



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΠΙΜΣ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

**ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΟΛΥ – ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ ΜΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ
ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS – ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ
ΜΑΖΑΣ**

**Κωνσταντίνα Ιωσήφ
Χημικός**

Μεταπτυχιακή Διατριβή
Ιωάννινα 2022

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του τμήματος Χημείας, με κατεύθυνση «Αναλυτική Χημεία, Χημεία και Τεχνολογία Περιβάλλοντος και Τροφίμων», και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της διατριβής μου κ. Κωνσταντίνου Ιωάννη, Καθηγητή του εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την υπόδειξη του θέματος, την αμέριστη συμπαράσταση και καθοδήγησή του καθώς και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου.

Ακολούθως θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη και το προσωπικό του εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας, με ιδιαίτερη αναφορά στην Δρ. Χριστίνα Κοσμά, για την καθοδήγηση και τις συμβουλές της στα πρωταρχικά στάδια εκπόνησης της συγκεκριμένης διατριβής, καθώς και στην Κλεοπάτρα Μισερλή, υποψήφια διδάκτωρ του Τμήματος Χημείας, για την πολύτιμη βοήθειά και υποστήριξη που μου προσέφερε.

Επίσης ευχαριστώ την μονάδα περιβαλλοντικής, οργανικής και βιομηχανικής ανάλυσης υψηλής ευκρίνειας Orbitrap – LC – MS του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την πρόσβαση στις υπηρεσίες της.

Τέλος το μεγαλύτερο ευχαριστώ μου το οφείλω στην οικογένεια μου, που αποτελεί το στήριγμά μου σε κάθε καινούργιο εγχείρημα μου, αλλά και στους παντοτινούς μου φίλους για την υπομονή τους, την αγάπη τους, την αμέριστη κατανόηση τους και την αναπτέρωση του ηθικού μου, όταν αυτό ήταν αναγκαίο.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	6
ABSTRACT	8
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	10
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	11
<i>A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	18
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
2.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS ΩΣ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	38
3.1. ΠΡΟΣΕΓΓΥΣΕΙΣ – ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ QuEChERS	41
3.2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QuEChERS	43
3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS	44
3.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ	54
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QuEChERS ΣΤΟ ΛΑΔΙ	56
4.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ	66
5.1. ΥΓΡΗ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	66
5.2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ	67
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	74
<i>B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</i>	76
1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ	76
2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ	77
2.1. ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ - ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	77
2.2. ΔΙΑΛΥΤΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	78
2.3. ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ	78
2.4. ΟΡΓΑΝΑ - ΣΥΣΚΕΥΕΣ	79

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ QuEChERS	79
4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	88
5. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ	96
5.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	97
5.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΚΤΗΣΕΩΝ.....	97
5.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	98
5.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ	99
5.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ	99
6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	102
6.1. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ.....	102
6.2. ΑΝΑΚΤΗΣΕΙΣ.....	102
6.3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ	109
6.4. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ	110
6.5. ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ	113
7. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ	118
Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	120
Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	124

