτελεσματικός και αξιόπιστος τρόπος για τον προσδιορισμό παρασιτοκτόνων στα τρόφιμα (Wang et al., 2012; Wang et al., 2014).

Ο αναλυτής Orbitrap αποτελεί έναν νέο τύπο αναλυτή τροχιακής παγίδας ιόντων, που επιτρέπει την ανίχνευση σε μεγάλο εύρος μαζών (έως 2000 Da), με υψηλή διακριτική ικανότητα (έως και 150.000 FWHM), ακρίβεια μάζας (τέσσερα ή πέντε δεκαδικά ψηφία) και δυναμικό εύρος (> 4.000 σε μία σάρωση). Η χρήση του Orbitrap, δίνει την δυνατότητα για σχετικό σφάλμα μάζας <5 ppm, εξασφαλίζοντας υψηλή αξιοπιστία στην ταυτοποίηση (Σχήμα 11) (Kosma et al., 2014)

Ο αναλυτής μαζών αποτελείται από δύο ειδικά διαμορφωμένα ηλεκτρόδια, το κεντρικό και το εξωτερικό ηλεκτρόδιο. Ο αναλυτής μαζών LIT - Orbitrap είναι ένα υβριδικό σύστημα που συνδυάζει τη γραμμική παγίδα ιόντων LTQ με την τροχιακή παγίδα μαζών Orbitrap. Τα παραγόμενα ιόντα στην πηγή ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API) παγιδεύονται στο LTQ και μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση μεθόδων σαρώσεως MS και MSⁿ (n=1-10).

Στη συνέχεια, τα ιόντα επιταχύνονται ευθύγραμμα και συλλέγονται στην παγίδα ιόντων σχήματος C (C-Trap), από την οποία στη συνέχεια εισάγονται στην τροχιακή παγίδα Orbitrap και συλλέγονται - παγιδεύονται με απότομη άνοδο του δυναμικού στο κεντρικό ηλεκτρόδιο του Orbitrap. Τα παγιδευμένα ιόντα κινούνται σε κυκλική τροχιά γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και ανιχνεύονται οι αξονικές ταλαντώσεις τους κατά μήκος του κεντρικού ηλεκτροδίου. Τα αξονικά ταλαντευόμενα ιόντα παράγουν ένα περιοδικό σήμα στα εξωτερικά ηλεκτρόδια, το οποίο ανιχνεύεται ως αποτυπωμένο ρεύμα (image current). Μετά από την ενίσχυση του, τα σήματα του αποτυπωμένου ρεύματος μετατρέπονται σε φάσμα συχνοτήτων με χρήση του αλγορίθμου μετατροπής Fourier (Fourier Transformation, FT algorithm). Επειδή η συχνότητα ταλάντωσης σχετίζεται ευθέως με το λόγο μάζας/φορτίου (m/z), το φάσμα συχνοτήτων μετατρέπεται εύκολα σε φάσμα μαζών (Κομποθέκρα-Κότσορου, 2013).



Σχήμα 11: Σχηματική απεικόνιση του υβριδικού φασματογράφου μάζας LTQ-Orbitrap

2.5.6 Πλεονεκτήματα χρήσης φασματογράφου μάζας Orbitrap

Ο αναλυτής μαζών Orbitrap προσελκύει το ενδιαφέρον λόγω της αναλυτικής απόδοσης, της υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας μάζας, της χωρητικότητας φορτίων, του μεγάλου γραμμικού δυναμικού εύρους και της σταθερότητας του. Οι αναλυτές Orbitrap μπορούν να συνδυάσουν την αξιόπιστη ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών σε μια μόνο ανάλυση.

Η ακρίβεια μάζας του οργάνου με εξωτερική βαθμονόμηση φτάνει τα 3 ppm και με εσωτερική βαθμονόμηση το 1 ppm. Η διακριτική ικανότητα είναι 60000-150000 σε (m/z 400) με ταχύτητα σάρωσης 1 Hz. Το εύρος μάζας είναι μεταξύ 50 και 2000 amu, ενώ η ευαισθησία φτάνει και σε επίπεδα fmol. Επίσης υπάρχει η δυνατότητα διαδοχικής ανάλυσης MS/MS (θεωρητικά : $n = 1-10$), χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές θραυσματοποίησης κατά περίπτωση (CID, HCD, PQD κ.α.)

Η οργανολογία LTQ Orbitrap περιλαμβάνει επιπλέον δυνατότητες όπως τον ιοντισμό με τη μέθοδο MALDI και με μεταφορά ηλεκτρονίων (electron-transfer dissociation, ETD). Έχει ευρύ πεδίο εφαρμογών, όπως πρωτεϊνικής ανάλυσης, ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης μεταβολιτών, ανάλυσης λιπιδίων, ενώ τελευταία και η περιβαλλοντική ανάλυση και ανάλυση υπολειμμάτων σε τρόφιμα κατέχουν σημαντικές θέσεις στα πεδία εφαρμογής.

2.6 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Η ορθότητα και αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου αποτιμάται μέσω μελετών επικύρωσης. Διεθνή θεσμικά όργανα έχουν συνεργαστεί για την έκδοση πρωτοκόλλων ή οδηγιών ώστε να παρέχονται οι ελάχιστες απαιτήσεις των διαδικασιών που εξασφαλίζουν επαρκή επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων (Thomson et al., 2002; SANTE 2019).

Οι κυριότερες παράμετροι επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου είναι οι παρακάτω:

- Ορθότητα (trueness): Προσδιορίζεται με μελέτες πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ή υλικών που έχουν εμβολιαστεί με γνωστή ποσότητα των αναλυτέων ουσιών και μπορεί να εκφραστεί ως η απόκλιση μιας αναλυτικής μεθόδου.
- Πιστότητα (Precision): Με τον όρο πιστότητα εννοούμε τον επαναλαμβανόμενο ορθό υπολογισμό της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Επηρεάζεται σημαντικά από τυχαία σφάλματα, μπορεί να ελεγχθεί μέσω της επαναληψιμότητας, δηλαδή επανάληψης της ίδιας πειραματικής διαδικασίας σε διαφορετικά δείγματα την ίδια μέρα, ή της αναπαραγωγιμότητας, δηλαδή επανάληψης της ίδιας διαδικασίας σε διαφορετικά δείγματα διαφορετικές μέρες.
- Γραμμικότητα (linerality): Η γραμμικότητα της απόκρισης (εύρος επιπέδων συγκέντρωσης) προσδιορίζεται σε πρότυπα διαλύματα ενώσεων και σε πραγματικά δείγματα.
- Όριο ανίχνευσης (Limit of detection, LOD): Είναι η ελάχιστη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας, η οποία μπορεί να ανιχνευτεί με βεβαιότητα 99,6%. Στόχος είναι τα ιδιαίτερα χαμηλά όρια ανίχνευσης.
- Εκλεκτικότητα / ειδικότητα (Selectivity/Specificity): Είναι ο βαθμός ιδιαίτερης απόκρισης μίας μεθόδου σε μια συγκεκριμένη ένωση προς ανάλυση .
- Αβεβαιότητα: Είναι ένα εύρος γύρω από το αναφερόμενο αποτέλεσμα εντός του οποίου μπορεί να βρίσκεται η πραγματική τιμή αναμένεται να βρίσκεται με συγκεκριμένη βεβαιότητα (συνήθως επίπεδο εμπιστοσύνης 95%). Τα δεδομένα αβεβαιότητας λαμβάνουν υπόψη την πιστότητα (bias) και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου (SANTE/12682/2019).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΛΕΥΚΟ ΚΑΙ ΚΟΚΚΙΝΟ ΟΙΝΟ

3.1 Πρότυπες ουσίες - διαλύτες - αντιδραστήρια - υλικά - όργανα – συσκευές

■ Πρότυπες ενώσεις παρασιτοκτόνων

Οι φυτοπροστατευτικές ουσίες που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία έχουν καθαρότητα >99% και προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma - Aldrich (Steinheim, Germany). Όλες οι ουσίες ήταν σε στερεά μορφή.

Η παρασκευή των πυκνών προτύπων διαλυμάτων αναφοράς (stock solutions) πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη μεθανόλη (υψηλής καθαρότητας) Pestiscan, σε συγκεντρώσεις 800-2000 ppm. Μετά την παρασκευή τους, τα διαλύματα διατηρήθηκαν σε γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 10 ml στους -20 °C. Πρότυπα διαλύματα μείγματος παρασιτοκτόνων παρασκευάστηκαν έπειτα από τις κατάλληλες αραιώσεις των πυκνών προτύπων σε διαλύτη μεθανόλη.

■ Διαλύτες

- Μεθανόλη και ακετόνη υψηλής καθαρότητας, του οίκου Pestiscan (Labscan, Ltd., Dublin, Ireland).
- Ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και νερό LC-MS-grade, του οίκου Fisher Scientific (Leicestershire, UK).

■ Αντιδραστήρια

- Άνυδρο θειικό μαγνήσιο, (καθαρότητας 99,5% % σκόνη), του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).
- Χλωριούχο νάτριο (καθαρότητας 100%), του οίκου Riedel-de Haën (Hannover, Germany).
- trisodium citrate dehydrate ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$) του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).
- Sodium citrate dibasic sesquihydrate purchased from (καθαρότητας >99.0%), του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
- Οξικό νάτριο, άνυδρο (καθαρότητας 99%), του οίκου Riedel-de Haën (Hannover, Germany).

- Μυρμηγκικό οξύ (καθαρότητας, 98-100 %), του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany).
- Μυρμηγκικό αμμώνιο, του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany).
- Πρωτοταγής - δευτεροταγής αμίνη (PSA; 40 μm) (PSA) του οίκου Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).
- Γραφίτοποιημένος άνθρακας (GCB) του οίκου Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).
- C18 (LiChroprep RP-18, 40–64 μm), του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).

■ Υλικά

- Φιαλίδια 61x16.6 mm, clear glass, του οίκου Lab Logistics Group GmbH-Meckenheim.
- Φιαλίδια 32x11.6 mm, clear glass, του οίκου Target Analysis A.E Kinesis.
- Πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου 50 ml, 28mm ,του οίκου Millipore (Cork, Ireland)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου 15 ml, 17mm ,του οίκου Millipore (Cork, Ireland)
- Σύριγγες όγκου 5 mL, του οίκου Softcare laboratory series
- Μικρές σύριγγες 1 mL , του οίκου Softcare laboratory series
- Φίλτρα 13mm 0,45μm PTFE Luer , του οίκου Target analysis s.a.
- Φίλτρα 13mm 0,22μm PTFE with Luer lock, του οίκου Target analysis s.a.

■ Όργανα – συσκευές

Για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων φαρμακευτικών ουσιών χρησιμοποιήθηκαν τα εξής όργανα και συσκευές:

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένο με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany).
- Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 4 δεκαδικών ψηφίων (Denver Instrument Company, AA- 160, Göttingen, Germany).
- Συσκευή μέτρησης του pH, τύπου C932 (Consort).
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Daihan Labtech, Wilmington, USA).
- Συσκευή απόσταξης νερού.

- Συσκευή συμπίκνωσης δειγμάτων υπό ήπιο ρεύμα αζώτου.
- Στήλη χρωματογραφίας C₁₈ (Restek), 150 x 4.6 mm με 5μm μέγεθος σωματιδίων (Restek, USA).
- Στήλη χρωματογραφίας Thermo hypersil gold, 150 x 2.1 mm με 5μm μέγεθος σωματιδίων (Bremen, Germany).

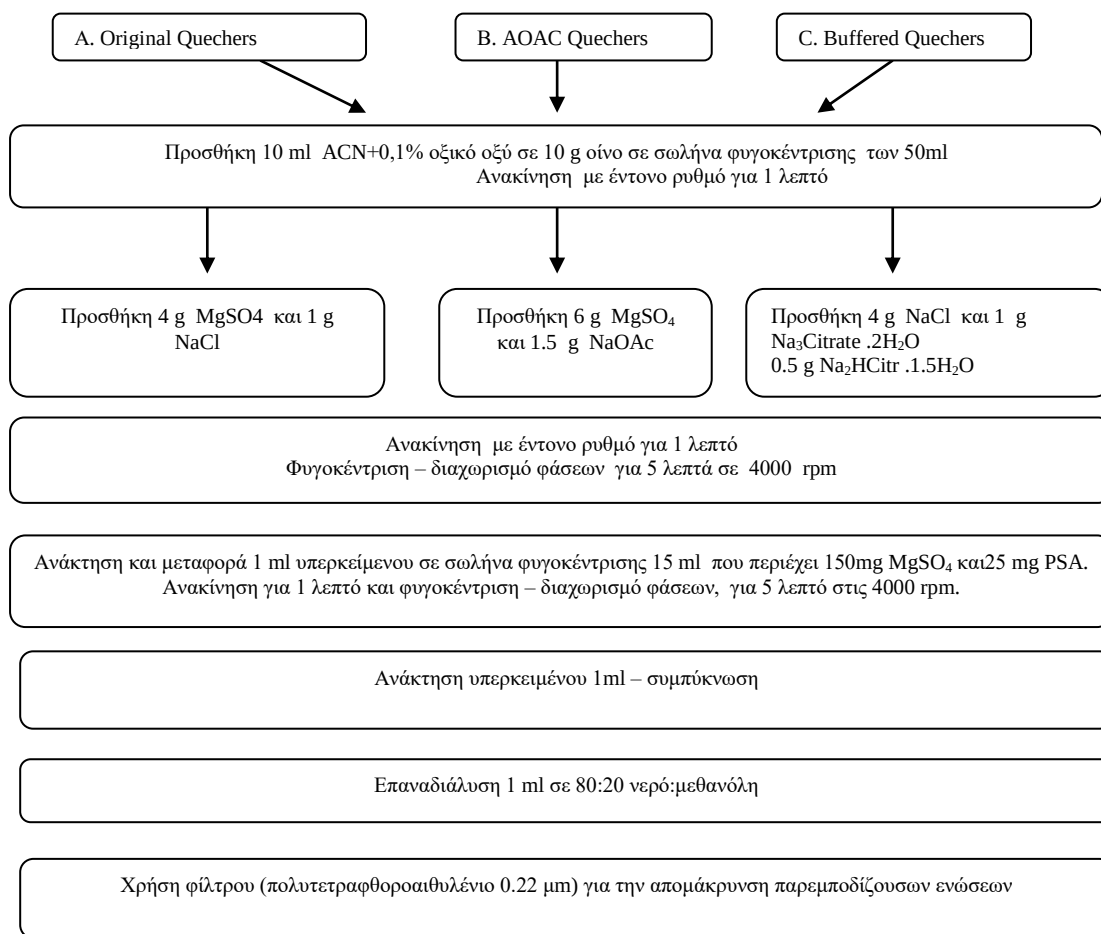
3.2 Τα βήματα της εκχύλισης QuEChERS που βελτιστοποιήθηκαν

Για την εκχύλιση κόκκινου και λευκού οίνου επιλέχθηκε η τεχνική Quechers η οποία είναι αυτή που χρησιμοποιείται κατά κόρον στη βιβλιογραφία για προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό παρασιτοκτόνων. Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας που βελτιστοποιήθηκαν ήταν:

- Η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης QuEChERS σε υπόστρωμα οίνου
- Επιλογή και αναλογία προσροφητικών υλικών για απομάκρυνση παρεμποδίζουσων – συνεκχυλιζόμενων ουσιών
- Βελτιστοποίηση του όγκου του τελικού δείγματος

3.2.1 Δοκιμές μεθόδου εκχύλισης QuEChERS σε υπόστρωμα οίνου

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με τις τρεις κύριες εκδοχές της μεθόδου QuEChERS (A) την αυθεντική-πρωταρχική μέθοδο (original QuEChERS), (B) την οξινισμένη μέθοδο (σύμφωνα με την AOAC) και (C) την μέθοδο με την προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH (buffered QuEChERS) σε λευκό οίνο ώστε να βρεθεί η πιο αποτελεσματική εκδοχή, με τις καλύτερες ανακτήσεις των αναλυτών που μελετώνται. Στο παρακάτω διάγραμμα (Σχήμα 12) αναλύονται τα στάδια που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε φάση και στις τρεις εκδοχές μεθόδου εκχύλισης QuEChERS.



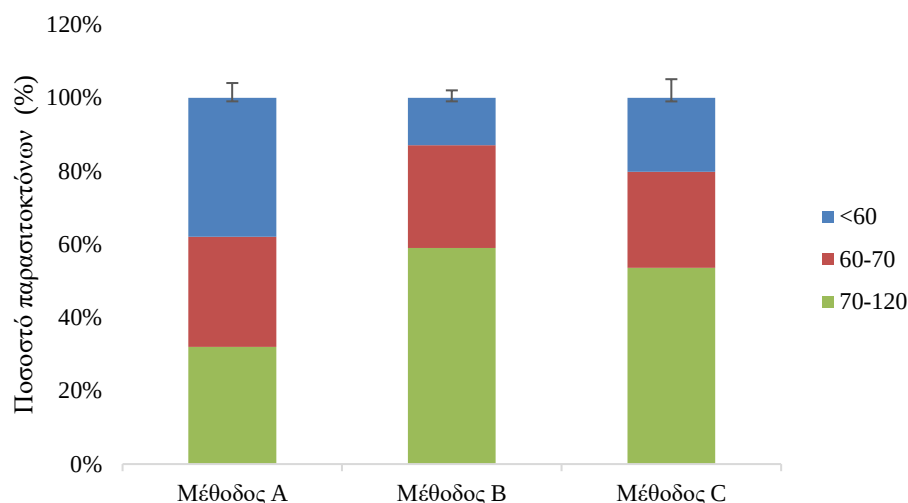
Σχήμα 12: Τα στάδια που πραγματοποιήθηκαν στις τρεις κύριες εκδοχές μεθόδου εκχύλισης QuEChERS.