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε με στόχο τη βελτιστοποίηση του σταδίου καθαρισμού της ευρέως χρησιμοποιούμενης μεθόδου QuEChERS, για τον πολυ-υπολειμματικό προσδιορισμό 39 παρασιτοκτόνων, διαφορετικών χημικών κατηγοριών, σε ελαιόλαδο. Για το σκοπό αυτό η γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής μεθοδολογία QuEChERS συνδυάστηκε με την υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης-φασματομετρία μάζας- υψηλής ακρίβειας και διακριτικής ικανότητας (UHPLC-Orbitrap-MS). Η βελτιστοποίηση πραγματοποιήθηκε συγκρίνοντας δύο νέα προσροφητικά υλικά (Z-Sep⁺ και EMR- lipidTM), ως προς την ικανότητά τους να απομακρύνουν λιπαρά και άλλα συν-εκχυλιζόμενα συστατικά. Η μέθοδος αξιολογήθηκε ως προς τα κριτήρια ποιότητας για την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων δηλαδή προσδιορίζοντας την γραμμικότητα, την ανάκτηση, την επίδραση της μήτρας (ME), την ακρίβεια της μεθόδου, την επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) καθώς και την διευρυμένη αβεβαιότητα για τρία επίπεδα συγκέντρωσης 30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg. Η γραμμικότητα σε όλες τις περιπτώσεις εμφάνισε συντελεστές προσδιορισμού (R^2) μεγαλύτερους από 0,99. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε το EMR- lipidTM ως προσροφητικό υλικό, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν στο εύρος 70-113% για το 95% των αναλυτών με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) χαμηλότερες του 16%. Η επίδραση του υποστρώματος κρίθηκε χαμηλή ($\pm 20\%$) για 33 προσδιοριζόμενα φυτοφάρμακα και μέτρια ($\pm 20-50\%$) για 6 φυτοφάρμακα. Επιπλέον τα όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης για τη συγκεκριμένη μεθοδολογία κυμάνθηκαν μεταξύ 0,4-2,5 µg/kg και 1,3-7,8 µg/kg αντίστοιχα. Η διευρυμένη αβεβαιότητα σε επίπεδο συγκέντρωσης 30 µg/kg υπολογίστηκε στο εύρος 3,1-20,3%. Όσον αφορά τη μεθοδολογία με την χρήση του προσροφητικού υλικού Z-Sep⁺, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν στο εύρος 72-107% για το 92% των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) χαμηλότερες του 20% για το 92% των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων. Η επίδραση του υποστρώματος κρίθηκε χαμηλή ($\pm 20\%$) για 30 προσδιοριζόμενα φυτοφάρμακα και μέτρια ($\pm 20-50\%$) για 9 φυτοφάρμακα. Τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης κυμάνθηκαν μεταξύ 1,0-9,9 µg/kg και 0,3-3,3 µg/kg αντίστοιχα, ενώ η διευρυμένη αβεβαιότητα στο χαμηλότερο επίπεδο 30 µg/kg κυμάνθηκε μεταξύ 4,1-20,5%. Οι δύο μεθοδολογίες εφαρμόστηκαν και σε 30 πραγματικά δείγματα ελαιολάδου, τα οποία λήφθηκαν από διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδος. Τα αποτελέσματα

κατέδειξαν την απουσία των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων και στα 30 δείγματα ελαιόλαδου που μελετήθηκαν. Και οι δύο μεθοδολογίες πληρούν τα κριτήρια ποιότητας για την επικύρωσή τους, ωστόσο η χρήση του EMR- lipid™ παρουσιάζει μεγαλύτερες τιμές ανάκτησης για τους περισσότερους αναλύτες και μικρότερες τιμές διευρυμένης αβεβαιότητας, γεγονός που το καθιστά αποτελεσματικότερο προσροφητικό υλικό για τον προσδιορισμό παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο.

Λέξεις-Κλειδιά: Z-Sep⁺, EMR- lipid™, QuEChERS, φυτοφάρμακα, ελαιόλαδο

ABSTRACT

The aim of this study was the optimization of clean-up step in the widely applied quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) method for the determination of multiclass multiresidue pesticides in olive oil. The analytical procedure employed in this work was a combination of the original version of QuEChERS method with Ultra-High Performance Chromatography-Orbitrap-Mass Spectrometry (UHPLC-Orbitrap-MS). For the clean-up step, two different sorbents (Z-sep⁺, EMR-lipidTM) were compared for their efficiency on the removal of fats and co-extractives. The method was evaluated in terms of linearity, matrix effects (ME), recovery, precision, limit of detection (LOD) and quantification (LOQ) and expanded uncertainty, in three spiking levels 30 µg/kg, 100 µg/kg and 300 µg/kg. Linearity in all cases was higher than 0.99. Matrix effect study revealed slight signal suppression in both clean-up approaches with low ($\pm 20\%$ ME, 33 compounds) to medium ($\pm 20-50\%$ ME, 6 compounds) matrix effect when EMR- lipidTM is used as a sorbent and low ($\pm 20\%$ ME, 30 compounds) to medium ($\pm 20-50\%$ ME, 9 compounds) matrix effect when Z-Sep⁺ was the clean-up sorbent. The recoveries ranged from 70% to 113% for the 95% of the analytes with a %RSD value lower than 16%, when EMR- lipidTM is used as a sorbent. Furthermore LOQs and LODs ranged between 1.3-7.8 µg/kg and 0.4-2.5 µg/kg respectively, while the expanded uncertainties ranged between 3.1-20.3%, in the lowest concentration level 30 µg/kg. In the case of Z-Sep⁺, recoveries ranged between 72-107% with an %RSD value lower than 20% for the 92% of analytes. LOQs and LODs ranged between 1.0-9.9 µg/Kg and 0.3-3.3 µg/Kg, respectively. The expanded uncertainties ranged between 4.1-20.5%, in the lowest concentration 30 µg/kg. The validated methods were successfully applied to 30 real samples of olive oil from different regions of Greece revealing the absence of the examined pesticides. Both methodologies satisfy the quality criteria for their validation, but the combination of QuEChERS with EMR-lipidTM sorbent in the clean-up step provide lower values of expanded uncertainty for the determination of pesticides in olive oil.

Keywords: Z-Sep⁺, EMR- lipidTM, QuEChERS, pesticides, olive oil

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<i>Εικόνα 1.</i>	Τύχη και αποδόμηση των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον
<i>Εικόνα 2.</i>	Πειραματική διάταξη της DI-SPME (A) και της HS-SPME (B)
<i>Εικόνα 3.</i>	Στάδια προκατεργασίας του δείγματος με τη χρήση της τεχνικής MSPD
<i>Εικόνα 4.</i>	Ο μηχανισμός δέσμευσης των αναλυτών με χρήση της τεχνικής CPE
<i>Εικόνα 5.</i>	Στάδια του διαχωρισμού και του καθαρισμού των αναλυτών κατά την εφαρμογή της QuEChERS
<i>Εικόνα 6.</i>	Στάδια προετοιμασίας του δείγματος κατά την εφαρμογή των Original, AOAC και EN QuEChERS
<i>Εικόνα 7.</i>	Ισομερείς δομές όξινων φυτοφαρμάκων
<i>Εικόνα 8.</i>	Πεδίο εφαρμογής των τεχνικών ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση
<i>Εικόνα 9.</i>	Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή μαζών LIT-Orbitrap
<i>Εικόνα 10.</i>	Τελικά πρωτόκολλα εκχύλισης δείγματος ελαιολάδου με χρήση των δυο προσροφητικών υλικών (Z-Sep ⁺ , EMR-lipid)
<i>Εικόνα 11.</i>	Εκχυλισμάτα πραγματικού δείγματος ελαιολάδου πριν και μετά το στάδιο του καθαρισμού των δύο συγκρινόμενων μεθοδολογιών.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

<i>Διάγραμμα 1.</i>	% Ποσοστό ανάκτησης των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων, κατά την εφαρμογή των διαφορετικών εκδοχών της μεθόδου QuEChERS σε ελαιόλαδο με χρήση του προσροφητικού Z-Sep ⁺
<i>Διάγραμμα 2.</i>	% Ποσοστά ανάκτησης των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων, κατά την εφαρμογή της QuEChERS με επαναδιάλυση του εκχυλίσματος σε διαφορετικές όγκους ή διαλύτες
<i>Διάγραμμα 3.</i>	% Ποσοστό ανάκτησης έπειτα από καθαρισμό του εκχυλίσματος, με διαφορετικές αναλογίες προσροφητικών, συμπύκνωσης αυτού μέχρι ξηρού και επαναδιάλυσης σε όγκο 0.5mL της κινητής φάσης
<i>Διάγραμμα 4.</i>	% Ποσοστό ανάκτησης των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων, κατά την εφαρμογή των διαφορετικών εκδοχών της μεθόδου QuEChERS με χρήση του προσροφητικού υλικού EMR-lipid
<i>Διάγραμμα 5.</i>	% Ποσοστό ανάκτησης με χρήση του ζιζανιοκτόνου prometryn ως

	εσωτερικό και εξωτερικό πρότυπο
Διάγραμμα 6.	Επίδραση του υποστρώματος, για κάθε προσδιοριζόμενο παρασιτοκτόνο για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του προσροφητικού Z-Sep ⁺
Διάγραμμα 7.	Επίδραση του υποστρώματος, για κάθε προσδιοριζόμενο παρασιτοκτόνο για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid
Διάγραμμα 8.	Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του EMR-lipid
Διάγραμμα 9.	Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του Z-Sep ⁺

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.	Προσδιορισμός υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων με εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS σε διάφορα υποστρώματα τροφίμου
Πίνακας 2.	Εγκεκριμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις που εφαρμόζονται στα ελαιόδεντρα του Ελλαδικού χώρου
Πίνακας 3.	Ανώτατα επιτρεπτά όρια (mg/kg) που έχουν καθοριστεί για ελαιόλαδα
Πίνακας 4.	Βιβλιογραφική ανασκόπηση πολύ-υπολειμματικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκων στο ελαιόλαδο με χρήση της μεθόδου QuEChERS
Πίνακας 5.	Τυπικά χαρακτηριστικά επιλεγμένων αναλυτών μαζών
Πίνακας 6.	Ανώτατα επιτρεπτά όρια ανίχνευσης (MRLs) των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων, σε επιτραπέζιες ελιές και ελιές που προορίζονται για ελαιοπαραγωγή
Πίνακας 7.	Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης στο σύστημα UHPLC-MS-Orbitrap
Πίνακας 8.	Τιμές των παραμέτρων που επιλέχθηκαν για τη λειτουργία του συστήματος UHPLC-MS-Orbitrap
Πίνακας 9.	Χρόνοι κατακράτησης (t _R), μοριακοί τύποι των ψευδο-μοριακών ιόντων,