Σε σωλήνα φυγοκέντρωσης 50 ml προστέθηκαν 10 g οίνου και εμβολιάσθηκαν με μίγμα παρασιτοκτόνων σε συγκέντρωση 50 μg/kg και ανακινήθηκαν στο χέρι για 1 λεπτό με έντονο ρυθμό. Στην συνέχεια προστέθηκε ο διαλύτης, 10 ml ACN+0,1% οξικό οξύ και ακολούθησε ανακίνηση με το χέρι για 1 λεπτό με έντονο ρυθμό. Ακολούθως προστέθηκαν τα άλατα, 4 g MgSO₄ και 1 g NaCl που αντιστοιχούν στην αυθεντική-πρωταρχική μέθοδο εκχύλισης (Original QuEChERS) και ανακινήθηκαν εκ νέου με το χέρι με έντονο ρυθμό και τέλος πραγματοποιήθηκε φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε 4000 rpm για τον διαχωρισμό των φάσεων και παραλαβή της υπερκείμενης φάσης (1 ml) και μεταφορά σε σωλήνα φυγοκέντρωσης 15 ml που περιείχε τα άλατα, προσροφητικά, για τον καθαρισμό, 150 mg MgSO₄ και 25 mg PSA. Πραγματοποιήθηκε ανακίνηση με το χέρι για 1 λεπτό με έντονο ρυθμό και φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε 4000 rpm, διαχωρισμός των φάσεων και παραλαβή 1 ml το οποίο συμπυκνώνεται υπό ήπιο ρεύμα

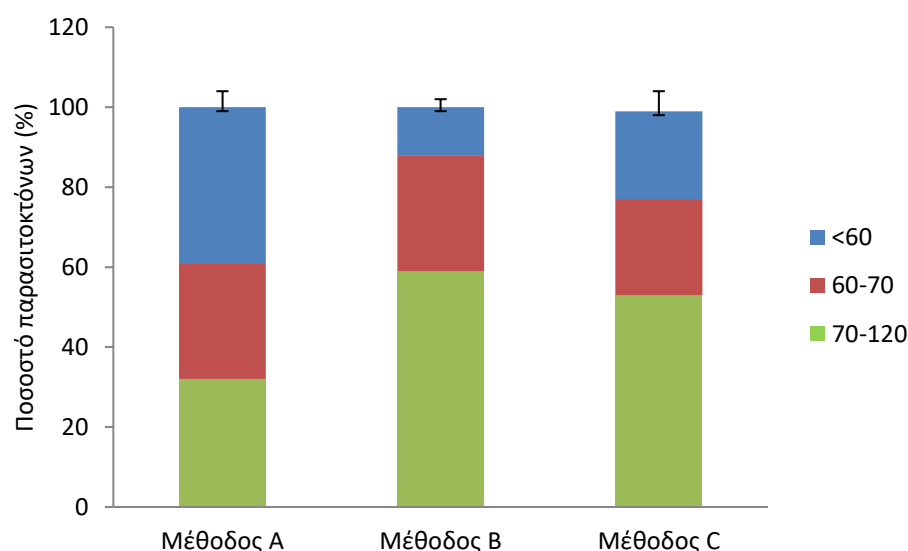
αζώτου μέχρι ξηρού και επαναδιαλυτοποιήθηκε σε 1 ml 80:20 νερό:μεθανόλη. Το εκχύλισμα διήθηκε με χρήση φίλτρου σύριγγας (πολυτετραφθοροαιθυλένιο 0.22 μm) για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων και μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη για περαιτέρω ανάλυση. Ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία και στις εκδοχές της εκχύλισης QuEChERS Buffered και οξινισμένη, σε λευκό και κόκκινο οίνο. Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προσομοίωσης του υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 1 - 750 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σε λευκό και κόκκινο οίνο.

Στην αυθεντική-πρωταρχική μέθοδο (original QuEChERS) (μέθοδος A) σε λευκό οίνο, το 38% του συνόλου των παρασιτοκτόνων παρουσίασαν ανακτήσεις <60%, το 30% παρουσίασαν ανακτήσεις 60-70%, ενώ το 32% κατείχαν ανακτήσεις 70-120%. Στην οξινισμένη μέθοδο (σύμφωνα με την AOAC) (μέθοδος B) το 13% του συνόλου των παρασιτοκτόνων παρουσίασαν ανακτήσεις <60 %, το 28% παρουσίασαν 60-70% ανακτήσεις, ενώ το 59% των παρασιτοκτόνων παρουσίασαν ανακτήσεις 70-120%. Στην μέθοδο με την προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH (buffered QuEChERS) (C) το 20% των παρασιτοκτόνων κατείχαν ανακτήσεις <60 %, το 26% παρουσίασαν 60-70% ανακτήσεις, ενώ το 53% κατείχαν ανακτήσεις 70-120% (Σχήμα 13).

Υψηλότερες ανακτήσεις παρατηρήθηκαν στην οξινισμένη μέθοδο (μέθοδος B) και στην buffered QuEChERS (μέθοδος C) από ότι στην original (μέθοδος A), με την οξινισμένη μέθοδο να έχει ελαφρώς υψηλότερες ανακτήσεις από την μέθοδο buffered QuEChERS. Οι τιμές στην οξινισμένη μέθοδο (μέθοδος B) κυμαίνονται από 57 έως 115% (Σχήμα 13). Στην περίπτωση του κόκκινου οίνου δοκιμάστηκαν επίσης οι παραπάνω τρεις προσεγγίσεις της μεθόδου QuEChERS και οι υψηλότερες ανακτήσεις παρατηρήθηκαν στην οξινισμένη μέθοδο (μέθοδος B) και στην buffered QuEChERS (μέθοδος C) σε σύγκριση με την original (μέθοδος A), με την οξινισμένη μέθοδο να έχει ελαφρώς υψηλότερες ανακτήσεις από την μέθοδο buffered QuEChERS. Τα ποσοστά ανάκτησης στην οξινισμένη μέθοδο (μέθοδος B) κυμαίνονται από 59 έως 117% (Σχήμα 14).



Σχήμα 13: Ποσοστά ανάκτησης (%) με εφαρμογή των διαφορετικών μεθόδων QuEChERS. (α) Μέθοδος A ("Original"), (β) Μέθοδος B ("AOAC 2007.01") και (γ) Μέθοδος C ("Buffered CEN 15662") σε λευκό οίνο.



Σχήμα 14: Ποσοστά ανάκτησης (%) με εφαρμογή των διαφορετικών μεθόδων QuEChERS. (α) Μέθοδος A ("Original"), (β) Μέθοδος B ("AOAC 2007.01") και (γ) Μέθοδος C ("Buffered CEN 15662") σε κόκκινο οίνο.

Το επόμενο βήμα ήταν η εφαρμογή ορισμένων τροποποιήσεων της οξιτισμένης μεθόδου προκειμένου να επιτευχθούν υψηλότερες ανακτήσεις ορισμένων αναλυτών ταυτόχρονα με χαμηλότερη εκχύλιση ανεπιθύμητων - παρεμποδίζουσων ενώσεων.

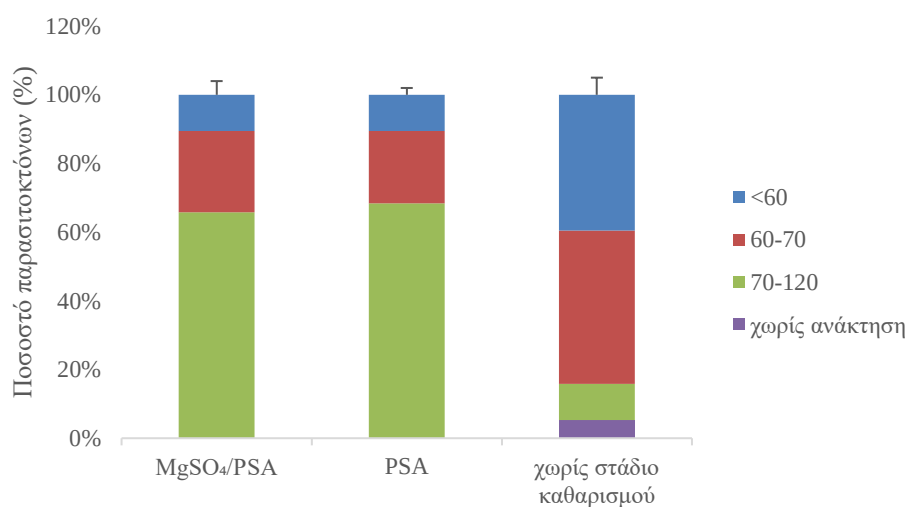
Όσον αφορά τον διαλύτη εκχύλισης, η επιλογή του ακετονιτριλίου βασίστηκε στο γεγονός ότι είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης στις μεθόδους QuEChERS, επιτρέποντας την εκχύλιση ενός ευρέος φάσματος παρασιτοκτόνων με

διαφορετικές πολικότητες. Η προσθήκη 1% οξικού οξέος σε διαλύτη ακετονιτρίλιο μαζί με την προσθήκη οξικού νατρίου, προάγει την επίδραση εξαλάτωσης και ρυθμίζει το pH του εκχυλίσματος. Με τη χρήση οξικού νατρίου, το pH του εκχυλίσματος φτάνει περίπου το 5, βοηθώντας την εξαγωγή παρασιτοκτόνων ευαίσθητων σε χαμηλό pH ή εκείνων που παρουσιάζουν προβλήματα σταθερότητας (Rizzeti et al., 2016; Nannou et al., 2018). Αξίζει να σημειωθεί ότι όταν εκτελέσαμε την οξινισμένη μέθοδο με 1,5 g ποσότητα NaOAc, η οποία είναι η αρχική προτεινόμενη ποσότητα της μεθόδου AOAC 2007,01, ήταν δύσκολο να διαχωριστούν οι δύο φάσεις, επομένως φαινόταν ότι δεν επιτεύχθηκε ικανοποιητικό αποτέλεσμα εξαλάτωσης. Για αυτόν τον λόγο προστέθηκε μια ελαφρώς υψηλότερη ποσότητα NaOAc (1,7 g) και στη συνέχεια επιτεύχθηκε ένα ικανοποιητικό αποτέλεσμα εξαλάτωσης διαχωρισμός των φάσεων, αυξάνοντας επίσης τις ανακτήσεις των αναλυτών. Οι χαμηλότερες ανακτήσεις που παρατηρήθηκαν προηγουμένως σε ορισμένες περιπτώσεις οφείλονταν πιθανώς στην οξύτητα του οίνου, καθώς η χαμηλή ποσότητα οξικού νατρίου μπορεί να οδηγήσει σε μη επαρκή ρύθμιση του pH του οίνου. Η ίδια τάση παρατηρήθηκε και αλλού για άλλα όξινα δείγματα, όπως ο χυμός πορτοκαλιού (Rizzeti et al., 2016).

3.2.2 Επιλογή προσροφητικών υλικών για την απομάκρυνση παρεμποδίζουσων – συνεκχυλιζόμενων ουσιών.

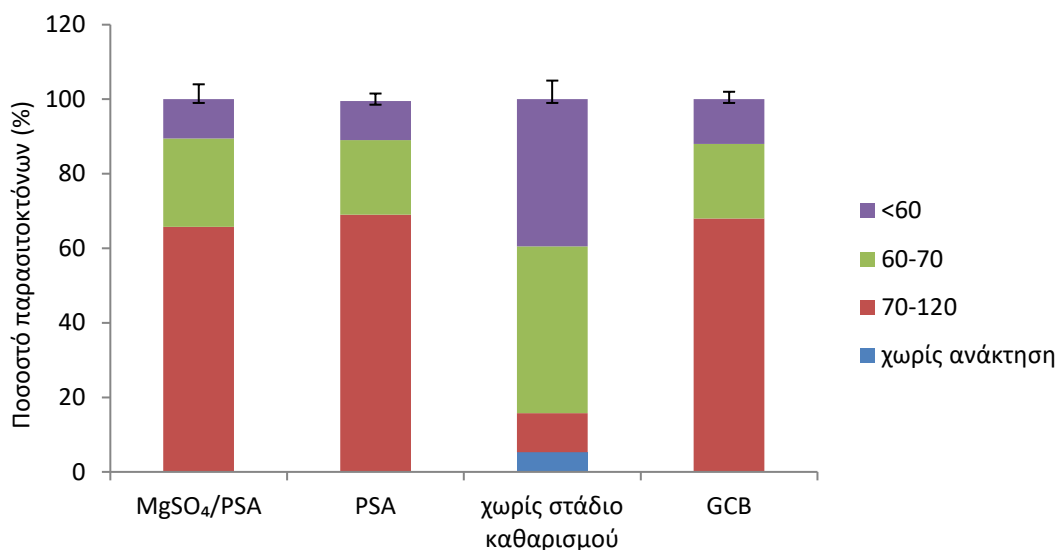
Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της οξινισμένης μεθόδου ως προς το στάδιο του καθαρισμού. Τα υλικά που δοκιμάστηκαν ήταν άνυδρο $MgSO_4$, PSA και GCB (μόνο στην περίπτωση του κόκκινου οίνου). Η πρωτοταγής-δευτεροταγής αμίνη (PSA) είναι ένα προσροφητικό υλικό με ικανότητα αφαίρεσης σακχάρων, οργανικών οξέων, λιπαρών οξέων και πολικών χρωστικών ουσιών, ενώ η χημική του δομή παρέχει υψηλό χηλικό αποτέλεσμα (Dias et al., 2016; Słowik-Borowiec, 2018). Το άνυδρο $MgSO_4$ μειώνει τον όγκο της υδατικής φάσης, ενώ ο γραφίτοποιημένος άνθρακας (GCB) απομακρύνει τις χρωστικές ουσίες, με το μειονέκτημα της αφαίρεσης παρασιτοκτόνων με επίπεδες δομές, με αποτέλεσμα χαμηλές ανακτήσεις σε παρασιτοκτόνα όπως το carbendazim και το cyprodinil (Nannou et al., 2018). Αξιολογήθηκαν οι ακόλουθες προσεγγίσεις σχετικά με το στάδιο καθαρισμού εκχυλισμάτων: (α) 25 mg PSA και 150 mg $MgSO_4$ και (β) 50 mg PSA, ενώ (γ) δοκιμάστηκαν επίσης εκχυλίσματα χωρίς καθαρισμό στον λευκό οίνο (Σχήμα 15).

Όπως φαίνεται και οι δύο προσεγγίσεις (α) και (β) καθαρισμού παρουσίασαν παρόμοιες ανακτήσεις. Το ποσοστό των παρασιτοκτόνων που παρουσίασαν <60% ανακτήσεις ήταν 11% του συνόλου των παρασιτοκτόνων και στις δύο προσεγγίσεις καθαρισμού (α) και (β), 24% και 21% των παρασιτοκτόνων παρουσίασαν ανακτήσεις 60-70% για (α) και (β) καθαρισμό αντίστοιχα, ενώ το 66% και 68% παρουσίασε ανακτήσεις 70-120% για (α) και (β) καθαρισμό. Η προσέγγιση (γ) παρείχε τις χαμηλότερες ανακτήσεις σε σύγκριση με τις δύο προηγούμενες προσεγγίσεις καθαρισμού. Το 84% του συνόλου των παρασιτοκτόνων στην προσέγγιση (γ) παρουσίασαν ανακτήσεις <70%.



Σχήμα 15: Ανάκτηση (%) που αποκτήθηκαν για διαφορετικά στάδια καθαρισμού. (α) MgSO₄ / PSA και (β) PSA και (γ) χωρίς καθαρισμό σε λευκό οίνο.

Στην περίπτωση του κόκκινου οίνου δοκιμάστηκαν επίσης και αξιολογήθηκαν οι ακόλουθες προσεγγίσεις σχετικά με το στάδιο καθαρισμού εκχυλισμάτων: (α) 25 mg PSA και 150 mg MgSO₄ και (β) 50 mg PSA, ενώ (γ) δοκιμάστηκαν επίσης εκχυλίσματα χωρίς καθαρισμό και (δ) 50 mg GCB. Οι ανακτήσεις που ελήφθησαν μετά τους παραπάνω συνδυασμούς για το κόκκινο οίνο ήταν παρόμοιες με εκείνες του λευκού οίνου. Επιπλέον, όσον αφορά τον κόκκινο οίνο, στις περιπτώσεις (α) και (β) η προσθήκη γραφίτοποιημένου άνθρακα (GCB) δεν προέβλεπε περαιτέρω απομάκρυνση χρωστικών, καθώς δύναται να αφαιρεθούν με την προσθήκη των υπόλοιπων προσροφητικών υλικών, προσεγγίσεις (α) και (β) (Σχήμα 16).



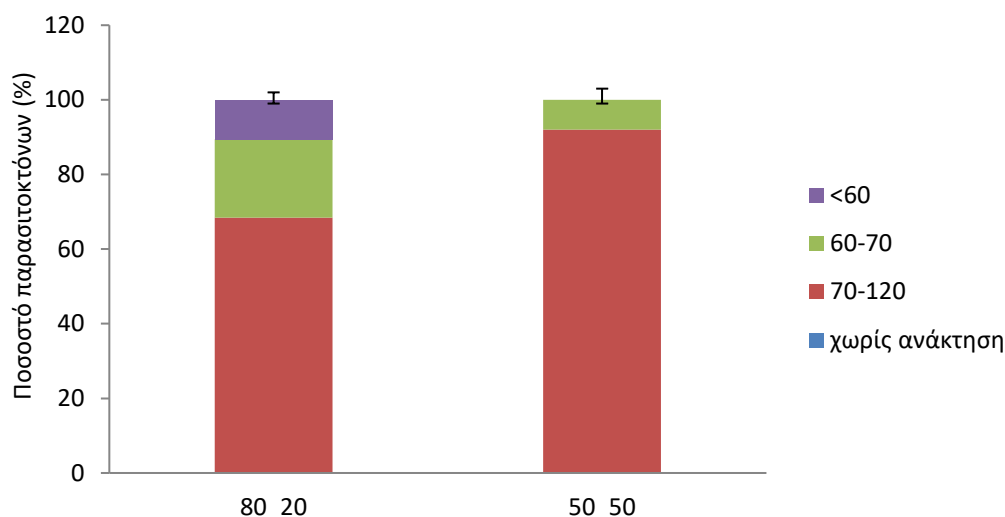
Σχήμα 16: Ανάκτηση (%) που αποκτήθηκαν για διαφορετικά στάδια καθαρισμού. (α) MgSO₄ / PSA και (β) PSA και (γ) χωρίς καθαρισμό και (δ) GCB σε κόκκινο οίνο.

Έτσι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και στις δύο περιπτώσεις (α) και (β) χρωστικές όπως ανθοκυανίνες στον κόκκινο οίνο και ενώσεις με κιτρινωπό χρώμα στο λευκό οίνο, μπορούν αποτελεσματικά να αφαιρεθούν (Whang and Cheung, 2016). Επιπλέον, η αποτελεσματικότητα του καθαρισμού επιβεβαιώθηκε επίσης λαμβάνοντας υπόψη την παρουσία κορυφών παρεμβολής (artifacts) στο χρωματογράφημα (Słowiak-Borowiec, 2018). Έτσι, τα εκχυλίσματα έχουν χαμηλότερο υπόβαθρο και παρέχουν καλύτερα χρωματογραφήματα με λιγότερες παρεμβολές μετά το βήμα του καθαρισμού. Λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω αποτελέσματα, καθώς και για λόγους μείωσης του κόστους αναλώσιμων και επίσης την απλούστευση της διαδικασίας εκχύλισης σε ανάλυση ρουτίνας, επιλέχθηκε το βήμα καθαρισμού (β) με 50 mg PSA, τόσο για τον λευκό όσο και για τον κόκκινο οίνο αντίστοιχα.