	θεωρητικές και πειραματικές μάζες, σχετικό σφάλμα μαζών ($\Delta\rho_{pm}$), αριθμός των ισοδύναμων διπλών δεσμών και δακτυλίων των ψευδο-μοριακών ιόντων (RDBE) και τα θυγατρικά ιόντα κατά το θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων, για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του Z-Sep ⁺ ως προσροφητικού υλικού
Πίνακας 10.	Χρόνοι κατακράτησης (t_R), μοριακοί τύποι των ψευδο-μοριακών ιόντων, θεωρητικές και πειραματικές μάζες, σχετικό σφάλμα μαζών ($\Delta\rho_{pm}$), αριθμός των ισοδύναμων διπλών δεσμών και δακτυλίων των ψευδο-μοριακών ιόντων (RDBE) και τα θυγατρικά ιόντα κατά το θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων, για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικού υλικού
Πίνακας 11.	Εύρος γραμμικότητας, καμπύλες βαθμονόμησης και συντελεστές προσδιορισμού για τις μεθόδους QuEChERS με χρήση Z-Sep ⁺ και EMR-lipid
Πίνακας 12.	Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ως % RSD) των παρασιτοκτόνων με χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικό
Πίνακας 13.	Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ως % RSD) των παρασιτοκτόνων με χρήση του Z-Sep ⁺ ως προσροφητικό
Πίνακας 14.	Όρια ανίχνευσης (LODs) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQs) για τα δύο εξεταζόμενα πρωτόκολλα και το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης 30μg/kg
Πίνακας 15.	Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 μg/kg, 100 μg/kg και 300 μg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid
Πίνακας 16.	Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 μg/kg, 100 μg/kg και 300 μg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του προσροφητικού Z-Sep ⁺
Πίνακας 17.	Γεωγραφική κατανομή πραγματικών δειγμάτων που επιλέχθηκαν για προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων και με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Τα παρασιτοκτόνα (ή φυτοφάρμακα) είναι συνθετικές οργανικές χημικές ενώσεις ή μίγματα αυτών, που χρησιμοποιούνται ευρέως από τα μέσα του 19^{ου} αιώνα, για τον έλεγχο των παρασίτων και την προστασία των καλλιεργειών. Προορίζονται για την πρόληψη, τη καταστροφή, την απώθηση ή τη μείωση κάθε παρασίτου που εμφανίζει επιβλαβή επίδραση στις καλλιέργειες και επιφέρει μείωση στην απόδοσή τους. Η χρήση των φυτοφαρμάκων στη γεωργία, αυξήθηκε προοδευτικά μετά το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο στοχεύοντας στην αύξηση της παραγωγής υγιών γεωργικών προϊόντων (Ortiz-Hernandez M.L. et al., 2013, Ozkara A. et al., 2016).

Τα παρασιτοκτόνα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με ποικίλους τρόπους, ωστόσο συνήθως διακρίνονται με γνώμονα τη φύση τους (οργανικά και ανόργανα), με βάση τον τρόπο επαφής τους με τα φυτά (συστηματικά και μη συστηματικά), καθώς και με βάση τη δραστηρότητά τους και τη χημική τους δομή. Τα μη συστηματικά φυτοφάρμακα, δεν διεισδύουν αισθητά στο φυτικό ιστό και κατά συνέπεια δεν μεταφέρονται ούτε μετατοπίζονται εντός του αγγειακού συστήματος των φυτών. Αντιθέτως, τα συστηματικά παρασιτοκτόνα διεισδύουν στους φυτικούς ιστούς και μεταφέρονται εντός του αγγειακού συστήματος, επιφέροντας τα επιθυμητά αποτελέσματα (Ozkara A. et al., 2016). Τα περισσότερα σύγχρονα φυτοφάρμακα παρουσιάζουν συστηματική δράση (Νάννου Χ.Ι., 2018).

Με βάση την χημική τους δομή μπορούν να διακριθούν σε 7 κύριες κατηγορίες συμπεριλαμβανομένων των χλωριωμένων υδρογονανθράκων, των οργανοφωσφορικών και καρβαμιδικών ενώσεων, των πυρεθρινοειδών, των αμιδίων, των ανιλινών και των αζωτούχων ετεροκυκλικών ενώσεων (Ozkara A. et al., 2016). Άλλες κατηγορίες αυτών αποτελούν τα φαινοξυ-οξέα, τα χλωροακεταμίδια, τα διπυριδύλια, οι αζόλες, τα νικοτινοειδή και τα ανόργανα άλατα των μετάλλων αρσενικού (As), ψευδαργύρου (Zn) και χαλκού (Cu) (Ahmed F.E. et al., 2001).

Ανάλογα με το είδος του μικροοργανισμού που καταπολεμούν (δραστηρότητα), αυτά διακρίνονται στα εντομοκτόνα (insecticides), τα μυκητοκτόνα (fungicides), τα ζιζανιοκτόνα (herbicides), τα ακαρεοκτόνα (acaricides), τα βακτηριοκτόνα (bactericides), τα μαλακιοκτόνα (molluscicides), τα τρωκτικοκτόνα (rodenticides), τα νηματοδοκτόνα (nematicides), τις φερομόνες (pheromones), τις απωθητικές ουσίες (repellents) και τους

ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών (plant growth regulators). Τα ζιζανιοκτόνα θεωρούνται η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία φυτοφαρμάκων παγκοσμίως (Ahmed F.E. et al., 2001).

Υπολογίζεται ότι τουλάχιστον 4 εκατομμύρια τόνοι παρασιτοκτόνων εφαρμόζονται ετησίως σε παγκόσμια γεωργική κλίμακα (Ortiz-Hernandez M.L. et al., 2013). Η εκτεταμένη χρήση τους, μπορεί να αποτελέσει απειλή για το περιβάλλον και την δημόσια υγεία. Εκτιμάται ότι λιγότερο από το 0,1% των παρασιτοκτόνων που εφαρμόζονται στις καλλιέργειες καταλήγουν στον οργανισμό - στόχο, ενώ το υπόλοιπο εισέρχεται στο περιβαλλοντικό σύστημα. Ως συνθετικές οργανικές ενώσεις, τα φυτοφάρμακα μπορούν να παραμείνουν στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα και να μεταφέρονται σε αρκετά μεγάλες αποστάσεις (Ozkara A. et al., 2016).

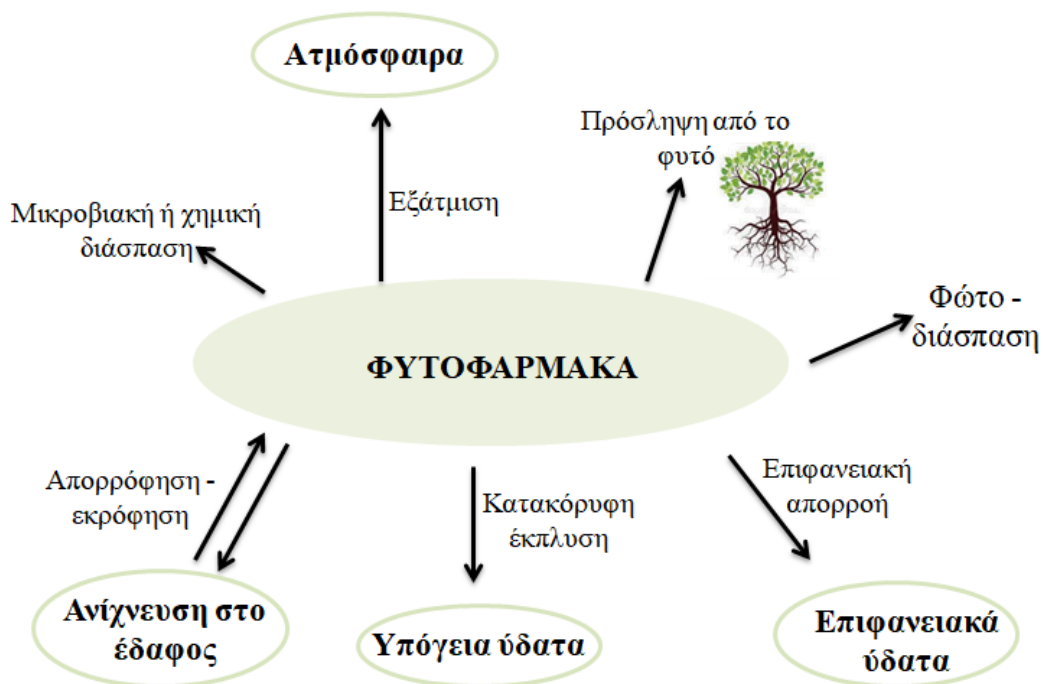
Ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τα φυτοφάρμακα δύναται να διασπαστούν μέσω διαφόρων βιοτικών και αβιοτικών διεργασιών σε χημικές ενώσεις, οι οποίες έχουν μικρότερο μοριακό βάρος, διαφορετική τοξικότητα και διαφορετική περιβαλλοντική συμπεριφορά από την αρχική ένωση. Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μπορεί να οφείλονται τόσο σε μεταβολικές αντιδράσεις, οπότε προκύπτουν μεταβολίτες όσο και σε χημικές διεργασίες (υδρόλυση, οξείδωση, που συμβαίνουν στο έδαφος, το νερό ή τον αέρα) οπότε παράγονται τα προϊόντα διάσπασης ή μετασχηματισμού (Νάννου Χ.Ι., 2018). Υπάρχουν τρεις βασικοί τρόποι αποδόμησης (Zuthi M.F.R. et al., 2016):