3.2.3 Βελτιστοποίηση του όγκου και διαλύτη τελικού δείγματος

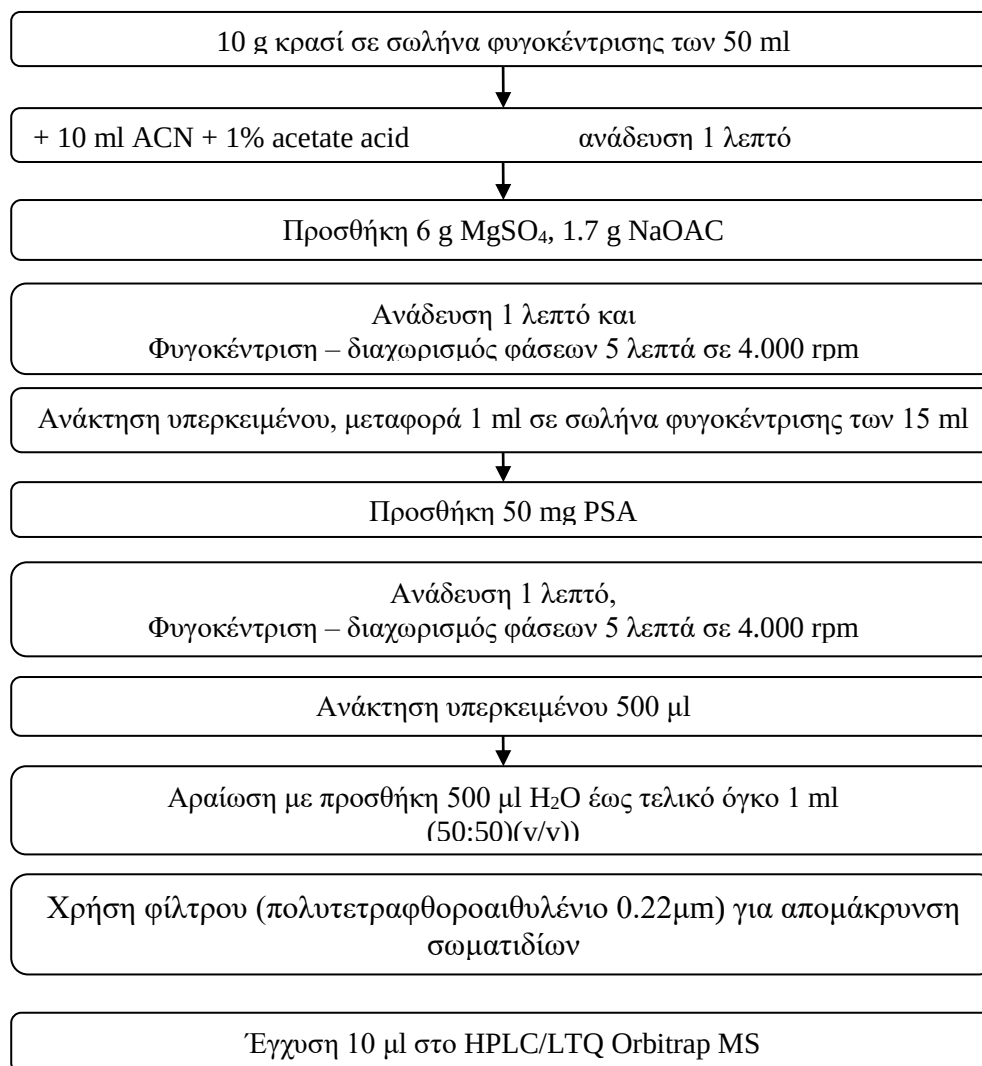
Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση του δείγματος μετά το στάδιο του καθαρισμού και αξιολογήθηκαν οι ακόλουθες προσεγγίσεις: (α) συμπύκνωση 1 mL υπερκείμενου σε ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιάλυση 1 mL, 800 μl υπερκαθαρού νερού και 200 μl υπερκείμενου (80:20), ενώ δοκιμάστηκε μετά το στάδιο του καθαρισμού (β) αραίωση του δείγματος, 500 μL του υπερκείμενου δείγματος αραιώθηκαν με 500 μL υπερκαθαρού νερού (Σχήμα 17). Το τελικό εκχύλισμα (1 mL) και για τις δύο προσεγγίσεις καθαρισμού μεταφέρθηκε για έγχυση στο LC-Orbitrap MS.

Το ποσοστό των παρασιτοκτόνων που παρουσίασαν <60% ανάκτηση ήταν 11% του συνόλου των παρασιτοκτόνων με την διαδικασία της συμπύκνωσης του δείγματος (α) και κανένα παρασιτοκτόνο με την διαδικασία της αραίωσης του δείγματος (β), 21% και 8% των παρασιτοκτόνων παρουσίασαν ανακτήσεις 60-70% για την (α) και (β) διαδικασία αντίστοιχα, ενώ το 68% και 92% παρουσίασε ανακτήσεις 70-120% για (α) και (β) διαδικασία. Έτσι, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι και στην περίπτωση (β) έχουμε καλύτερες ανακτήσεις στο σύνολο των αναλυτέων ενώσεων.



Σχήμα 17: Ανάκτηση (%) που αποκτήθηκαν για διαφορετικά στάδια επεξεργασίας τελικού δείγματος (α) συμπύκνωση 80:20 και (β) αραίωση 50:50 σε λευκό οίνο.

Ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανάλυση των παρασιτοκτόνων σε συστήματα φασματομετρίας μάζας όπως το LC-Orbitrap MS είναι η επίδραση της μήτρας που έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση ή την καταστολή του αναλυτικού σήματος. Η αραίωση του δείγματος μειώνει την επίδραση της μήτρας, επομένως και την έγχυση του μητρικού υλικού, επιτυγχάνοντας καλύτερα σήματα και σχήματα κορυφών (Rizzeti et al., 2016; Gómez-Ramos et al., 2015). Τα αποτελέσματα εμφάνισαν πολύ ικανοποιητικές ανακτήσεις και καθαρές κορυφές στα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Έτσι, τα δείγματα λευκού και κόκκινου οίνου αναλύθηκαν σύμφωνα με την προαναφερθείσα και βελτιστοποιημένη διαδικασία QuEChERS (Σχήμα 18).



Σχήμα 18: Τελικό πρωτόκολλο εκχύλισης δειγμάτων οίνου με την βελτιστοποιημένη μέθοδο QuEChERS

3.3 Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης UHPLC (LTQ) Orbitrap

Στην παρούσα έρευνα έγινε χρήση συστήματος υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης UHPLC με γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) και αναλυτή τροχιακής παγίδας Orbitrap της εταιρίας Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany). Στον Πίνακα 8 δίνονται οι τιμές των παραμέτρων που επιλέχθηκαν για την χρωματογραφική ανάλυση. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνει αντλία (Accela Pump Ser. No 750157) και θερμοστατούμενο σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη (Accela AS). Η αντλία παραγωγής αζώτου ήταν της εταιρίας Brezza-Claind (NiGen LCMS 40-1). Για τη

χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη hypersil Gold, 100 x 2.1 mm, 1.9 μm (Thermo).

Πίνακας 8: Οι συνθήκες των παραμέτρων που επιλέχθηκαν για την χρωματογραφική ανάλυση.

Παράμετροι	Τιμές
Πλήρης σάρωση (Full scan)	Εύρος μαζών 120-1000 Da
Δυναμικό εκνέφωσης (Spray voltage)	3.7 kV
Διακριτική ικανότητα (Resolution)	60.000 FWHM
Ροή αερίου (sheath gas)	40 au
Ροή βοηθητικού αερίου αποδιαλύτωσης (auxiliary gas flow)	15 au
Θερμοκρασία τριχοειδούς σωλήνα μεταφοράς ιόντων (capillary temperature)	320 °C
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	250 μl min ⁻¹
Δυναμικό πρόσκρουσης (collision energy)	45 Ev
Σχετικό σφάλμα μάζας m/z (mass tolerance)	< 5 ppm
Λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων	Thermo Xcalibur 2.1

Η ανίχνευση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο του θετικού ιοντισμού και καταγραφή των ψευδο-μοριακών ιόντων $[M + H]^+$ λαμβάνοντας υπόψη την υπολογιζόμενη ακριβή μάζα, με σφάλμα μάζας < 5 ppm καθώς και το χρόνο κατακράτησης (ο αναλύτης στο εκχύλισμα και στο πρότυπο με ανοχή $\pm 0,1$ λεπτά) (SANTE/11813/2017; SANTE/12682/2019). Για περαιτέρω επιβεβαίωση επιτεύχθηκε η καταγραφή των χαρακτηριστικών θυγατρικών ιόντων θραυσματοποίησης των ψευδομοριακών ιοντών με ακρίβεια μάζας τεσσάρων δεκαδικών και σχετικό σφάλμα μάζας <5 ppm (Πίνακας 10). Για το διαχωρισμό των ουσιών στον θετικό ιοντισμό χρησιμοποιήθηκε σύστημα βαθμωτής έκλουσης (gradient elution) με μίγμα διαλυτών A (νερό LC-MS με 0,1 % φορμικό οξύ) και B (μεθανόλη LC-MS με 0,1 % φορμικό οξύ) με ταχύτητα ροής 0,45 mL/min (Πίνακας 9).

Ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 10 μL και η θερμοκρασία του φούρνου ήταν στους 35 °C.

Πίνακας 9: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης για τον θετικό ιοντισμό στο σύστημα UHPLC/LTQ-ORBITRAP

Χρόνος(min)	Διαλύτες έκλουσης (ΘΙ)	
	Νερό LC-MS +0,1% φορμικό οξύ	Μεθανόλη LC-MS +0,1% φορμικό οξύ
0	70	30
1	70	30
2	30	70
5	0	100
7	0	100
7.1	70	30
10	70	30

Η σύνθεση της κινητής φάσης σχετίζεται στενά με τη χρωματογραφική ανάλυση και την αποτελεσματικότητα ιοντισμού των ενώσεων - στόχων. Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της κινητής φάσης. Στους διαλύτες έκλουσης MeOH και νερό προστέθηκε 0,1% μυρμηγκικό οξύ, και στη δεύτερη περίπτωση έγινε προσθήκη 0,1% μυρμηγκικό οξύ και 5 mM μυρμηγκικού αμμωνίου και στις δύο φάσεις. Τα αποτελέσματα ήταν παρόμοια και στις δύο περιπτώσεις, με την προσθήκη μόνο 0,1% φορμικό οξύ να παρέχει στο 15% των αναλυτών καλύτερη ένταση σήματος.

Στη συνέχεια, ορισμένες παράμετροι ESI αξιολογήθηκαν και μελετήθηκαν με στόχο να ευνοήσουν τον ιοντισμό των αναλυτών - στόχων, συμπεριλαμβανομένων της ροής αερίου θήκης, της θερμοκρασίας τριχοειδούς σωλήνα μεταφοράς ιόντων (capillary temperature). Δοκιμάστηκαν τιμές ροής αερίου (sheath gas) μεταξύ 10 και 50 au, με τη τιμή 40 au να παρουσιάζει τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ένταση του σήματος. Η θερμοκρασία τριχοειδούς σωλήνα μεταφοράς ιόντων δοκιμάστηκε μεταξύ 300 και 380 °C και ελήφθησαν τα βέλτιστα αποτελέσματα για 320 °C. Τέλος, οι τιμές των δυναμικών των φακών του πεδίου επιτάχυνσης που δοκιμάστηκαν ήταν 70, 90 και 110 V και τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν με 90 V.

Επιπλέον αξιολογήθηκαν οι παράμετροι που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα ανίχνευσης ενώσεων στον αναλυτή μαζών Orbitrap, όπως η διακριτική ικανότητα και η ροή ιόντων - AGC. Η υψηλή διακριτική ικανότητα είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό σημάτων μιας ένωσης από αυτά μιας άλλης και διασφαλίζει ότι τα ιόντα μίας μόνο ένωσης συμβάλλουν σε μία συγκεκριμένη μέτρηση. Η διακριτική ικανότητα (Resolution) δοκιμάστηκε σε 15.000, 30.000, 60.000, και 100.000 FWHM και επιλέχθηκε η τιμή 60.000 FWHM για λόγους καλύτερης σάρωσης των αντίστοιχων ιόντων. Η AGC παρέχει αυτοματοποιημένη ρύθμιση της ροής ιόντων που μεταδίδεται από την πηγή ιόντων του

οργάνου με αποτέλεσμα έναν σταθερό αριθμό ιόντων στον αναλυτή μάζας Orbitrap. Αυτός ο έλεγχος πληθυσμού ιόντων είναι σημαντικός για την απόδοση του αναλυτή. Δοκιμάστηκαν τέσσερις ρυθμίσεις στόχου AGC 3×10^5 , 4×10^5 , 5×10^5 και 10^6 , με την τιμή 4×10^5 να παρέχει την καλύτερη ένταση σήματος για όλες τις στοχευόμενες ενώσεις. Όσον αφορά την πλήρη σάρωση (dd – MS²) με τεχνική διάσπασης CID, το δυναμικό πρόσκρουσης (collision energy - NCE) 45% επιλέχθηκε μετά από πολλά πειράματα βελτιστοποίησης σε εύρος 20-50% NCE.

Πίνακας 10: Χρόνοι κατακράτησης (t_R), θεωρητικές και πειραματικές μάζες, σχετικό σφάλμα μαζών (Mass Accuracy) και αριθμός ισοδυνάμων διπλών δεσμών και δακτυλίων (Ring Double Bond equivalents, RDBE) των ψευδο-μοριακών ιόντων, θυγατρικών ιόντων (Frangmentation ions) κατά τον θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων στο σύστημα UHPLC/LTQ-ORBITRAP.

Παρασιτοκτόνα	Χρήση*	t_R (min)	Μοριακός τύπος $[M+H]^+$	Θεωρητική μάζα (m/z)	Πειραματική μάζα (m/z)	Σχετικό σφάλμα μαζών(Δppm)	RDBE	Θυγατρικά ιόντα 45 % NCE**
Acetamiprid	In	3.53	$C_{10}H_{12}ClN_4$	223.0745	223.0743	-0.9	6.5	126.0102/ 187.0972/ 196.0627
Azinphos-methyl	In	4.77	$C_{10}H_{13}N_3O_3PS_2$	318.0130	318.0135	1.429	6.5	261.1306
Azoxystrobin	Fu	4.78	$C_{22}H_{18}N_3O_5$	404.1240	404.1245	0.997	15.5	372.0974
Benalaxyl	Fu	5.67	$C_{20}H_{24}NO_3$	326.1751	326.1751	0.092	9.5	148.1119/ 208.1331
Boscalid	Fu	4.97	$C_{18}H_{13}Cl_2N_2O$	343.0399	343.0401	0.452	12.5	307.0626/ 139.9898
Bupirimate	Fu	4.97	$C_{13}H_{25}N_4O_3S$	317.1642	317.1644	0.669	3.5	166.0973/ 237.2070
Carbendazim	Fu	1.70	$C_9H_{10}N_3O_2$	192.0767	192.0768	0.244	6.5	160.0505/ 132.0556
Chlorpyrifos	In	6.60	$C_9H_{12}Cl_3NO_3PS$	349.9336	349.9335	-0.172	3.5	197.9273/ 321.9016
Chlorpyrifos-methyl	In	6.02	$C_7H_8Cl_3NO_3PS$	321.9023	321.9025	0.746	3.5	124.9821
Clofentezine	In	5.83	$C_{14}H_9Cl_2N_4$	303.0199	303.0198	-0.258	11.5	138.0103
Coumaphos	In	5.62	$C_{14}H_{17}ClO_5PS$	363.0217	363.0216	-0.372	6.5	307.0485
Cymoxanil	Fu	3.69	$C_7H_{11}N_4O_3$	199.0826	199.0827	0.669	4.5	128.0462
Cyprodinil	Fu	5.11	$C_{14}H_{16}N_3$	226.1339	226.1342	1.441	8.5	210.1024/ 185.1074/ 144.0806/ 133.0757/ 108.0802
Diazinon	In	5.68	$C_{12}H_{22}N_2O_3PS$	305.1083	305.1085	0.569	3.5	169.0789/ 153.1021
Dichlorvos	In	4.26	$C_4H_8Cl_2O_4P$	220.9532	220.9533	0.556	0.5	144.9813/ 127.0151/ 109.0045
Difenoconazole	Fu	6.00	$C_{19}H_{18}Cl_2N_3O_3$	406.0720	406.0719	-0.181	11.5	251.0019/ 291.0325
Dimethoate	In	3.53	$C_5H_{13}NO_3PS_2$	230.0069	230.0067	-0.859	0.5	170.9697

Ethion	In	6.46	C ₉ H ₂₃ O ₄ P ₂ S ₄	384.9949	384.9949	0.022	-0.5	97.8836
Fenbuconazole	Fu	5.36	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₄	337.1215	337.1216	0.442	12.5	194.0476/ 125.0149
Fenthion	In	5.65	C ₁₀ H ₁₆ O ₃ PS ₂	279.0273	279.0275	0.721	3.5	231.0232/ 149.0231
Fenthion sulfoxide	In	4.32	C ₁₀ H ₁₆ O ₄ PS ₂	295.0222	295.0223	0.294	3.5	264.0033/ 201.0400/ 279.9983
Fluazifop-p-butyl	He	6.22	C ₁₉ H ₂₁ F ₃ NO ₄	384.1417	384.1418	0.21	8.5	282.0734/ 328.0788
Imidacloprid	In	3.08	C ₉ H ₁₁ ClN ₅ O ₂	256.0595	256.0596	0.083	6.5	175.0976/ 209.0587
Iprovalicarb	Fu	5.20	C ₁₈ H ₂₉ N ₂ O ₃	321.2172	321.2174	0.407	5.5	119.0851
Metalaxyl	Fu	4.60	C ₁₅ H ₂₂ NO ₄	280.1543	280.1544	0.233	5.5	248.1281/ 220.1332
Methoxyfenozide	In	5.05	C ₂₂ H ₂₉ N ₂ O ₃	369.2172	369.2172	-0.188	9.5	313.1545
Myclobutanil	Fu	5.15	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₄	289.1215	289.1217	0.862	8.5	220.0882/ 125.0148
Phosalone	In	5.80	C ₁₂ H ₁₆ ClNO ₄ PS ₂	367.9941	367.9939	-0.652	5.5	182.0003
Pyraclostrobin	Fu	5.68	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₃ O ₄	388.1058	388.1056	-0.671	11.5	163.0836
Pyriproxyfen	In	6.43	C ₂₀ H ₂₀ NO ₃	322.1438	322.1441	1.024	11.5	227.1064/ 96.0439
Quizalop-p-ethyl	He	6.22	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₂ O ₄	373.0949	373.0954	1.176	11.5	299.0582
Rimsulfuron	He	4.33	C ₁₄ H ₁₈ N ₅ O ₇ S ₂	432.0642	432.0643	0.195	8.5	182.0560/ 325.0962
Tebuconazole	Fu	5.64	C ₁₆ H ₂₃ ClN ₃ O	308.1524	308.1523	-0.378	6.5	151.0306/ 290.1402
Terbufos	In	6.37	C ₉ H ₂₂ O ₂ PS ₃	289.0514	289.0516	0.674	-0.5	232.9881
Thiacloprid	In	3.78	C ₁₀ H ₁₀ ClN ₄ S	253.0309	253.0309	-0.084	7.5	126.0102
Thiamethoxam	In	2.17	C ₈ H ₁₁ ClN ₅ O ₃ S	292.0266	292.0265	-0.22	5.5	180.9578/ 139.0325
Triadimenol	Fu	5.23	C ₁₄ H ₁₉ ClN ₃ O ₂	296.1160	296.1162	0.57	6.5	227.0836
Trifloxystrobin	Fu	6.00	C ₂₀ H ₂₀ F ₃ N ₂ O ₄	409.1369	409.1368	-0.411	10.5	186.0524/ 206.0810

*In – εντομοκτόνο *He – ζιζανιοκτόνο *Fu - μυκητοκτόνο

** NCE (Normalized Collision Energy) – ενέργεια σύγκρουσης

3.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε οίνο

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των παρασιτοκτόνων στον οίνο πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου (quality control) που ορίζει η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης στην Κοινοτική Απόφαση SANTE/11813/2017 και SANTE/12682/2019. Έτσι, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών που προσδιορίστηκαν στο UHPLC/LTQ ORBITRAP πραγματοποιήθηκε ως εξής:

- Το χρόνο κατακράτησης (RT) των πρότυπων ουσιών, με το χρόνο κατακράτησης των ουσιών που προσδιορίστηκαν στο εκάστοτε δείγμα ($\pm 2,5$ %).
- Με βάση την ακριβή μάζα των ψευδο-μοριακών ιόντων, σε σχέση με την πρότυπη ουσία (ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών) και σχετικό σφάλμα μάζας $< 5\text{ppm}$.
- Με βάση την ακριβή μάζα των θυγατρικών ιόντων MS^2 , σε σχέση με αυτά της πρότυπης ουσίας (ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών) και σχετικό σφάλμα μάζας $< 5\text{ppm}$.

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπυλών βαθμονόμησης. Αρχικά, υπολογίζεται η γραμμική εξίσωση βαθμονόμησης με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων:

$$y = a + bx$$

Όπου

y = Αναλυτικό σήμα,

x = Συγκέντρωση ουσίας,

a = Τομή στον άξονα των y και

b = Κλίση της ευθείας

και τελικά η συγκέντρωση της ουσίας υπολογίζεται από τη σχέση:

$$x = (y - a)/b$$

Η καλύτερη προσαρμογή μίας ευθείας γραμμής σε αυτές τις τιμές μπορεί να προσδιοριστεί υπολογίζοντας τα a και b από τις ακόλουθες εξισώσεις:

$$b = \frac{\sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} = \frac{\sum y_i \sum x_i^2 - \sum x_i \sum y_i x_i}{n \sum x_i^2 - (\sum x_i)^2}$$

Με βάση τις υπολογισθείσες τιμές των συντελεστών a και b χαράζουμε καμπύλη, γνωστή ως ευθεία παλινδρομήσεως, που παρέχει την άριστη γραμμική προσαρμογή των σημείων. Το μέτρο της καλής προσαρμογής μεταξύ των δύο μεταβλητών, x και y , δίνεται από το συντελεστή συσχέτισεως (correlation coefficient - r^2), όπου:

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}}$$

Μια καμπύλη βαθμονόμησης θεωρείται ικανοποιητική για τιμές r^2 κοντά στο 1 και υποδηλώνει πολύ καλή γραμμικότητα της μεθόδου εφόσον το r^2 παρουσιάζει τιμές >0.99 . Η επικύρωση της μεθόδου αναφέρεται στην επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι η μέθοδος ικανοποιεί τις ιδιαίτερες απαιτήσεις για τη συγκεκριμένη, σκοπούμενη χρήση. Κατά την επικύρωση της μεθόδου για τον προσδιορισμό παρασιτοκτόνων μελετήθηκαν οι εξής παράγοντες ποιότητας της μεθόδου: γραμμικότητα (linearity), πιστότητα (precision) υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (repeatability) και αναπαραγωγιμότητας (reproducibility), ακρίβεια (accuracy), όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD), όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ), επίδραση της μήτρας, διευρυμένη αβεβαιότητα της μεθόδου, καθώς και την τιμή του λόγου HorRat.

3.4.1 Επίδραση της μήτρας

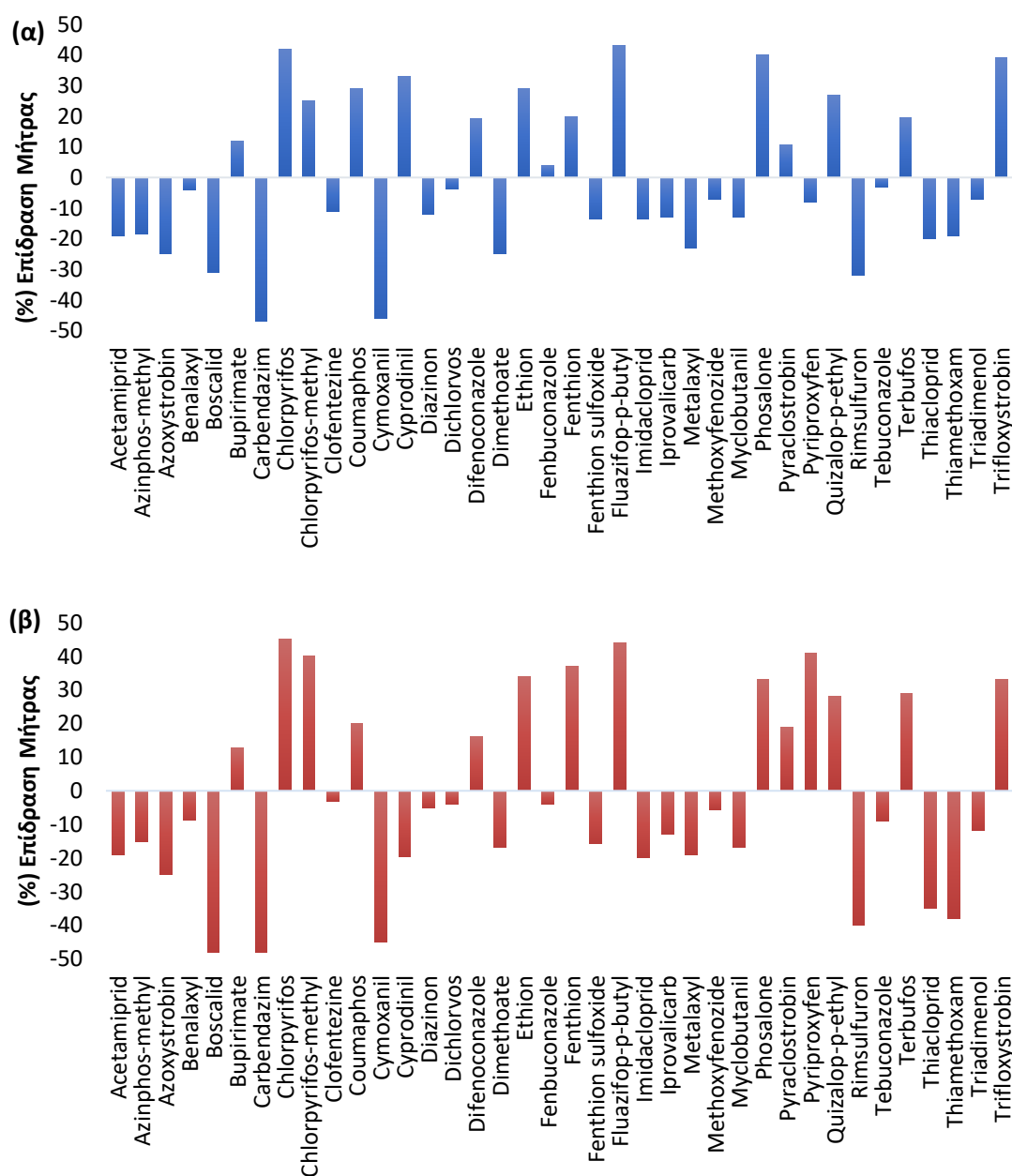
Για την αξιολόγηση της επίδρασης μήτρας (ME) παρασκευάστηκε μια καμπύλη βαθμονόμησης σε μήτρα οίνου και συγκρίθηκε με ένα άλλο παρασκευασμένο στο μείγμα διαλύτη, στο ίδιο εύρος συγκέντρωσης (1 - 750 $\mu\text{g/Kg}$), χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα κενό εκχύλισμα σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Οι υπολογισμοί βασίστηκαν στην ακόλουθη εξίσωση:

$$\text{ME (\%)} = [(\text{κλίση ευθείας στο εκχύλισμα} / \text{κλίση ευθείας στο διαλύτη}) - 1] * 100$$

Τιμές της ME μεταξύ 20% και -20% αντιστοιχεί σε χαμηλή επίδραση μήτρας, τιμές μεταξύ -50% και -20% ή μεταξύ 20% και 50% αντιστοιχούν σε μία μέση επίδραση

μήτρας, και τιμές μικρότερες από -50% ή υψηλότερες από 50% αντιστοιχούν σε υψηλή επίδραση μήτρας (Nannou et al., 2018).

Παρακάτω φαίνεται (Σχήμα 19) η επίδραση μήτρας, η οποία αξιολογείται ως καταστολή ή ενίσχυση σήματος για λευκό και κόκκινο οίνο.



Σχήμα 19: Επίδραση της μήτρας – υποστρώματος (%ME) σε λευκό (α) και κόκκινο οίνο (β) αντίστοιχα.

Τόσο στο λευκό όσο και στο κόκκινο οίνο, περίπου το 61% των ενώσεων παρουσίασαν αρνητικά αποτελέσματα μήτρας, αποδεικνύοντας ότι τα συστατικά της μήτρας μπορούν να επηρεάσουν αυτές τις ενώσεις μειώνοντας την απόκριση (σήμα) στην οργανολογία (Dias et al., 2019). Και στους δύο τύπους οίνου, οι περισσότερες από τις ενώσεις (22 και 21 ενώσεις σε λευκό και κόκκινο οίνο, αντίστοιχα) παρουσίαζαν φαινόμενο χαμηλής επίδρασης μήτρας (μεταξύ -3 και 20%) και οι υπόλοιπες ενώσεις παρουσίαζαν μεσαία επίδραση μήτρας (16 και 17 ενώσεις σε λευκό και κόκκινο οίνο, αντίστοιχα). Τα υψηλότερα αποτελέσματα της μήτρας βρέθηκαν στον λευκό οίνο για το carbendazim με -47% και το fluazifor p-butyl με 43%, ενώ για τον κόκκινο οίνο για το carbendazim με -48% και το chlorpyrifos με -45%. Προηγούμενη μελέτη έχει αναφέρει ισχυρή καταστολή σήματος για το carbendazim (-55%) (Ferreira et al., 2015). Συμπερασματικά, τα ποσοστά επίδρασης μήτρας, υπογραμμίζουν τη σημασία της χρήσης καμπυλών βαθμονόμησης που αντιστοιχούν στη μήτρα για να ξεπεραστούν τα προβλήματα ακρίβειας ποσοτικοποίησης σε ένα μόνο βήμα.

3.4.2 Επικύρωση γραμμικότητας με πρότυπα διαλύματα

Για την διαδικασία επικύρωσης με πρότυπα διαλύματα χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα μίγματος όλων των παρασιτοκτόνων προκειμένου να κατασκευασθούν καμπύλες βαθμονόμησης προτύπων και να ελεγχθεί η γραμμικότητα (r^2) του οργάνου. Για την κατασκευή των καμπυλών εμβολιασμένων προτύπων χρησιμοποιήθηκαν τα εμβολιασμένα πρότυπα σε διαλύτη με αναλογία ($80_{H_2O}:20_{MeOH}$). Η καμπύλη εμβολιασμένων προτύπων έγινε με συγκεντρώσεις 1, 2,5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 $\mu\text{g/kg}$ μίγματος παρασιτοκτόνων. Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προσομοίωσης του υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 1 - 750 $\mu\text{g/kg}$. Η γραμμικότητα του οργάνου r^2 είναι $>0,99$ % για όλες τις ενώσεις των παρασιτοκτόνων (Πίνακας 11).

Πίνακας 11: Επικύρωση της γραμμικότητας με πρότυπα διαλύματα

Παρασιτοκτόνα	Εύρος συγκεντρώσεων	Καμπύλη βαθμονόμησης	r ²
Acetamiprid	1-750	Y=-423.473+69.776x	0.9955
Azoxystrobin	1-750	Y=-861.902+120.608x	0.9941
Azinphos-methyl	5-750	Y=-174.020+9.760,41x	0.9934
Benalaxyl	1-750	Y=-739.392+116.386x	0.9938
Bupirimate	1-750	Y=558.737+387.170x	0.9922
Boscalid	1-750	Y=-427.399+3.648,9x	0.9914
Carbendazim	2.5-750	Y=-430626+47.246,8x	0.9946
Chlorpyrifos	10-750	Y=-228.155+10.737,4x	0.9963
Chlorpyrifos-methyl	10-750	Y=-126.382+5.725,81x	0.9966
Cyprodinil	1-750	Y=-4.190,51+310.140x	0.9928
Cymoxanil	2.5-750	Y=-107215e+41.459x	0.9907
Coumaphos	2.5-750	Y=-265.455+28.605,9x	0.9930
Clofentezine	25-750	Y=-225.961+4.218,52x	0.9968
Dimethoate	2.5-750	Y=-290.745+64.960,6x	0.9977
Diazinon	1-750	Y=211332e+348.563x	0.9951
Dichlorvos	1-750	Y=-444.909+70.146,8x	0.9969
Difenoconazole	1-750	Y=-738.286+92.756,2x	0.9941
Ethion	1-750	Y=-235.347+24.304,7x	0.9952
Fenthion	2.5-750	Y=-184.022+15.534,9x	0.9927
Fenthion sulfoxide	1-750	Y=-724.578+149.839x	0.9948
Fenbuconazole	1-750	Y=-865.581+108.554x	0.9948
Fluazifop-p-butyl	2,5-750	Y=-890.070+77.455,4x	0.9914
Imidacloprid	2,5-750	Y=-523.242+39.762,2x	0.9940
Iprovalicarb	1-750	Y=-10331e+006+127.517x	0.9945
Methoxyfenozone	1-750	Y=-247.170+49.132,5x	0.9928
Metalaxyl	1-750	Y=-980.119+155.267x	0.9958
Myclobutanil	1-750	Y=-113017e+0.06+146.567x	0.9943
Pyraclostrobin	2.5-750	Y=-209.052+35.413x	0.9924
Pyriproxyfen	5-750	Y=-1.35025e+006+134.538x	0.9959
Phosalone	2,5-750	Y=-200.260+19.275x	0.9910
Quizalop-p-ethyl	2.5-750	Y=-502770+45.485,9x	0.9903
Rimsulfuron	5-750	Y=-451.612+14.477,5x	0.9915
Thiacloprid	1-750	Y=-280.244+48.532x	0.9951
Thiamethoxam	10-750	Y=-613.523+27.590x	0.9944
Terbufos	2.5-750	Y=-289.792+7.534,28x	0.9908
Tebuconazole	1-750	Y=-481.783+147.972x	0.9962
Triadimenol mix.	1-750	Y=-349.202+95.839,9x	0.9926
Trifloxystrobin	2.5-750	Y=-363.074+58.771,7x	0.9938

3.4.3 Ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου σε δείγματα οίνου

Για την κατασκευή των καμπυλών μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν τα εμβολιασμένα δείγματα οίνου σε συγκεντρώσεις 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 µg/kg μίγματος παρασιτοκτόνων. Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προσομοίωσης του υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 1 - 750 µg/kg. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των παρασιτοκτόνων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τυποποιημένες καμπύλες βαθμονόμησης που αντιστοιχούν σε μήτρα οίνου παρασκευασμένες σε 50:50 (v/v) (ACN:H₂O). Έγινε χρήση βιολογικού δείγματος λευκού και κόκκινου οίνου, παρασκευασμένο σε 50:50 (v/v) (ACN:H₂O), προκειμένου να διασφαλιστεί ότι η μήτρα είναι απαλλαγμένη από τους αναλύτες - στόχους. Η επικύρωση της μεθόδου ως προς την γραμμικότητα (r^2), τα όρια ανίχνευσης (LODs), τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQs), μέσες ανακτήσεις (REC) (%) και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) (%) τριών διαφορετικών επιπέδων ($n = 6$) που μελετήθηκαν για την ίδια ημέρα (intra-day) και σε διαφορετικές ημέρες (inter-day), καθώς και μέγιστα επίπεδα υπολειμάτων (MRL), παρασιτοκτόνων σε λευκό και κόκκινο οίνο παρουσιάζονται στους Πίνακες 12 και 13, αντίστοιχα.

Η γραμμικότητα της μεθόδου υπολογίστηκε με τον συντελεστή παλινδρόμησης, r^2 .

Η ορθότητα υπολογίζεται με την μέση ανάκτηση (Rec %) κάθε ένωσης και πρέπει να κυμαίνεται από 70-120 %, ενώ οι ανακτήσεις δεν πρέπει να είναι <30% και >140% για να θεωρείται ορθή η μέθοδος. Η ορθότητα ορίζεται ως η εγγύτητα μεταξύ της τιμής του μέσου όρου πειραματικών μετρήσεων ($n=6$) και της αποδεκτής τιμής αναφοράς (SANTE, 2019).

Η πιστότητα υπολογίζεται ως η σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων μιας σειράς μετρήσεων (RSD) $n=6$, τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, όσο και υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, η οποία πρέπει να είναι μικρότερη του 20 %. Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, 10, 100 και 500 µg/kg. Η σχετική τυπική απόκλιση δίνεται από τον τύπο:

$$RSD \% = (SDV / M.O(Rec)) * 100$$

όπου SDV η απόλυτη τιμή της τυπικής απόκλισης του δείγματος και M.O(Rec), η τιμή της μέσης τιμής των πειραματικών μετρήσεων ($n=6$).

Για την αναπαραγωγιμότητα έγιναν έξι επαναληπτικά δείγματα, τα οποία εγχύθηκαν στο LC-MS-Orbitrap σύστημα κατά την ίδια εργαστηριακή ημέρα. Για τον υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας επαναλήφθηκε η διαδικασία για έξι δείγματα, τα οποία αναλύθηκαν σε διαφορετικές ημέρες (SANTE, 2019). Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD) πρέπει να είναι $\leq 20\%$ για όλες τις περιπτώσεις των αναλυτέων ενώσεων (SANTE 2019).

Τα όρια ανίχνευσης (LODs) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQs) καθορίστηκαν ως η ελάχιστη συγκέντρωση αναλυτών σε εκχυλισμένα δείγματα, έπειτα από την εκχύλιση QuEChERS, παρέχει αναλογία σήματος προς θόρυβο (S/N) ≥ 3 και ≥ 10 , αντίστοιχα.

Σύμφωνα με το κανονισμό N° SANTE/12682/2019 το όριο ποσοτικοποίησης LOQ επιβάλλεται να είναι μικρότερο ή και ίσο με τα ανώτερα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων (MRL) σε δείγμα. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση:

$$\text{LOQ} = 10 * \text{SDV}$$

και το όριο ανίχνευσης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\text{LOD} = 3.3 * \text{SDV}, \text{ όπου SDV η απόλυτη τιμή της τυπικής απόκλισης τυφλού δείγματος.}$$

Πίνακας 12: Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου: Γραμμικότητα (Linearity (r^2)), Όρια ανίχνευσης (LODs), όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), μέσες ανακτήσεις (REC) (%) και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) (%) τριών διαφορετικών επιπέδων ($n = 6$) που μελετήθηκαν για την ίδια ημέρα και σε διαφορετικές ημέρες, καθώς και μέγιστα επίπεδα υπολειμμάτων (MRL), για υπολείμματα παρασιτοκτόνων σε λευκό οίνο.