1. η βιολογική αποδόμηση κατά την οποία πραγματοποιείται η διάσπαση των παρασιτοκτόνων από μικροοργανισμούς του εδάφους ή από άλλους οργανισμούς
2. η χημική αποδόμηση που οφείλεται σε φαινόμενα υδρόλυσης και οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων
3. η φωτοχημική αποδόμηση που οφείλεται στην επίδραση υπεριώδους/ορατού φωτός

Το έδαφος είναι ικανό να προσροφά ποικίλους ρύπους, ενώ θεωρείται μια δευτερεύουσα πηγή εκπομπής ρύπων στους επιφανειακούς και υπόγειους υδάτινους πόρους (Ozkara A. et al., 2016). Μέσω του φαινομένου της κατακόρυφης έκπλυσης (leaching), τα φυτοφάρμακα μπορούν να μεταφερθούν σε υπόγεια ύδατα. Ακόμα μπορούν να μεταφερθούν σε επιφανειακά ύδατα μέσω του φαινομένου της επιφανειακής απορροής (run - off), κατά την διάρκεια των βροχοπτώσεων. Κατά το φαινόμενο της επιφανειακής απορροής, ένα μέρος του νερού της βροχής που πέφτει στο έδαφος εξατμίζεται άμεσα, ένα άλλο διηθείται μέσα στο έδαφος και το υπόλοιπο μέρος του νερού ρέει επιφανειακά. Συνεπώς τα

υπολείμματα των φυτοφαρμάκων μπορούν να ανιχνευθούν τόσο στη διαλυτή φάση όσο και στη σωματιδιακή φάση (ίζημα) (Zuthi M.F.R. et al., 2016). Τα φαινόμενα κατακόρυφης έκπλυσης και επιφανειακής απορροής εξαρτώνται από την διαλυτότητα των παρασιτοκτόνων στο νερό αλλά και την πολικότητά τους (Ozkara A. et al., 2016).

Με αυτό τον τρόπο τα παρασιτοκτόνα μεταφέρονται σε ποικίλα περιβαλλοντικά διαμερίσματα όπως είναι ο αέρας, το έδαφος, οι επιφανειακές και υπόγειες υδάτινες πηγές (Ozkara A. et al., 2016). Το δυναμικό αποδόμησης τους είναι αυτό που καθορίζει τη συμπεριφορά και την τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον. Η τύχη των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον απεικονίζεται στην Εικόνα 1. (Zuthi M.F.R. et al., 2016).



Εικόνα 1. Τύχη και αποδόμηση των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον (Zuthi M.F.R. et al., 2016).

Εκτός από την θανάτωση επιβλαβών εντόμων ή ζιζανίων, τα παρασιτοκτόνα είναι τοξικά και για ένα μεγάλο πλήθος άλλων οργανισμών της τροφικής αλυσίδας, συμπεριλαμβανομένων των πτηνών, των ψαριών, των ωφέλιμων εντόμων αλλά και του ανθρώπου (Aktar M.W. et al., 2009). Αρκετά από αυτά συσσωρεύονται στους ιστούς του σώματος και επιφέρουν ποικίλες επιπτώσεις (Ozkara A. et al., 2016). Κάθε χρόνο αναφέρονται περίπου τρία εκατομμύρια περιπτώσεις οξείας δηλητηρίασης του πληθυσμού, που επιφέρει τον θάνατο σε 250 με 370 χιλιάδες ανθρώπους ετησίως. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (Π.Ο.Υ.) έχει αναπτύξει ένα σύστημα ταξινόμησης, που ομαδοποιεί τα