Παρασιτοκτόνα	Γραμμικότητα (r^2)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	MRL (mg/Kg)	Ανακτήσεις και σχετικές τυπικές αποκλίσεις ($n=6$)											
					Ενδο-ημερήσια						Δια-ημερήσια					
					10 μg/Kg		100 μg/Kg		500 μg/Kg		10 μg/Kg		100 μg/Kg		500 μg/Kg	
					% Rec	RSD _r %	% Rec	RSD _r %	% Rec	RSD _r %	% Rec	RSD _R %	% Rec	RSD _R %	% Rec	RSD _R %
Acetamiprid	0.9985	15.0	50.0	0.5			95.0	5.5	96.5	3.0			98.0	3.3	81.0	3.6
Azinphos-methyl	0.9922	6.1	20.0	0.05			92.0	6.1	96.0	4.5			106.0	3.3	97.0	3.7
Azoxystrobin	0.9980	0.8	2.5	3.0	114.0	3.8	102.0	4.5	111.0	2.7	109.0	3.2	101.0	2.1	93.0	3.0
Benalaxyl	0.9995	0.9	3.0	0.3	112.0	7.5	100.0	7.3	111.2	3.8	114.4	2.0	98.0	3.2	88.0	3.4
Boscalid	0.9994	2.7	9.0	5.0	120.0	3.7	92.0	7.7	107.0	2.5	103.6	3.2	97.0	5.0	90.0	5.1
Bupirimate	0.9951	1.5	5.0	1.5	118.4	4.6	104.0	4.5	118.0	4.2	117.4	2.8	97.0	4.5	112.0	4.5
Carbendazim	0.9978	21.5	72.0	0.5			78.5	6.8	106.2	3.5			74.5	5.8	91.5	2.3
Chlorpyrifos	0.9968	2.7	9.0	0.01	109.2	4.3	89.0	4.7	104.0	2.7	117.4	2.3	85.0	4.8	77.0	4.6
Chlorpyrifos-methyl	0.9966	7.5	25.0	0.01			102.0	2.6	104.0	2.9			87.0	4.2	85.0	2.8
Clofentezine	0.9954	19.0	63.0	1.0			111.0	7.7	92.0	7.5			99.0	5.6	109.0	4.9
Coumaphos	0.9996	1.5	5.0	0.1	122.0	1.9	98.0	6.0	116.0	4.4	112.4	4.7	87.0	4.5	83.0	3.3
Cymoxanil	0.9969	15.0	50.0	0.3			102.0	6.5	106.0	5.3			119.6	2.9	83.0	2.8
Cyprodinil	0.9923	1.5	5.0	3.0	120.0	2.2	114.0	6.9	121.0	0.9	89.4	6.4	102.5	2.4	99.8	3.5
Diazinon	0.9924	1.5	5.0	0.01	121.0	1.7	120.0	3.1	119.0	1.3	115.8	7.2	104.0	4.0	110.0	4.4
Dichlorvos	0.9996	1.5	5.0	0.01	114.0	4.3	107.0	1.3	104.0	2.3	103.8	2.8	93.0	2.5	84.0	2.3
Difenoconazole	0.9984	1.5	5.0	3.0	121.0	1.1	107.0	3.7	106.0	2.6	107.8	2.3	106.0	4.5	96.0	5.1
Dimethoate	0.9989	2.7	9.0	0.01	117.6	4.8	102.0	3.5	106.0	2.2	108.0	8.0	115.0	3.4	89.5	5.7
Ethion	0.9974	1.5	5.0	0.01	121.0	2.8	102.0	7.4	110.0	2.6	111.0	2.6	104.0	3.0	101.0	2.9

Fenbuconazole	0.9997	1.5	5.0	1.0	119.0	2.9	98.0	3.7	106.0	3.6	116.0	3.8	92.0	3.0	86.0	4.1
Fenthion	0.9923	2.5	8.0	0.01	100.0	7.0	112.0	3.8	119.0	1.1	109.0	4.3	107.0	2.4	100.0	4.2
Fenthion sulfoxide	0.9998	1.5	5.0	0.01	106.0	6.5	96.0	4.7	99.0	3.3	103.0	2.8	81.0	1.7	76.0	3.6
Fluazifop-p- butyl	0.9968	0.7	2.5	0.01	71.2	1.6	120.0	1.8	119.0	1.1	93.6	4.0	89.5	5.7	119.0	3.0
Imidacloprid	0.9964	15.3	51.0	1.0					96.0	2.7					80.0	2.3
Iprovalicarb	0.9996	1.5	5.0	2.0	108.0	7.3	100.0	4.8	108.0	3.6	115.0	1.6	89.0	4.8	85.0	3.7
Metalaxyl	0.9985	1.5	5.0	1.0	118.0	4.5	106.0	3.4	108.0	3.5	89.0	6.7	95.0	3.6	87.0	4.2
Methoxyfenozid e	0.9921	2.5	8.0	1.0	115.6	5.9	119.0	1.2	118.0	3.5	104.0	2.8	107.0	3.0	101.0	5.1
Myclobutanil	0.9994	3.0	10.0	1.0			95.0	5.8	110.0	2.8	115.6		92.5	2.3	89.0	3.5
Phosalone	0.9992	2.5	8.0	0.01	107.0	5.1	107.0	6.3	121.0	1.2	88.8	7.1	106.0	2.1	105.0	2.6
Pyraclostrobin	0.9992	1.5	5.0	2.0	118.0	6.3	104.0	7.0	107.0	4.0	114.2	2.7	103.0	5.3	89.0	5.3
Pyriproxyfen	0.9985	0.9	3.0	0.05	120.4	2.5	93.0	4.5	88.0	2.7	108.2	6.7	95.0	7.4	93.0	3.1
Quizalop-p-ethyl	0.9929	2.5	8.0	0.02	125.0	3.1	108.0	5.2	108.0	4.5	116.6	2.6	93.0	5.9	88.0	4.1
Rimsulfuron	0.9932	4.5	15.0	0.01			72.0	3.4	103.0	4.5			102.0	2.0	74.0	3.8
Tebuconazole	0.9966	1.2	4.0	1.0	117.0	7.3	105.0	3.3	105.0	4.0	91.4	3.7	89.0	3.8	88.0	5.2
Terbufos	0.9993	2.7	9.0	0.01	110.0	2.6	77.0	5.8	94.0	4.0	108.0	6.3	87.0	4.9	81.5	4.0
Thiacloprid	0.9990	2.7	9.0	0.01	119.0	2.7	94.0	6.0	106.0	3.0	120.0	3.6	91.0	2.9	84.0	2.8
Thiamethoxam	0.9957	14.3	48.0	0.4			114.4	2.3	94.0	4.9			119.0	1.1	87.5	3.1
Triadimenol	0.9943	1.2	4.0	0.3	91.0	7.8	113.0	6.1	110.0	2.8	115.0	2.3	114.8	3.4	108.0	7.0
Trifloxystrobin	0.9964	1.5	5.0	3.0	117.6	5.2	113.0	1.3	92.0	4.1	107.6	1.4	94.0	6.0	86.0	4.6

Πίνακας 13: Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου: Γραμμικότητα (Linearity (r^2)), Όρια ανίχνευσης (LODs), όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), μέσες ανακτήσεις (REC) (%) και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) (%) τριών διαφορετικών επιπέδων ($n = 6$) που μελετήθηκαν για την ίδια ημέρα και σε διαφορετικές ημέρες, καθώς και μέγιστα επίπεδα υπολειμμάτων (MRL), για υπολείμματα παρασιτοκτόνων σε κόκκινο οίνο.

Παρασιτοκτόνα	Γραμμικότητα (r ²)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	MRL (mg/Kg)	Ανακτήσεις και σχετικές τυπικές αποκλίσεις											
					Ενδο-ημερήσια						Δια-ημερήσια					
					10 μg/Kg		100 μg/Kg		500 μg/Kg		10 μg/Kg		100 μg/Kg		500 μg/Kg	
					% Rec	RSD _r %	% Rec	RSD _r %	% Rec	RSD _r %	% Rec	RSD _R %	% Rec	RSD _R %	% Rec	RS D _R %
Acetamiprid	0.9980	15.2	50.0	0.5			103.0	7.1	81.0	4.2			97.5	2.1	88.0	7.8
Azoxystrobin	0.9980	1.5	5.0	3.0	107.0	8.8	110.0	4.7	90.0	7.0	119.6	1.1	101.0	3.8	93.0	6.1
Azinphos-methyl	0.9930	5.5	18.0	0.05	`		103.0	7.7	103.0	3.8			95.0	2.7	106.0	9.3
Benalaxyl	0.9995	1.2	4.0	0.3	96.4	9.9	118.0	4.2	92.0	5.6	118.6	2.1	105.5	3.3	97.0	8.8
Bupirimate	0.9951	1.5	5.0	1.5	113.0	7.7	114.0	5.0	102.0	7.1	120.0	1.8	113.5	2.5	100.0	5.0
Boscalid	0.9994	2.5	8.3	5.0	115.0	6.8	113.4	3.8	90.0	6.0	120.6	1.4	104.5	4.2	98.0	6.0
Carbendazim	0.9978	22.0	73.0	0.5			74.5	5.2	85.0	3.2			71.6	6.3	100.0	5.1
Chlorpyrifos	0.9968	1,5	5	0.01	118.5	2.0	112.0	4.4	88.0	2.4	118.4	2.6	88.0	4.7	82.0	4.0
Chlorpyrifos- methyl	0.9966	7,6	25.0	0.01			101.0	4.1	88.0	7.9			98.2	4.2	95.0	4.5
Cyprodinil	0.9923	1.5	5.0	3.0	100.8	7.4	116.0	4.6	98.0	5.7	119.2	1.1	107.0	3.4	102.0	7.7
Cymoxanil	0.9958	15.2	50.0	0.3			120.2	1.2	89.0	5.2			119.2	1.7	81.0	4.8
Coumaphos	0.9996	0.9	3.0	0.1	118.6	1.9	114.0	3.6	97.0	5.5	115.6	2.1	91.0	6.6	88.0	6.9
Clofentezine	0.9955	19.5	65.0	1.0			117.0	4.7	120.5	2.8			117.8	3.6	113.0	4.1
Dimethoate	0.9990	2.2	7.2	0.01	119.5	7.6	108.0	8.2	99.0	6.5	100.0	6.0	105.0	3.0	95.0	4.4
Diazinon	0.9924	1.5	5.0	0.01	117.4	3.5	118.5	1.5	119.5	1.2	105.6	5.2	115.0	4.4	113.0	4.0
Dichlorvos	0.9995	1.2	4.0	0.01	95.0	7.5	108.0	5.9	103.0	4.1	98.4	10.8	107.5	1.8	95.0	2.5

Difenoconazole	0.9984	1.5	5.0	3.0	119.0	1.5	115.4	5.3	103.0	9.3	112.8	2.7	112.5	6.0	99.0	3.2
Ethion	0.9974	0.4	1.4	0.01	118.4	2.0	118.5	2.1	114.0	4.7	105.2	6.0	112.0	6.7	103.0	2.2
Fenthion	0.9923	2.4	8.0	0.01	112.4	9.5	120.0	1.7	109.0	5.6	113.6	6.0	104.0	6.3	102.0	2.9
Fenthion sulfoxide	0.9998	1.2	4.0	0.01	103.8	8.4	99.0	4.9	79.0	3.5	110.0	4.5	83.5	3.2	80.0	4.5
Fenbuconazole	0.9997	1.5	5.0	1.0	104.8	5.7	110.0	4.6	89.0	5.8	112.8	7.2	103.0	6.4	94.0	5.9
Fluazifop-p-butyl	0.9969	1.5	5	0.01	114.2	5.9	120.2	1.3	119.0	4.2	121.0	1.9	119.6	1.8	119.2	2.2
Imidacloprid	0.9964	15.5	52.0	1.0			73.3	5.7	83.0	3.0			71.4	4.3	91.0	4.6
Iprovalicarb	0.9997	2.1	7.0	2.0	107.2	6.3	109.0	4.7	91.0	4.4	116.2	3.1	99.0	4.9	93.0	3.8
Methoxyfenozide	0.9921	2.7	9.0	1.0	114.2	7.9	121.0	5.3	110.0	10.1	116.8	3.1	113.0	2.7	97.0	2.5
Metalaxyl	0.9990	1.5	5.0	1.0	101.8	9.2	109.0	3.8	92.5	4.9	118.4	3.8	102.0	3.3	92.0	7.1
Myclobutanil	0.9994	3.0	10.0	1.0			110.0	5.1	97.0	4.0			100.0	3.7	93.0	6.7
Pyraclostrobin	0.9993	0.9	3.0	2.0	120.2	3.3	113.0	7.8	91.0	5.3	116.8	3.9	99.0	7.7	94.0	4.5
Pyriproxyfen	0.9985	1.5	5	0.05	118.0	2.7	102.0	4.8	88.0	2.5	118.4	1.8	99.0	4.8	100.0	5.8
Phosalone	0.9992	2.7	9.0	0.01	89.8	8.1	116.0	3.9	117.0	5.7	120.4	1.2	120.0	3.1	116.0	5.6
Quinalop-p-ethyl	0.9930	1.5	5.0	0.02	115.6	7.6	114.2	9.6	92.0	9.2	112.8	3.3	99.0	4.6	93.0	3.8
Rimsulfuron	0.9938	4.5	15.0	0.01			96.0	5.7	97.0	2.9			100.0	2.7	89.0	4.4
Thiacloprid	0.9991	2,3	7.6	0.01	116.8	4.2	103.0	4.7	86.0	3.5	119.6	2.3	98.0	3.4	89.0	4.7
Thiamethoxam	0.9958	15.0	50.0	0.4			100.0	3.4	80.0	7.4			95.0	2.5	87.0	3.3
Terbufos	0.9993	2.8	9.2	0.01	119.8	1.8	120.0	1.3	96.0	9.8	116.2	6.0	96.0	4.1	87.0	7.3
Tebuconazole	0.9966	1.5	5.0	1.0	107.8	4.7	103.0	5.5	99.0	5.0	99.0	4.2	98.0	5.4	89.0	3.3
Triadimenol mix.	0.9943	1.5	5.0	0.3	119.6	1.1	114.0	7.7	104.0	8.6	119.8	3.6	111.0	7.3	99.0	4.3
Trifloxystrobin	0.9964	0.5	1.8	3.0	101.8	9.0	109.0	9.3	86.0	10.2	110.2	4.5	94.0	3.2	84.0	5.0

Η γραμμικότητα (r^2) της μεθόδου ήταν σε όλες τις περιπτώσεις σε τιμές $>0,9921$ σε λευκό και κόκκινο οίνο. Η ορθότητα και η ακρίβεια της μεθόδου προσδιορίστηκαν σε μελέτες ανάκτησης με λευκά και κόκκινα δείγματα οίνου σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (10, 100 και 500 $\mu\text{g} / \text{Kg}$) που αναλύθηκαν έξι φορές την ίδια ημέρα και έξι συνεχόμενες ημέρες, επίσης (Πίνακες 12 και 13) .

Οι ανακτήσεις κυμαίνονταν σε όλες τις περιπτώσεις μεταξύ 71,2% για fluazifop-p-butyl και 125% για quizalop-p-ethyl και μεταξύ 71,4% για το imidacloprid και 121% για το fluazifop-p-butyl και το methoxyfenozide, για λευκό και κόκκινο οίνο, αντίστοιχα. Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD) δεν ξεπέρασαν ποτέ το 11%, σε όλες τις περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα, η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας (RSD_r) στον λευκό οίνο κυμαινόταν από 0,9% για το cyprodinil έως 7,8% για την triadimenol, ενώ στο κόκκινο κρασί από 1,1% για την triadimenol έως 10,2% για την trifloxystrobin. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) στον λευκό οίνο κυμάνθηκε από 1,1% για τη thiamethoxam έως 8,0% για το dimethoate, ενώ στο κόκκινο οίνο κυμάνθηκε από 1,1% για την azoxystrobin και την cyprodinil έως 10,8% για το dichlorvos.

Τα LODs και τα LOQs της μεθόδου παρουσιάζονται στους Πίνακες 12 και 13. Σε λευκό οίνο, τα LOD κυμαίνονταν μεταξύ 0,7 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για fluazifop-p-butyl και 21,5 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για carbendazim, ενώ τα LOQ κυμάνθηκαν μεταξύ 2,5 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για το fluazifop-p-butyl και azoxystrobin και 72,0 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για το carbendazim. Στον κόκκινο οίνο, τα LOD κυμαίνονταν μεταξύ 0,4 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για το ethion και 22,0 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για το carbendazim, ενώ τα LOQs κυμαίνονταν μεταξύ 3,0 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για τα coumaphos και 73,0 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για το carbendazim. Σύμφωνα με το SANTE/12682/2019 οι τιμές των LOQs απαιτείται να είναι $\leq \text{MRL}$. Τα LOQs των αναλυτών ενώσεων που εντοπίζονται σε υψηλά επίπεδα δεν δημιούργησαν καμιά ανησυχία, γιατί οι τιμές των MRLs τους είναι σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα από τις τιμές των LOQ τους.

Οι υψηλές τιμές LOQ ορισμένων πολικών αναλυτών (carbendazim $\log K_{ow} = 1,48$, cymoxanil $\log K_{ow} = 0,67$, imidacloprid $\log K_{ow} = 0,57$, thiamethoxam $\log K_{ow} = -0,13$) μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι επηρεάζονται οι αναλυτές αυτοί από την συνεκχύλιση πολικών ενώσεων που εμπεριέχονται στον οίνο (Guo et al., 2019). Επιπλέον, στην παρούσα μελέτη το τελικό δείγμα εκχυλίσματος αραιώθηκε δύο φορές, έτσι οι τιμές LOQs σε ορισμένες περιπτώσεις αναμένεται να είναι πιο υψηλά.

Αβεβαιότητα της μεθόδου

Οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να εκφραστεί η εκτιμώμενη αβεβαιότητα, είναι οι εξής (EURACHEM, 2011):

- Τυπική αβεβαιότητα (standard uncertainty, u): ορίζεται η αβεβαιότητα του μετρούμενου μεγέθους, εκφρασμένη ως τυπική απόκλιση.
- Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (combined standard uncertainty, u_c): ορίζεται η αβεβαιότητα του μετρούμενου μεγέθους που προκύπτει από το μαθηματικό συνδυασμό των διαφορετικών τυπικών αβεβαιοτήτων και ισούται με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των τυπικών αβεβαιοτήτων κάθε συνιστώσας που συνεισφέρει στην αβεβαιότητα.
- Διευρυμένη αβεβαιότητα (expanded uncertainty, U): Εκφράζει το διάστημα μέσα στο οποίο εκτιμάται ότι βρίσκεται η μετρούμενη τιμή για δεδομένη στάθμη εμπιστοσύνης. Συνήθως η τιμή προκύπτει αν πολλαπλασιάσουμε τη συνδυασμένη αβεβαιότητα με ένα παράγοντα κάλυψης (coverage factor, k). Η επιλογή του παράγοντα κάλυψης βασίζεται στο επιθυμητό επίπεδο εμπιστοσύνης. Στις χημικές αναλύσεις συνήθως χρησιμοποιείται στάθμη εμπιστοσύνης 95%, οπότε ο παράγοντας κάλυψης είναι $k=1,96$ (συνήθως $k=2$).

Το βασικό μοντέλο για την αβεβαιότητα U που αντιπροσωπεύεται από την διευρυμένη αβεβαιότητα U υπολογίζεται από τη σχετική τυπική αβεβαιότητα U' στις εξισώσεις (1) και (2) (SANTE, 2019):

$$U = k \times U' \quad (1)$$

$$U' = \sqrt{U'(\text{bias})^2 + U'(\text{presicion})^2} \quad (2)$$

Όπου, το U είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα, το U' είναι η συνδυασμένη αβεβαιότητα μέτρησης, η αβεβαιότητα του συστηματικού σφάλματος U' (bias) είναι η αβεβαιότητα που προκύπτει από τα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (CRM) και το σφάλμα στις πειραματικές ανακτήσεις (Recovery) και διεργαστηριακές μετρήσεις, το U' (presicion) είναι η αβεβαιότητα που δίνεται από την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα και k είναι ο συντελεστής κάλυψης, όπου $k=2$ (σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) (SANTE, 2019). Οι τιμές της διευρυμένης αβεβαιότητας (U) πρέπει να μην υπερβαίνει το 50% για να θεωρείται η μέθοδος αποτελεσματική ως προς την αβεβαιότητα (SANTE, 2019).

Ως αβεβαιότητα της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (RSD_R) του παρασιτοκτόνου (SANTE, 2019) είναι:

$$U'(precision) = RSD_R \quad (3)$$

Στην ανάλυση υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων, τόσο η αβεβαιότητα ακρίβειας $U'(precision)$ όσο και η αβεβαιότητα συστηματικού σφάλματος $U'(bias)$ υπολογίζονται χρησιμοποιώντας τα ίδια πειράματα ανάκτησης (SANTE, 2019).

Η κύρια κατεύθυνση σύμφωνα με τον οδηγό είναι ο υπολογισμός των συστηματικών σφαλμάτων βάσει δύο συνιστωσών:

- Το σφάλμα ($bias$) το οποίο υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την εξίσωση (4)

$$\text{σχετικό σφάλμα \%} = \frac{\text{πειραματική τιμή} - \text{πραγματική τιμή}}{\text{πραγματική τιμή}} \times 100 \quad (4)$$

- Η αβεβαιότητα της πραγματικής τιμής, όπως προκύπτει από τα πιστοποιητικά των υλικών αναφοράς, $u(C_{ref})$ ή των ανακτήσεων $u(C_{recovery})$, ενώ η αβεβαιότητα του συστηματικού σφάλματος $U'(bias)$ υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας την εξίσωση (5)

$$U'(bias) = \sqrt{RMS'_{bias}{}^2 + U'(C_{ref})^2} \quad (5)$$

Όπου RMS'_{bias} είναι η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων όλων των σφαλμάτων (% διαφορά) που έχουν υπολογιστεί δια τον αριθμό αυτών, χρησιμοποιώντας την εξίσωση (6) και $U'(C_{ref})$ η αβεβαιότητα που προκύπτει από τα πιστοποιητικά των υλικών αναφοράς, προτύπων και εξοπλισμού (SANTE, 2019).

$$RMS'_{bias} = \sqrt{\frac{\sum (bias)_i^2}{n}} \quad (6)$$

Στην ανάλυση υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων, όταν χρησιμοποιούνται κανονικά πιστοποιημένα πρότυπα και βαθμονομημένα/επαληθευμένα ογκομετρικά όργανα και σκεύη, μπορεί να υποτεθεί ότι η αβεβαιότητα που σχετίζεται με την αβεβαιότητα που σχετίζεται με τα πιστοποιητικά υλικών αναφοράς είναι αμελητέα, επομένως θεωρούμε $U'(C_{ref}) = 0$ (SANTE, 2019). Στις περιπτώσεις όπου η εκτίμηση έγινε με τη χρήση ενός μόνο πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (CRM), τότε το RMS_{bias} ($n=1$) ισούται με το σχετικό σφάλμα ($bias$). Επιπλέον, πρέπει να συμπεριληφθούν οι αβεβαιότητες που

αφορά τις ενδοεργαστηριακές μετρήσεις, S_{bias} που αντιπροσωπεύουν την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (RSD_R), επομένως το $U'(bias)$ μπορεί να εκτιμηθεί με την ακόλουθη εξίσωση (SANTE, 2019; Nordtest):

$$U'(bias) = \sqrt{bias^2 + \left(\frac{S_{bias}^2}{\sqrt{n}}\right)} \quad (7)$$

Όσον αφορά την ανάλυση υπολειμμάτων, μια άλλη συνήθης πρακτική για την εκτίμηση της αβεβαιότητας μέτρησης περιλαμβάνει την εξίσωση Horwitz ή τη σχετική τυπική απόκλιση κατάλληλη για χρήση (FFP-RSD- fit-for-purpose relative standard deviation). Με βάση την εξίσωση Horwitz, υπολογίζεται η σχετική τυπική απόκλιση ως η συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα μέτρησης. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζεται με έναν συντελεστή κάλυψης, $k=2$ για τη λήψη της διευρυμένης σχετικής αβεβαιότητας μέτρησης (Medina-Pastor et al., 2011) Η εξίσωση Horwitz εκφράστηκε ως (Horwitz and Albert, 2006):

$$RSD_R \% = 2C^{-0.15} \quad (8)$$

Όπου η συγκέντρωση C εκφράζεται ως κλάσμα μάζας. Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε κλάσμα μάζας $E-9$ (0,000000001) το οποίο αντιστοιχεί σε μονάδα συγκέντρωσης $\mu g / Kg$. Η βασική παρατήρηση ήταν ότι η ακρίβεια, εκφραζόμενη ως RSD_R , διπλασιάζεται για κάθε μείωση 2 τάξεων μεγέθους συγκέντρωσης C , εκφραζόμενη ως κλάσμα μάζας (Horwitz και Albert, 2006).

Στη συνέχεια, εκτιμήθηκε ο λόγος Horwitz. Ο λόγος Horwitz (HorRat) είναι μια απλή παράμετρος απόδοσης που αντικατοπτρίζει την αποδοχή μιας μεθόδου χημικής ανάλυσης σε σχέση με την ακρίβεια. Είναι η αναλογία της παρατηρούμενης σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD_R) που υπολογίζεται από τα δεδομένα, προς την αντίστοιχη προβλεπόμενη σχετική τυπική απόκλιση που υπολογίζεται από την εξίσωση Horwitz $PRSD_R$ (Horwitz and Albert, 2006):

$$HorRat = \frac{RSD_R}{PRSD_R} \quad (9)$$

Η προβλεπόμενη σχετική τυπική απόκλιση $PRSD_R$ υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$PRSD_R = 2C^{-0.15} = 2 * C ^ (-0.15) \quad (10)$$

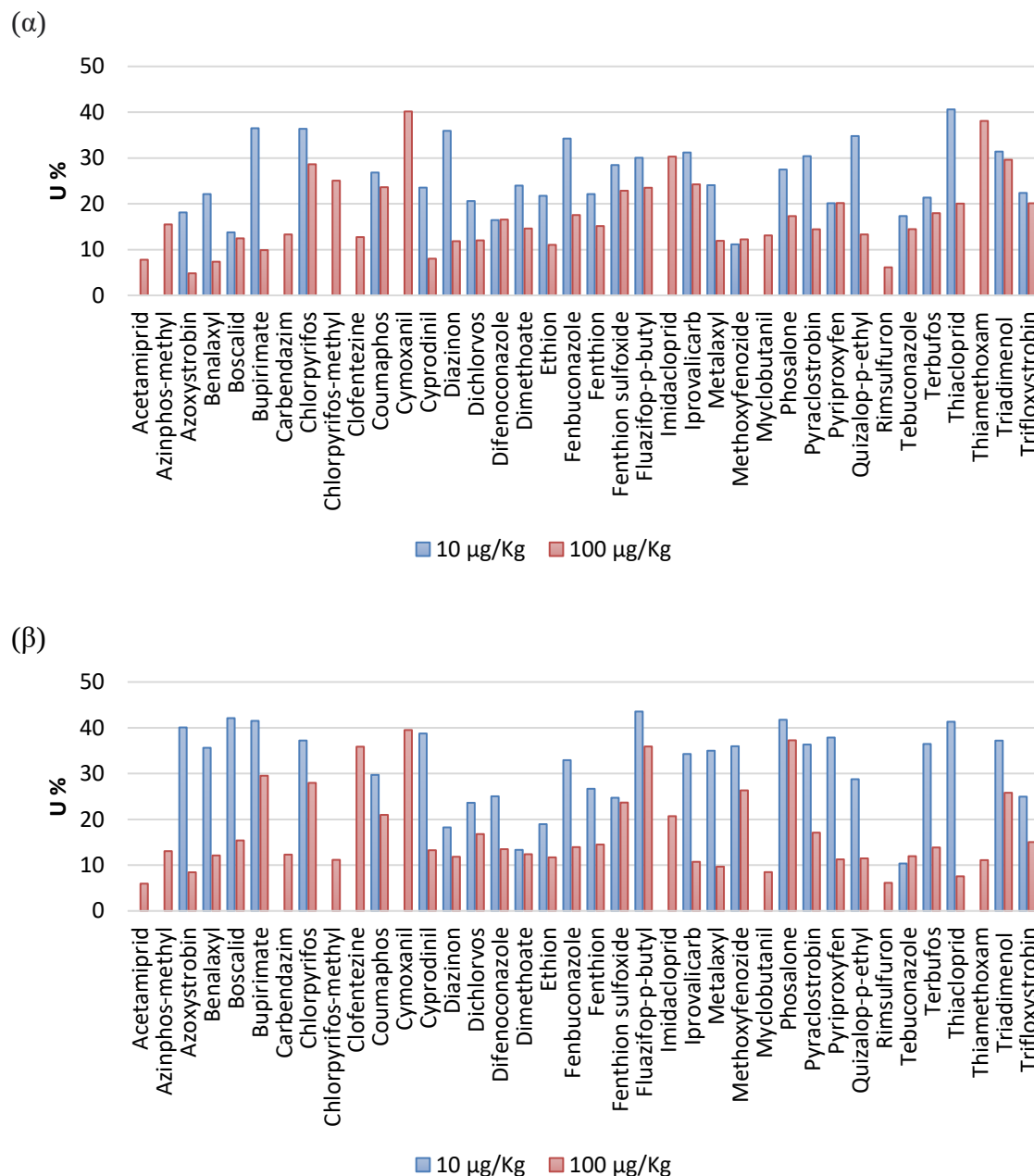
Όταν ο λόγος Horwitz (HorRat) ισούται με 1 υπάρχει μια ακριβής αντιστοιχία, όταν η αναλογία είναι μικρότερη από 1, η ακρίβεια είναι καλύτερη από την αναμενόμενη και

φτωχότερη εάν είναι μεγαλύτερη από 1. Αυτή η αναλογία εκφράζεται ισοδύναμα ως "HORRAT", "Horrat" ή ως "HorRat" (Horwitz and Albert, 2006).

Πίνακας 14: Αβεβαιότητα προσδιορισμού U (%) υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων για τον λευκό και τον κόκκινο οίνο στις συγκεντρώσεις 10 και 100 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ ($k = 2$, επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) καθώς και τιμές HorRat σε 10 $\mu\text{g} / \text{Kg}$.

Παρασιτοκτόνα	Λευκός οίνος			Κόκκινος οίνος		
	10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$	10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$		100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$
	U (%)	HorRat	U (%)	U (%)	HorRat	U (%)
Acetamiprid			7.8			6.0
Azinphos-methyl			15.5			13.1
Azoxystrobin	18.1	0.2	4.8	40.1	0.1	8.4
Benalaxyl	22.1	0.1	7.4	35.6	0.2	12.1
Boscalid	13.8	0.3	12.5	42.1	0.1	15.4
Bupirimate	36.5	0.2	9.9	41.5	0.1	29.5
Carbendazim			13.3			12.3
Chlorpyrifos	36.4	0.2	28.6	37.2	0.2	28.0
Chlorpyrifos-methyl			25.1			11.2
Clofentezine			12.7			35.9
Coumaphos	26.8	0.3	23.6	29.7	0.2	21.0
Cymoxanil			40.2			39.5
Cyprodinil	23.5	0.4	8.0	38.8	0.1	13.3
Diazinon	35.9	0.5	11.8	18.3	0.4	11.8
Dichlorvos	20.6	0.3	12.0	23.6	0.7	16.8
Difenoconazole	16.4	0.2	16.6	25.0	0.2	13.5
Dimethoate	24.0	0.5	14.6	13.3	0.4	12.4
Ethion	21.7	0.2	11.0	19.0	0.4	11.7
Fenbuconazole	34.2	0.3	17.5	32.9	0.5	13.9
Fenthion	22.1	0.3	15.1	26.7	0.4	14.5
Fenthion sulfoxide	28.5	0.8	22.9	24.7	0.3	23.7
Fluazifop-p-butyl	30.0	0.4	23.5	43.6	0.2	35.9
Imidacloprid			30.3			20.7
Iprovalicarb	31.2	0.1	24.2	34.3	0.2	10.7
Metalaxyl	24.1	0.4	11.9	35.0	0.3	9.7
Methoxyfenozide	11.1	0.2	12.2	36.0	0.2	26.3
Myclobutanil			13.1			8.5
Phosalone	27.5	0.4	17.3	41.8	0.1	37.3
Pyraclostrobin	30.4	0.2	14.4	36.3	0.3	17.1
Pyriproxyfen	20.1	0.5	20.2	37.9	0.1	11.3
Quizalop-p-ethyl	34.8	0.2	13.3	28.8	0.3	11.5
Rimsulfuron			6.1			6.1
Tebuconazole	17.3	0.2	14.5	10.4	0.3	12.0
Terbufos	21.4	0.4	18.0	36.5	0.4	13.9
Thiacloprid	40.6	0.2	20.0	41.3	0.2	7.6

Thiamethoxam			38.1			11.1
Triadimenol	31.4	0.2	29.6	37.2	0.3	25.8
Trifloxystrobin	22.4	0.3	20.1	25.0	0.3	15.0



Σχήμα 20: Αβεβαιότητα προσδιορισμού U% υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων για λευκό (α) και κόκκινο (β) οίνο σε συγκεντρώσεις 10 και 100 µg/kg

Το διευρυμένο MU υπολογίστηκε ξεχωριστά για κάθε παρασιτοκτόνο ως διπλάσιο από την τιμή της αβεβαιότητας ($k = 2$, επίπεδο εμπιστοσύνης 95%) και οι τιμές που προκύπτουν συνοψίζονται στον Πίνακα 14 και απεικονίζονται στο Σχήμα 20. Σε

συγκέντρωση 10 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, οι τιμές κυμαίνονταν μεταξύ 11,1 (methoxyfenozide) και 40,6% (thiacloprid) για λευκό οίνο και μεταξύ 10,4 (tebuconazole) και 43,6% (fluazifop-p-butyl) για το κόκκινο οίνο, αντίστοιχα, σύμφωνα με την απαίτηση (50%) των εγγράφων καθοδήγησης EE SANTE / 11813/2017 και SANTE / 12682/2019. Σε συγκέντρωση 100 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, οι διευρυμένες αβεβαιότητες κυμαίνονταν έως 40,2% και 39,5% για το cymoxanil τόσο σε λευκό όσο και σε κόκκινο οίνο, με μέσο όρο 17,3 και 17,0%, αντίστοιχα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η χαμηλή ανάκτηση ή / και η κακή επαναληψιμότητα συνέβαλαν στη μεγάλη αβεβαιότητα μέτρησης (Whang and Cheung, 2016).

Ο υπολογισμός χρησιμοποιώντας την εξίσωση Horwitz σε επίπεδο συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ αποκάλυψε ένα αποδεκτό $\text{RSD}_R = 32\%$. Στον Πίνακα 14 εμφανίζεται η τιμή HorRat, η οποία υπολογίστηκε για κάθε ένα από τα παρασιτοκτόνα. Η τιμή του λόγου HorRat σε όλες τις περιπτώσεις ήταν μικρότερη από 1, κυμαινόταν μεταξύ 0,1 (benalaxyl και iprovalicarb) και 0,8 (fenthion sulfoxide) για λευκό οίνο, ενώ μεταξύ 0,1 (azoxystrobin, boscalid, bupirimate, cyprodinil, phosalone, pyriproxifen) και 0,7 (dichlorvos) για κόκκινο οίνο, αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα, η ακρίβεια της εφαρμοζόμενης μεθόδου είναι καλύτερη από το μέγιστο επιτρεπόμενο.

3.5 Εφαρμογή της μεθόδου εκχύλισης Quechers σε πραγματικά δείγματα οίνου

Όλα τα δείγματα που αναλύθηκαν παρήχθησαν στην Ελλάδα. Δείγματα λευκού και κόκκινου οίνου που χρησιμοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου αγοράστηκαν από διάφορα τοπικά ελληνικά σούπερ μάρκετ στα Ιωάννινα, Δυτική Ελλάδα. Πραγματικά δείγματα που αναλύθηκαν αγοράστηκαν κατά τα έτη 2019 και 2020 από διάφορα τοπικά ελληνικά σούπερ μάρκετ, καταστήματα κρασιού και εισαγωγείς. Πιο συγκεκριμένα, οι λευκοί οίνοι ήταν ποικιλίες Μοσχοφίλερο, Ροδίτης και Chardonnay, ενώ οι κόκκινοι οίνοι ήταν ποικιλίες Ξινόμαυρο, Αγιωργίτικο, Cabernet Sauvignon και Merlot, που παρήχθησαν μεταξύ 2017 και 2019. Τα δείγματα, που μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο για ανάλυση, διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου σε γυάλινα φιαλίδια έως ότου αναλυθούν.

Τα δείγματα που αναλύθηκαν:

Δείγμα 1	Λευκός οίνος_ Νικόλας Ρεπάνης_Μοσχοφίλερο_2018
Δείγμα 2	Λευκός οίνος_Από παραγωγό_Δήμο Θήβας_2017
Δείγμα 3	Λευκός οίνος_Λευκός κύκνος_Μοσχοφίλερο_Ροδίτης_2018
Δείγμα 4	Λευκός οίνος_Κατώγι Αβέρωφ_Ροδίτης_Chardonay_2019
Δείγμα 5	Λευκός οίνος_Ακρες σκούρας_Μοσχοφίλερο_Αλεπού_2017
Δείγμα 6	Κόκκινος οίνος_Γη και Ουρανός_Thymiopoulos_Ξινόμαυρο_2018
Δείγμα 7	Κόκκινος οίνος_Από παραγωγό_Δήμο Κόνιτσας_Cabernet Sauvignon_Merlot_2019
Δείγμα 8	Κόκκινος οίνος_Μαύρος κύκνος_Αγιωργίτικο_2018
Δείγμα 9	Κόκκινος οίνος_Κατώγι Αβέρωφ_ Cabernet Sauvignon_Merlot_Αγιωργίτικο_2017
Δείγμα 10	Κόκκινος οίνος_Ακρες Σκούρας_Αγιωργίτικο_καμπερνέ_2017

Πίνακας 15: Ανίχνευση και επίπεδα συγκεντρώσεων υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων στα δείγματα λευκού και κόκκινου οίνου και τα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων τους (MRL) για οινοποιήσιμα σταφύλια.