φυτοφάρμακα σε 4 κύριες κατηγορίες σύμφωνα με τους πιθανούς κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου. Αυτές είναι (Damalas C.A. et al., 2011, Ozkara A. et al., 2016):

- Κατηγορία I_a: εξαιρετικά τοξικό (extremely hazardous)
- Κατηγορία I_b: υψηλής τοξικότητας (highly hazardous)
- Κατηγορία II: μέτρια τοξικότητα (moderately hazardous)
- Κατηγορία III: χαμηλή τοξικότητα (slightly hazardous)
- Κατηγορία U: προϊόν που δεν μπορεί να προκαλέσει οξεία τοξικότητα υπό φυσιολογικές συνθήκες (unlikely to present acute hazard)

Όπως γίνεται αντιληπτό, η αλόγιστη και λανθασμένη χρήση τους, αποτελεί μια σημαντική πηγή διάχυτης περιβαλλοντικής ρύπανσης (Fenner K et al., 2013). Η γνώση της παρουσίας αλλά και των επιπέδων τους σε διάφορα προϊόντα διατροφής, κρίνεται σημαντική για την προστασία του ανθρώπου αλλά και του οικοσυστήματος. Οι πωλήσεις και η εφαρμογή των φυτοφαρμάκων ελέγχονται αυστηρά στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες, ενώ τα τελευταία χρόνια οι κανονισμοί που αφορούν την αδειοδότηση, την εμπορία και χρήση τους έχουν γίνει πιο εκτεταμένοι και πιο αυστηροί (Νάννου X.I., 2018).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η παραγωγή τροφίμων επηρεάζεται σημαντικά από τα παράσιτα και τις ασθένειες που προσβάλλουν τα φυτά, οδηγώντας σε απώλειες έως και 40% της γεωργικής παραγωγής παγκοσμίως. Τα φυτοφάρμακα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον έλεγχο των παρασίτων και των ασθενειών και ως εκ τούτου προστατεύουν και προάγουν την παραγωγή (Prodhan M.D.H. et al., 2017). Έως και σήμερα, περισσότερα από 1000 διαφορετικά είδη φυτοφαρμάκων έχουν χρησιμοποιηθεί για αυτό το σκοπό. Αν και τα περισσότερα απομακρύνονται από τα προϊόντα και μεταφέρονται στο έδαφος, το νερό και την ατμόσφαιρα, ίχνη φυτοφαρμάκων μπορούν να μεταφερθούν στον άνθρωπο μέσω της τροφικής αλυσίδας, προκαλώντας δυνητικά προβλήματα υγείας. Στοχεύοντας στη διασφάλιση της παροχής ασφαλών προϊόντων, η Ευρωπαϊκή Ένωση αλλά και άλλοι οργανισμοί όπως είναι η Υπηρεσία Προστασίας του Περιβάλλοντος (United States Environmental Protection Agency, EPA), η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA European Union) και ο Κώδικας Τροφίμων (Codex Alimentarius), θεσπίζουν νομοθεσίες σχετικές με τα ανώτατα επιτρεπτά όρια των φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Τα όρια αυτά μετατρέπονται ολοένα και σε πιο αυστηρά εξαιτίας της αυξανόμενης ζήτησης των καταναλωτών για ασφαλή προϊόντα, αλλά και των επιστημονικών δεδομένων για την κατανομή και τις επιδράσεις των υπολειμμάτων στον άνθρωπο και στα ζώα (Perestrelo R. et al., 2019; Castillo M. et al., 2012).

Για τον έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα εμπορικά διαθέσιμα τρόφιμα, απαιτείται η ανάπτυξη αξιόπιστων αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού. Οι πολύ-υπολειμματικές μέθοδοι προσδιορισμού, που επιτρέπουν την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφορετικών φυτοφαρμάκων χρησιμοποιούνται επωφελώς για αυτό το σκοπό (Prodhan M.D.H. et al., 2017). Τυπικά στάδια προετοιμασίας του δείγματος αποτελούν η δειγματοληψία, η εκχύλιση και ο καθαρισμός του εκχυλίσματος. Μεταξύ αυτών, τα στάδια της εκχύλισης και του καθαρισμού, διαδραματίζουν τον σημαντικότερο ρόλο στον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων (Zhang L. et al., 2012).