Παρασιτοκτόνα	MRL (mg/Kg)	Λευκός οίνος (μg/Kg)				
		Δείγμα W1 Μοσχοφίλερο	Δείγμα W2 Μοσχοφίλερο	Δείγμα W3 Μοσχοφίλερο /Ροδίτης	Δείγμα W4 Ροδίτης/Chardonnay	Δείγμα W5 Μοσχοφίλερο
Cyprodinil	3	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α
Metalaxyl	1	42	<LOQ	32	δ.α	δ.α
		Κόκκινος οίνος(μg/Kg)				
		Δείγμα R1 Ξινόμαυρο	Δείγμα R2 Cabernet Sauvignon/ Merlot	Δείγμα R3 Αγιωργίτικο	Δείγμα R4 Cabernet Sauvignon/ Merlot/ Αγιωργίτικο	Δείγμα R5 Cabernet Sauvignon/ Αγιωργίτικο
Cyprodinil	3	<LOQ	7.2	δ.α	δ.α	δ.α
Metalaxyl	1	43	δ.α	δ.α	δ.α	δ.α

δ.α – δεν ανιχνεύθηκαν

Τα αποτελέσματα έδειξαν την εμφάνιση δύο μυκητοκτόνων στα δείγματα, το cyprodinil, μυκητοκτόνο που χρησιμοποιείτε για την καταπολέμηση του βοτρυτή στο αμπέλι και το metalaxyl, το οποίο εφαρμόζεται για την καταπολέμηση του περονόσπορου. Πιο συγκεκριμένα, το cyprodinil ανιχνεύθηκε μόνο σε κόκκινο οίνο, στα δείγματα που σημειώθηκαν ως «δείγμα R1» και «δείγμα R2», σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης και 7,2 μg / Kg, αντίστοιχα. Το metalaxyl ανιχνεύθηκε σε τρία δείγματα λευκού οίνου, που σημειώθηκαν ως «δείγμα W1», «δείγμα W2» και «δείγμα W3» σε

συγκεντρώσεις 42 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, <LOQ και 32 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, αντίστοιχα, ενώ σε κόκκινο οίνο στο «δείγμα» R1 σε συγκέντρωση 43 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ (Πίνακας 15).

Σε όλες τις περιπτώσεις, οι συγκεντρώσεις που προσδιορίστηκαν ήταν πολύ χαμηλότερες από τα MRL που όρισε η ΕΕ για τα οινοποιήσιμα αμπέλια. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα δείγματα W2 και R2 παρασχέθηκαν από παραγωγούς, ενώ τα δείγματα W1, W3 και R1 παρασχέθηκαν από τοπικά σούπερ μάρκετ. Το Σχήμα 21 αντιπροσωπεύει την ανίχνευση - ταυτοποίηση metalaxyl και cyprodinil σε δείγματα κόκκινου οίνου. Οι ενώσεις αυτές έχουν ανιχνευθεί σε δείγματα οίνου και σε προηγούμενες μελέτες. Ειδικότερα, σε έρευνα οι He et al. (2019) ανίχνευσαν το παρασιτοκτόνο metalaxyl στο 87,5% των 64 αναλυθέντων δειγμάτων οίνου, ενώ οι Zhang et al. (2019), ανίχνευσαν το metalaxyl σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ <LOQ και 0,17 mg / L, σε 46 δείγματα οίνου στην Κίνα. Οι Santana-Mayor et al. (2020) ανέφεραν το metalaxyl ως μια από τις πιο ενώσεις που ανιχνεύθηκαν στο 51,3% των δειγμάτων κόκκινου οίνου που αναλύθηκαν στην Ισπανία, με μέσες συγκεντρώσεις 33 $\mu\text{g} / \text{Kg}$.

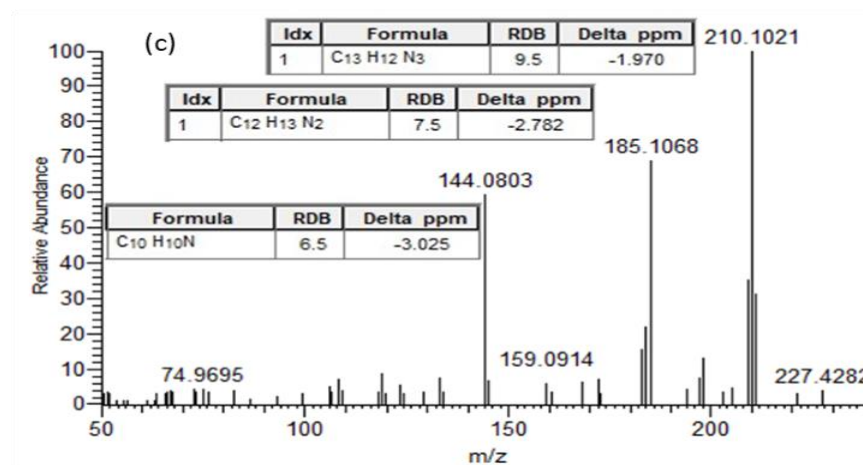
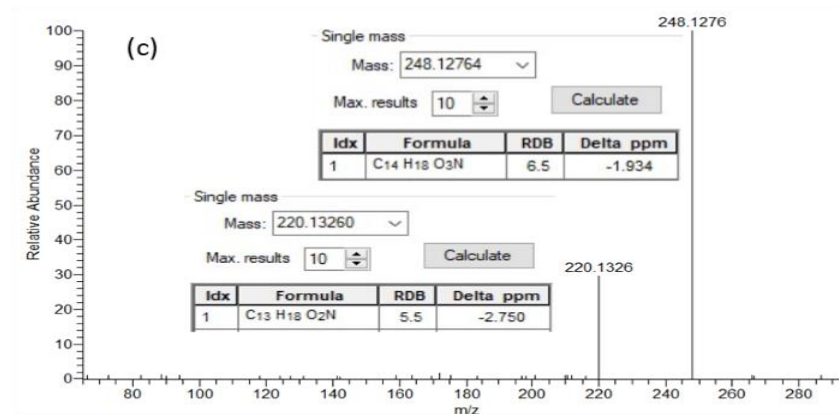
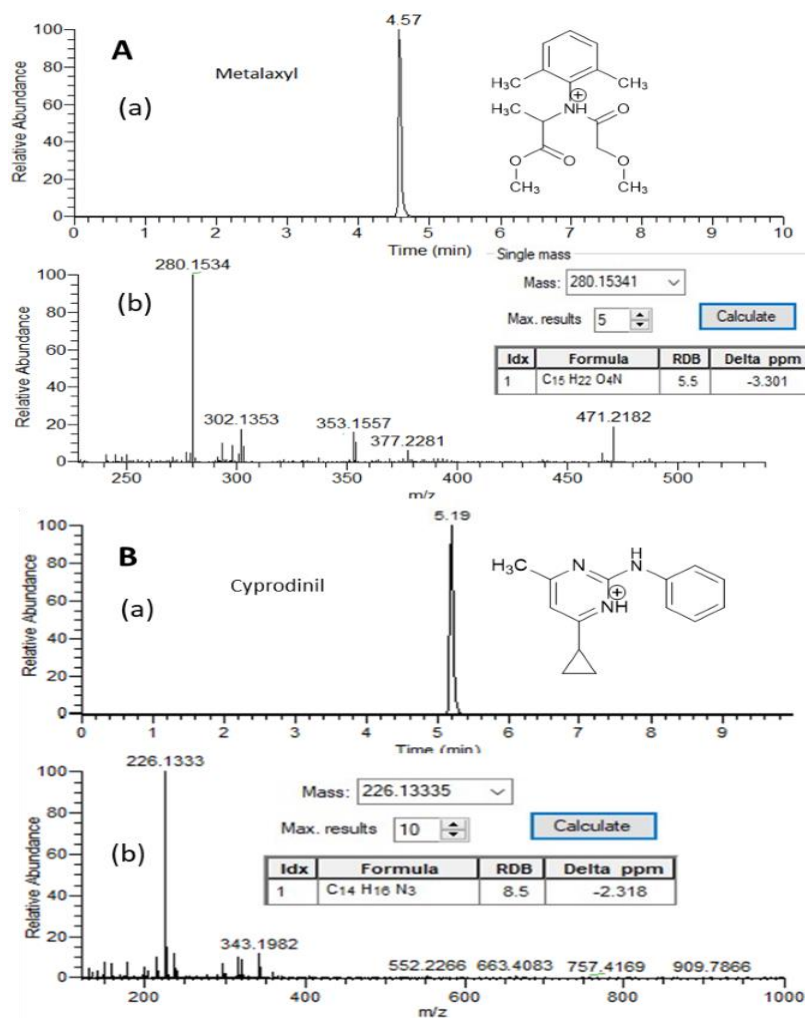
Επιπλέον, ο Oliver-Thermo (2013) ανίχνευσε το παρασιτοκτόνο cyprodinil σε κόκκινο οίνο σε συγκεντρώσεις 3,8 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, ενώ οι Castro et al. (2020), ανέφεραν μέση συγκέντρωση 7,9 ng / mL για το cyprodinil στο 50% των δειγμάτων μετά από ανάλυση συνολικά 60 δειγμάτων λευκού και κόκκινου οίνου, τα περισσότερα από τα οποία παρήχθησαν στη Γαλικία (Ισπανία). Σε άλλη έρευνα των Castro et al. (2018), το cyprodinil και το metalaxyl ανιχνεύθηκαν σε ποσοστό πάνω από το 50% των 25 κόκκινων και λευκών οίνων εμπορίου που αναλύθηκαν.

Ο Πίνακας 16 συνοψίζει την παρουσία διαφόρων παρασιτοκτόνων σε οίνο μεταξύ των μελετών που έχουν διεξαχθεί στην περιοχή της Μεσογείου, τα τελευταία δέκα χρόνια. Αν και δεν έχουν καθοριστεί MRLs για τα παρασιτοκτόνα στον οίνο, τα αποτελέσματα που προέκυψαν στην παρούσα εργασία, καθώς και σε προηγούμενες εργασίες, εμφάνισαν ότι ακόμη και μετά τη διαδικασία της οινοποίησης, ενδέχεται να εμφανιστεί η παρουσία ορισμένων παρασιτοκτόνων που εφαρμόζονται στα οινοποιήσιμα αμπέλια. Επιπλέον, η εμφάνιση περισσότερων από ένα παρασιτοκτόνων σε ένα δείγμα μπορεί να προκαλέσει συνεργιστική δράση, υποδεικνύοντας την αναγκαιότητα παρακολούθησης των υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων στον οίνο ως δείκτης της καθημερινής πρόσληψης και του σχετικού κινδύνου για την υγεία των ανθρώπων (Zhang et al., 2019). Συνεπώς η ανάγκη παρακολούθησης των ποικιλιών οίνου σε υπολείμματα παρασιτοκτόνων με την εφαρμογή ευαίσθητων αναλυτικών μεθόδων είναι διαρκώς σημαντική.

Πίνακας 16: Κύρια χαρακτηριστικά πρόσφατων μελετών σχετικά με την εκχύλιση Quechers και τις τεχνικές υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας για την ανάλυση των παρασιτοκτόνων στον οίνο.

Οίνος	Ενώσεις	Ποσότητα Οίνου	Εκχύλιση QuEChERS		Τεχνική ανάλυσης	Ανάκτηση (%)	LODs	LOQs	Γραμμικότητα	Βιβλιογραφία
			Εξαγωγή	Καθαρισμός						
Λευκός/ Κόκκινος	38 Φυτοφάρμακα	10 g	MgSO ₄ / NaOAc	PSA	UHPLC- LTQ/Orbitrap MS	71.2-125	0.1-36.4 μg/Kg	2.5-120 μg/Kg	≥0.9921	Παρούσα εργασία
Κόκκινος	97 Φυτοφάρμακα	2 mL	MgSO ₄ / NaOAc	MgSO ₄ / PSA/ C18	UHPLC/ESI- MS/MS	70-120	3 and 6 μg/L	10 and 20 μg/L	≥ 0.9900	Bernandi et al. (2020)
Κόκκινος	59 Φυτοφάρμακα	10 g	MgSO ₄ / NaCl/ trisodium citrate dihydrate/ disodium hydrogencitrate sesquihydrate/ ceramic homogenisers	PSA/ C18/ MgSO ₄	UHPLC- QTOF/MS/MS	61-108		2.60– 21.39 μg/kg	≥ 0.9931	Santana-Mayor et al. (2020)
Κόκκινος	49 Φυτοφάρμακα; 17 Μυκοτοξίνες	5 g	MgSO ₄ / NaCl	MgSO ₄	UHPLC/ESI- MS/MS	69-119	0.05-20.0 μg/Kg		≥0.9935	He et al. (2019)
Λευκός/ Κόκκινος	187 Φυτοφάρμακα	10 mL	MgSO ₄ / NaOAc	MgSO ₄ / C18/ PSA	UHPLC/ESI- MS/MS	66.7-134.6		≤5 μg/L		Whang and Cheung (2016)
Κόκκινος	50 Φυτοφάρμακα; 12 γλυκαντικές ουσίες, συντηρητικά	10 mL	NaCl/ MgSO ₄ / sodium citrate/ Na ₂ HPO ₄	PSA	DART-MS/MS	75-120	0.5–50 μg/L	1–250 μg/L	≥ 0.9900	Guo et al. (2016)
Κόκκινος	9 Φυτοφάρμακα	10 g	MgSO ₄ / NaCl/ disodium citrate sesquihydrate/ trisodium citrate dehydrate	No clean up	LC/ESI-MS/MS	76.7-100	3 μg/Kg	10 μg/Kg	≥ 0.9998	Martinez et al. (2015)
Κόκκινος	24 Φυτοφάρμακα	15 mL	MgSO ₄ / NaOAc	MgSO ₄ / PSA	LC/ESI-MS/MS	53.4-101.7		≤2 ng/mL	≥ 0.9963	Oliver-Thermo (2013)

Σχήμα 21: (a) Χρωματογράφημα επιλεγμένων ιόντων (Extracted Ion Chromatogram, XIC), (b) Πλήρης σάρωση ακριβούς φάσματος μάζας ιόντων και (c) φάσμα MS / MS θυγατρικών ιόντων, που ελήφθησαν για (A) metalaxyl (B) cyprodinil σε δείγματα κόκκινου οίνου.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος εκχύλισης QuEChERS σε συνδιασμό με υγρή χρωματογραφία φασματογραφία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (UHPLC Orbitrap MS) έχει καθιερωθεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε δείγματα τροφίμων. Επιλέχθηκε η οξινισμένη μέθοδος με ορισμένες τροποποιήσεις ύστερα από βελτιστοποιήσεις της μεθόδου ως προς τα βήματα εκχύλισης σε υπόστρωμα λευκού και κόκκινου οίνου, το προσροφητικό υλικό για την απομάκρυνση παρεμποδίζουσων – συνεκχυλιζόμενων ουσιών, και τέλος βελτιστοποίηση του τελικού δείγματος δείγματος με επιλογή του διαλύτη και του όγκου με αραίωση ή συμπύκνωση, μετά τον καθαρισμό του δείγματος. Η μέθοδος εκχύλισης QuEChERS έχει το πλεονέκτημα μιας δυναμικής, απλής και γρήγορης διαδικασίας, με λίγα αναλυτικά βήματα, τα οποία ελαχιστοποιούν τα σφάλματα. Η υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης - φασματομετρία μάζας - υψηλής ακρίβειας και διακριτικής ικανότητας (UHPLC-Orbitrap-MS) με θετικό ιονισμό (ESI +), παρείχε ικανοποιητική επιλεκτικότητα και υψηλή ευαισθησία. Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τις παραμέτρους της γραμμικότητας, της ορθότητας, της ακρίβειας, των ορίων ανίχνευσης (LODs) και ποσοτικοποίησης (LOQs), της επίδρασης του υποστρώματος, της διευρυμένης αβεβαιότητας και της τιμής του λόγου HorRat. Η γραμμικότητα της μεθόδου είναι $>0,9921$ σε όλες τις περιπτώσεις των ενώσεων που μελετώνται για λευκό και κόκκινο οίνο. Η ορθότητα επικυρώθηκε με τις μέσες ανακτήσεις σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, 10, 100, 500 $\mu\text{g/Kg}$ ($n=6$), και οι τιμές κυμάνθηκαν μεταξύ 71,2% και 125% για λευκό οίνο και μεταξύ 71,4% και 121% για κόκκινο οίνο. Η ακρίβεια της μεθόδου επικυρώθηκε ως προς την επαναληψιμότητα (RSD_r) ($n=6$) και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ($n=6$), με τιμές $<11\%$ σε όλες τις περιπτώσεις των ενώσεων που μελετήθηκαν για λευκό και κόκκινο οίνο. Τα όρια ανίχνευσης (LODs) κυμαίνονται μεταξύ 0,7 - 21,5 $\mu\text{g/L}$ για τον λευκό οίνο και μεταξύ 0,4 - 22,0 $\mu\text{g/L}$ για κόκκινο οίνο. Τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQs) κυμαίνονται μεταξύ 2,5 - 72 $\mu\text{g/L}$, για τον λευκό οίνο και μεταξύ 3,0 - 73 $\mu\text{g/L}$ για κόκκινο οίνο. Η επίδραση του υποστρώματος κυμάνθηκε σε τιμές από -48% έως 45%, σε όλες τις περιπτώσεις των ενώσεων που μελετήθηκαν σε λευκό και κόκκινο οίνο. Θεωρείται αναγκαία η αντιμετώπιση της επίδρασης της μήτρας - υποστρώματος προκειμένου να αποφευχθούν ανακριβή αποτελέσματα. Στην αντιστάθμιση αυτού του προβλήματος βοήθησε η χρήση καμπυλών βαθμονόμησης της

μήτρας. Η διευρυμένη αβεβαιότητα σε επίπεδο συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ είχε τιμές που κυμαίνονταν μεταξύ 11,1% και 40,6% για λευκό οίνο και μεταξύ 10,4% και 43,6% για κόκκινο οίνο. Σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, οι τιμές της διευρυμένης αβεβαιότητας κυμαίνονταν έως 40,2% και 39,5% σε λευκό όσο και σε κόκκινο οίνο, με μέσο όρο 17,3% και 17,0 % αντίστοιχα. Η διευρυμένη αβεβαιότητα της μεθόδου είναι αποδεκτή (<50%) σύμφωνα με την οδηγία SANTE. Η τιμή του λόγου HorRat ήταν μικρότερη από 1 σε όλες τις περιπτώσεις των ενώσεων που μελετήθηκαν τόσο σε δείγματα λευκού όσο και κόκκινου οίνου. Επομένως η ακρίβεια της μεθόδου είναι πολύ καλύτερη από την επιτρεπόμενη. Η μέθοδος εφαρμόστηκε για την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων οίνου που προμηθευτήκαμε από παραγωγούς και από την τοπική αγορά. Ανιχνεύτηκαν δύο μυκητοκτόνα, το cyprodinil και το metalaxyl. Το cyprodinil ανιχνεύθηκε σε δύο δείγματα κόκκινου οίνου, σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης και 7,2 $\mu\text{g} / \text{Kg}$. Το metalaxyl ανιχνεύθηκε σε τρία δείγματα λευκού οίνου, σε συγκεντρώσεις 42 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, <LOQ και 32 $\mu\text{g} / \text{Kg}$, ενώ ανιχνεύθηκε και σε ένα δείγμα κόκκινου οίνου σε συγκέντρωση 43 $\mu\text{g} / \text{Kg}$. Αξίζει να σημειωθεί ότι δύο από τα δείγματα οίνου που ανιχνεύθηκαν υπολείμματα των παρασιτοκτόνων, cyprodinil και metalaxyl, παρασχέθηκαν από παραγωγούς, ενώ τα υπόλοιπα δείγματα παρασχέθηκαν από τοπικά σούπερ μάρκετ. Τα υπολείμματα παρασιτοκτόνων που ανιχνεύτηκαν σε πραγματικά δείγματα οίνου βρέθηκαν σε χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης σε σύγκριση με τα MRLs που ορίζονται από την ΕΕ για τα οινοποιήσιμα αμπέλια, επομένως δεν συνιστάται άμεσος κίνδυνος για την υγεία του καταναλωτή. Πάραυτα είναι αναγκαία η συνεχής παρακολούθηση των υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε τρόφιμα. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα η αναπτυγμένη μέθοδος συνιστάται ως μια αποτελεσματική προσέγγιση για την παρακολούθηση ευρέως φάσματος υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε οίνους.

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Aktar W. Md. et al., (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards, 2(1): 1–12

Anastassiades M. et al., (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solidphase extraction” for the determination of pesticide residues in produce, *Journal of AOAC International*, vol. 86, pp. 412-431.

Ardrey R. E., (2003). *Liquid chromatography-Mass spectrometry: An introduction*, UK: John Wiley and Sons.

Arroyo-Manzanares N. et al, (2013). Multiclass mycotoxin analysis in *Silybum marianum* by ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a procedure based on QuEChERS and dispersive liquid-liquid microextraction, *Journal Chromatography A*, 1282:11-9

Barker S.A. et al., (1989). Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion. *Journal of Chromatography A*, 475: p. 353-361.

Bernardi G. et al., (2020). Miniaturized QuEChERS method for determination of 97 pesticide residues in wine by ultra-high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, *Analytical Methods*, 12, 2682.

Berset J. D. et al., (2017). Direct residue analysis of systemic insecticides and some of their irrelevant metabolites in wines by liquid chromatography – mass spectrometry, *Journal Chromatography A* 1506, 45–54.

Beyer A. and Biziuk M., (2008). Applications of sample preparation techniques in the analysis of pesticides and PCBs in food, *Food Chemistry*, vol. 108, pp. 669-680.

Bogialli S. and Di Corda A., (2007). Matrix solid-phase dispersion as a valuable tool for extracting contaminants from foodstuffs, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2): p.163-179.

Carro A.M., (2005). Multi-residue screening of chlorinated and brominated compounds from aquaculture samples using matrix solid-phase dispersion - gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1071: p. 93-98.

Carpinteiro I., et al., (2010). Determination of fungicides in wine by mixed-mode solid phase extraction and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 7484–7492.

Chamkasema N. and Harmona T., (2015). Analysis of Pesticides in Olive Oil Using a Modified QuEChERS Method with LC-MS/MS and GC-MS/MS , *Journal of Regulatory Science* 01 16–35.

Cunha S.C. et al., (2009). Fast low-pressure gas chromatography–mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines, *Journal of Chromatography A*, 1216, 119–126.

Correia M., et al., (2000). Multi-residue methodology for pesticide screening in wines, *Journal of Chromatography A*, 889: 59-67.

Cunha S. C. et al, (2012). Determination of bisphenol A and bisphenol B in canned seafood combining QuEChERS extraction with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 404, no. 8, pp. 2453-2463

Dias et al., (2019). Simultaneous determination of pesticides and mycotoxins in wine by direct injection and liquid chromatography – tandem mass spectrometry analysis, *Food chemistry* 293, 83 - 91

De Hoffmann E, and Stroodant V, (2007). *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd Edition, Wiley.

De Melo Abreu S., et al., (2006). A comparison of a gas chromatographic with electron-capture detection and a gas chromatographic with mass spectrometric detection screening methods for the analysis of famoxadone in grapes and wines. *Journal of Chromatography A*, 1103(2),362–367

De Pinho G. P. et al., (2010). Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography, *Food Control* 21, 1307–1311

Economoul A., et al., (2009). Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(31), 5856–5867

European Commission, (2017). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. SANTE/11813/2017. European Commission Directorate-General for Health and Food Safety,146.https://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_ml_guidelines_wrkdoc_201711813.pdfhttps://ec.europa.eu/food/sites/food/files/plant/docs/pesticides_ml_guidelines_wrkdoc_11945.pdf.

European Commission, (2019). Analytical Quality Control and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed (SANTE/12682/2019). European Commission, 2019. Analytical Quality Control and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed SANTE/12682/2019) . Sante/12682/2019, 1–48. https://www.eurl-pesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf

Eurachem Guide, (2011). Terminology in Analytical Measurement – Introduction to VIM 3, 1st edition.

Ferrer C. et al., (2005). Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1069: p. 183.

Fernandez M.,et al., (2000). Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 871: p. 43-56.

Fernandes J. P. et al., (2013). A survey of the occurrence of ochratoxin A in Madeira wines based on a modified QuEChERS extraction procedure combined with liquid chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Food Research International* 54, 293–301.

Ferreira J. A. et al., (2015). Determination of pesticide residues in coconut tree trunks by modified QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole tandem mass spectrometry, *Analytical Methods*, 7, 4237-4245

Finehout J. E. and Lee H. K., (2004). *An Introduction to Mass Spectrometry Applications in Biological Research, Biochemistry and Molecular Biology Education*, Vol. 32, No. 2, pp. 93–100.

Fusun Okcu Pelit et al., (2012). Development of a gas chromatographic method for the determination of Chlorpyrifos and its metabolite Chlorpyrifos-oxon in wine matrix, *Journal of Chromatography B*, 904, 35– 41

Freitas S. S. et al., (2018). Determination of Target Pesticide Residues in Tropical Fruits Employing Matrix Solid – Phase Dispersion (MSPD) Extraction Followed by High Resolution Gas Chromatography, *Journal Brazilian Chemistry Society*, 1140 – 1148

Guo T. et al., (2016). Rapid screening and quantification of residual pesticides and illegal adulterants in red wine by direct analysis in real time mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1471, 27-33.

Gómez-Ramos M. M. et al., (2015). Liquid chromatography Orbitrap mass spectrometry with simultaneous full scan and tandem MS/MS for highly selective pesticide residue analysis, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 407:6317–6326

González-Rodríguez, R. M., et al., (2009). Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid–liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(32), 6033–6042.

Gonzalez-Romero R., et al., (2011). Simultaneous determination of pesticides, biopesticides and mycotoxins in organic products applying a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction procedure and ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1218, 1477–1485

G.R. van der Hoff and P. van Zoonen, (1999). Trace analysis of pesticides by gas chromatography, *Journal of Chromatography A*, 843: p. 301.

Hayashizaki Y. et al., (2012). Rapid determination of disulfoton and its oxidative metabolites in human whole blood and urine using QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Legal Medicine*, vol. 14, no. 6, pp. 309-316.

Hernandez F. et al., (2006). 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.

Hugh Johnson ,(1998). *Hugh Johnson's Modern Encyclopedia Of Wine*.

Ho CS et al., 2003. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications, *Clinical Biochemist Reviews*. 24(1): 3–12.

Hogendoorn E. and van Zoonen P., (2000). Recent and future developments of liquid chromatography in pesticide trace analysis, *Journal of Chromatography A*, 892(1–2), 435–453.

Horwitz W. and Albert R., (2006). The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, *Journal of AOAC international*, 1095-1109.

Hu Y., et al., (2012). Determination of organophosphorous pesticide residues in red wine by solid phase microextraction-gas chromatography, *Se Pu*, 2006, 24(3), 290–293.

Jia He et al., (2019). Monitoring of 49 Pesticides and 17 Mycotoxins in Wine by QuEChERS and UHPLC–MS/MS Analysis, *Journal of Food Science*, Vol. 84, Iss. 9.

Jia Wei et al., (2014). Multi-mycotoxin analysis in dairy products by liquid chromatography coupled to quadrupole orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1345, 107-114

Kosma C. I., (2014). Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment, *Science of the Total Environment*, 466-467, 421-438.

Kristenson E.M. et al., (2006). Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *Trends Analytical Chemistry*, 25(2): p. 96-111

Kiple KF and Ornelas KC, (2001). *The Cambridge world history of food*, 2, Cambridge University Press.

Lazartigues Angélique et al., (2011). Multiresidue method to quantify pesticides in fish muscle by QuEChERS-based extraction and LC-MS/MS, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 400:2185–2193

Li L. et al., (2009). Application of Graphitized Carbon Black to the QuEChERS Method for Pesticide Multiresidue Analysis in Spinach, *Journal of AOAC international*, VOL. 92, NO. 2.

Lopes R. P. et al., (2012). Development and validation of a method for the determination of sulfonamides in animal feed by modified QuEChERS and LC-MS/MS analysis, *Food Control*, vol. 28, no. 1, pp. 192-198.

Lord H. and Pawliszyn J., (2000). Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A*, 902(1): p. 17-63.

Muccio A.D., (1996). Selective, solid-matrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk, *Journal of Chromatography A*, 754: p. 497.

Mester Z. et al., (2001). Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation, *Spectrochimica Acta Part B*, 56: p. 233-260.

Maja Pelajic et al., (2016). Novel multiresidue method for determination of pesticides in red wine using gas chromatography–mass spectrometry and solid phase extraction, *Food Chemistry*, 200 , 98–106.

Malhat F., et al., (2015). Validation of QuEChERS-based method for determination of flusilazole residues in grape by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector *Toxicological & Environmental Chemistry*, Vol. 97, No. 9, 1137_1144.

Martinez Vidal H. L. and Garrido Frenich A., 2005. *Pesticide Protocols*, HUMANA PRESS.

Martínez G. et al., (2015). Determination of Nine Fungicides in Grape and Wine Using QuEChERS Extraction and LC/MS/MS Analysis , *Journal of AOAC International*, Vol. 98, No. 6

Maggi L., et al., (2008). Comparison of stir bar sorptive extraction and solid-phase microextraction to determine halophenols and haloanisoles by gas chromatography–ion trap tandem mass spectrometry. *Talanta*, 75(3), 753–759.

Margalit Y. (2012). *Concepts in wine chemistry*, Board and Bench Publishing.

McGovern P. E., (2003). *Ancient wine: the search for the origins of viniculture*, Princeton University Press.

Medina-Pastor P. et al, (2011). Comparative study of the main top-down approaches for the estimation of measurement uncertainty in multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Journal Agric Food Chemistry*, 59:7609–7619

Millan S., et al., (2003). 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.

Milton Rosero-Moreano, (2018). *New Trends in Chemical Analysis of Disinfection By-Products*, chapter 4, intechopen, 77254

Mir Ali Farajzadeh et al., (2015). Development of counter current salting-out homogenous liquid–liquid extraction for isolation and preconcentration of some pesticides from aqueous samples, *Analytica Chimica Acta* 885, 122–131

Nannou Christina I. et al., (2018). Trace analysis of pesticide residues in sediments using liquid chromatography–high-resolution Orbitrap mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410:1977–1989

Nannou I. C. et al., (2019). A modified QuEChERS approach for the analysis of pharmaceuticals in sediments by LC-Orbitrap HRMS, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411:1383–1396

NORDTEST NT TR 537, (2017). Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories, edition 4.

OIV, (2019). State of the Vitiviniculture World Market, <http://www.oiv.int/>

OIV, (2017). International Organisation of Vine and Wine. OIV statistical report on world vitiviniculture. <http://www.oiv.int/public/medias/5479/oiv-en-bilan-2017.pdf>

Oliva J., et al., (2000). Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must and wine, *Journal of Chromatography A*, 882: 213-220.

Oliva J. et al., (2018). Influence of matrix on the bioavailability of nine fungicides in wine grape and red wine, *European Food Research and Technology*, 244:1083–1090.

Oliver Mike, 2013. Determination of 24 Pesticide Residues in Red Wine Using a QuEChERS Sample Preparation Approach and LC-MS/MS Detection, Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK, AN20830_E 08/13S

Parasuraman S. et al., (2004). An Overview of Liquid Chromatography-Mass Spectroscopy Instrumentation, *Pharmaceutical Methods*, Vol 5, Issue 2

Pizzutti Ionara R., (2014). Development, optimization and validation of a multiresidue method for the determination of 36 mycotoxins in wines by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Talanta* 129, 352–363.

Payá P. et al., (2007). Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 389:1697–1714.

Pazzirota T. et al., (2013). Processing factor for a selected group of pesticides in a wine-making process: distribution of pesticides during grape processing T. *Food Additives & Contaminants: Part A*, Vol. 30, No. 10.

Rejczak T. and Tuzimski T., (2015). A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach, *Open Chemistry*, 13: 980–1010

Ravelo-Pérez, M. L., et al., (2007). Multiple pesticide analysis in wine by MEKC combined with solid-phase microextraction and sample stacking. *Electrophoresis*, 28(22), 4072–4081.

Ravelo-Pérez, M. L., (2008). Solid-phase microextraction and sample stacking micellar electrokinetic chromatography for the analysis of pesticide residues in red wines. *Food Chemistry*, 111(3), 764–770.

Rizzetti T. M. et al., (2016). Optimization of a QuEChERS based method by means of central composite design for pesticide multiresidue determination in orange juice by UHPLC–MS/MS, *Food Chemistry* 196, 25-33

Rosa Ma. et al., (2009). Multiresidue determination of 11 new fungicides in grapes and wines by liquid–liquid extraction/clean-up and programmable temperature vaporization injection with analyte protectants/gas chromatography/ion trap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216 6033–6042

Sadowska-Rociek A. et al., (2013). Application of QuEChERS Method for Simultaneous Determination of Pesticide Residues and PAHs in Fresh Herbs, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, in press, 90:508–513

Santana-Mayor A. et al., (2020). Comparison of Pesticide Residue Levels in Red Wines from Canary Islands, Iberian Peninsula, and Cape Verde, *Foods*, 9, 1555

Sandoval M. A. R., (2017). Extraction of Phorbol Esters (PEs) from Pinion cake using computationally-designed polymers as adsorbents for Solid Phase Extraction, University of Leicester

Schmidt K. and Podmore I., (2015). Current Challenges in Volatile Organic Compounds Analysis as Potential Biomarkers of Cancer, *Journal of Biomarkers*, Hindawi.

- Sicbaldi F., et al., (1997). Root uptake and xylem translocation of pesticides from different chemical classes, *Pest Management Science*, 50,111-119
- Soleas GJ et al., (1997). Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention, *Journal Clin Lab Analitical* ;11:287–313.
- Śłowik-Borowiec M. et al., (2018). Multiresidue Analysis of Pesticides in Wine and Grape Using Gas Chromatography with Microelectron Capture and Nitrogen–Phosphorus Detection, *Food Analytical Methods* , 11:3516–3530
- Sohaib Haseeb et al., (2019). What's in wine? A clinician's perspective, *Trends in Cardiovascular Medicine* 29, 97–106
- Tsakires N. Argyres, 1998. *Oinologia*
- Thomson M., Ellison S.L.R. and Wood R., (2002). Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Applied Chemistry*, 74(5), 835-855
- Teixeira M.J., et al., (2004). 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.
- Tianyang G. et al., (2016). Rapid screening and quantification of residual pesticides and illegal adulterants in red wine by direct analysis in real time mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1471, 27–33
- Tianyang G. et al., (2019). Automatically High-Throughput Quantification by Paper Spray Ionization Mass Spectrometry for Multiple Pesticides in Wine, *Food Analytical Methods*, 12:1208–1217
- Tuzimski T. et al., (2016). Comparison of SPE/d-SPE and QuEChERS-Based Extraction Procedures in Terms of Fungicide Residue Analysis in Wine Samples by HPLC–DAD and LC-QqQ-MS, *Journal of AOAC International*, Vol. 99, No. 6.
- Urruty L. and Montury M. Influence of Ethanol on Pesticide Extraction in Aqueous Solutions by Solid-Phase Microextraction, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44(12), 3871–3877.
- Valsamaki V.I., et al., (2006). Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in chicken eggs by matrix solid phase dispersion, *Analytica Chimica Acta*, 573: p. 195-201.
- Vargas Thais de Souza et al, (2018). Fungicides in red wines produced in South America, *Food Additives and contaminants*, 2135–2144.
- Viñas P., et al., (2008). Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction for the ultra-performance liquid chromatographic determination of oxazole fungicide residues in wines and juices. *Journal of Chromatography A*, 1194(2), 178–183.
- Sandler M and Pinder R. (2003). *Wine: a scientific exploration*, CRC Press.
- Vintage Johnson H , (1989). *The story of wine*, New York: Simon and Schuster.
- Wang C. and Liu Z., (2007). Foliar uptake of pesticides - Present status and future challenge, *Pesticide Biochemical Physiology*, 87,1-8.
- Wang J. et al., (2012). Application of Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Electrospray Ionization Quadrupole Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry for Determination of 166 Pesticides in Fruits and Vegetables, *Agricultural Food Chemistry*, 60.
- Wang J. et al., (2014). Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Electrospray Ionization Q-Orbitrap Mass Spectrometry for the Analysis of 451 Pesticide Residues in Fruits and Vegetables: Method Development and Validation, *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 62, 10375–10391

Wang J. and Cheung W., (2016). UHPLC/ESI-MS/MS Determination of 187 Pesticides in Wine, Journal of AOAC International, Vol. 99, No. 2.

Wells M.J.M. and Yu L.Z., (2000). Solid-phase extraction of acidic herbicides, Journal of Chromatography A, 885: p. 237.

Zhang Bo et al., (2018). Simultaneous Analysis of 20 Mycotoxins in Grapes and Wines from Hexi Corridor Region (China): Based on a QuEChERS–UHPLC–MS/MS Method, Molecules, 23, 1926

Zhu X. L., et al., (2007). Determination of procymidone, pentachloroaniline and methyl-pentachlorophenylsulfide residues in wine by MSPD-GC-ECD, Chromatographia, 65, 625–628.

Informal coordination of MRLs established in Directives 76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC, and 90/642/EEC, 2004

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αλμπάνης Τ., (1987). Μελέτη της υδρόλυσης, της προσρόφησης και της διάσπασης των φυτοφαρμάκων methyl-parathion, lindane, και atrazine, σε φυσικά υποστρώματα, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

Αλμπάνης Τ., (1997). Φυτοφάρμακα, χρήση, επιπτώσεις και νομοθεσία, Ιωάννινα.

Βέκιος Γιώργος κ.α. , (2001). Το βιβλίο του κρασιού , Ελληνική Ακαδημία Οίνου.

Δελιγιαννάκης Ι., Χελά Δ., Κωνσταντίνου Ι., 2010. "Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση", Εκδόσεις Τζιόλα, Θεσσαλονίκη.

Κομποθέκρα Κότσορου Β., (2013). Βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης QuEChERS για τον προσδιορισμό σύγχρονων αναδύμενων μικρο ρύπων σε γαλακτοκομικά προϊόντα με τη χρήση υβριδικού αναλυτή μάζας LC-LTQ ORBITRAP, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Κοπιδάκης Ζ.Μ. , (1995). Ο Οίνος στην ποίηση, Ίδρυμα Φανή Μπουτάρη, Αθήνα.

Νάννου Χ., (2013). Βελτιστοποίηση αναλυτικών τεχνικών προσδιορισμού φαρμακευτικών ουσιών και εκτίμηση των επιπτώσεων τους στα φυσικά νερά, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

www2.minagric.gr/syspest/SYSPEST-astenia-CROPS.aspx

www.ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=download.MRL

<http://departments.agri.huji.ac.il/zabam/orbitrap.html>

www.pubchem.gr

<https://www.oiv.int/public/medias/6782/oiv-2019-statistical-report-on-world-vitiviniculture.pdf>

<http://www.oiv.int/en/statistiques/?year=2016&countryCode=GRC>

<https://www.statistics.gr/el/statistics/-/publication/SPG63/->

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

OIV (Organisation Internationale de la Vigne et du Vin) - Διεθνή Οργανισμό Αμπέλου και Οίνου

FAO (Food and Agriculture Organisation) – Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας των Ηνωμένων Εθνών

WHO - Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας

CCPR (Codex Committee on Pesticide Residues) – επιτροπή για τα υπολείμματα παρασιτοκτόνων

Α.ΣΥ.ΓΕ.Φ - Ανώτατο Συμβούλιο Γεωργικών Φαρμάκων