Οι παραδοσιακές μέθοδοι εκχύλισης (π.χ. εκχύλιση υγρού-υγρού) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάλυση των φυτοφαρμάκων, ωστόσο χαρακτηρίζονται ως επίπονες και χρονοβόρες (Zhang L. et al., 2012). Ως εκ τούτου, νέες τεχνικές εκχύλισης

και καθαρισμού του εκχυλίσματος έχουν αναπτυχθεί. Σε αυτές συγκαταλέγονται η εκχύλιση πιεσιμένου υγρού (Pressurized liquid extraction, PLE), η εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού (Supercritical fluid extraction, SFE), η εκχύλιση με τη χρήση μικροκυμάτων (Microwave-assisted extraction, MAE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-phase extraction, SPE), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-phase microextraction, SPME), η εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης στο υπόστρωμα (Matrix solid phase dispersion, MSPD), η εκχύλιση με χρήση υπερήχων (Ultrasound-assisted extraction, UAE), η εκχύλιση σημείου νεφέλωσης (Cloud point extraction, CPE) και η εκχύλιση με χρήση ράβδου προσρόφησης (Stir bar sorptive extraction, SBSE). Κάθε τεχνική εμφανίζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματά, συνεπώς η εφαρμογή της εξαρτάται κυρίως από ιδιότητες του υποστρώματος και από το είδος των φυτοφαρμάκων που προσδιορίζονται (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Έως και σήμερα, δεν υπάρχει μια καθολική διεθνώς αποδεκτή πολύ-υπολειμματική μέθοδος προσδιορισμού των φυτοφαρμάκων (Ahmed F.E., 2001). Ωστόσο πραγματοποιούνται συνεχείς προσπάθειες για την εύρεση μεθόδων που διέπονται από ταχύτητα, ακρίβεια, εκλεκτικότητα, ευαισθησία και αυτοματοποίηση (Sobhanzadeh E. et al., 2009).

2.2. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

2.2.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

Η εκχύλιση Υγρού-Υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE) αποτελεί μια από τις παλαιότερες και πιο κλασσικές τεχνικές εκχύλισης. Χρησιμοποιούταν ευρέως στη κατά την ανάλυση υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων, ενώ εφαρμόζεται τόσο σε υδατικά όσο και σε ομογενοποιημένα στερεά δείγματα (Zhang L. et al., 2012). Η LLE στηρίζεται στη κατανομή των ενώσεων μεταξύ δυο μη αναμίξιμων ή μερικώς αναμίξιμων διαλυτών. Οι δύο διαλύτες, ένας πολικός και ένας μη πολικός συνήθως οργανικός διαλύτης, έρχονται σε πλήρη επαφή μεταξύ τους και στη συνέχεια διαχωρίζονται ξανά (Prodhan M.D.H. et al., 2017). Τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται φυγοκεντρώνονται, συμπυκνώνονται ή επέρχονται από ένα στάδιο καθαρισμού και στη συνέχεια οι εκχυλιζόμενες ενώσεις προσδιορίζονται με χρωματογραφικές τεχνικές. Οι Nguyen et al. (2010), χρησιμοποίησαν την φυγοκέντρωση, τη ψύξη στους -20°C για 6 ώρες και την εκχύλιση διασποράς στερεάς

φάσης (d-SPE) ως τεχνικές καθαρισμού του εκχυλίσματος με σκοπό τη μείωση των συνεκχυλιζόμενων συστατικών (παρεμποδίσεων) (Zhang L. et al., 2012).

Η αποτελεσματικότητα της LLE εξαρτάται από την επιλογή του διαλύτη εκχύλισης, από το υπόστρωμα και από το βαθμό διαλυτότητας των αναλυτών. Διαλύτες όπως είναι το εξάνιο, το βενζόλιο και ο οξικός αιθυλεστέρας (EtAc) έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση μη πολικών φυτοφαρμάκων αλλά και άλλων μη πολικών ενώσεων. Άλλοι διαλύτες όπως είναι το διγλωρομεθάνιο, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο (MeCN) και η ακετόνη έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων από προϊόντα υψηλής υγρασίας (Ahmed F.E., 2001). Όσον αφορά τον διαιθυλαιθέρα, ο ίδιος χρησιμοποιείται σπάνια για την ανάλυση φυτοφαρμάκων με την τεχνική LLE, καθώς έχει χαμηλό σημείο ανάφλεξης και υψηλή τάση σχηματισμού εκρηκτικών υπεροξειδίων (Zhang L. et al., 2012).

Παρόλο που η LLE είναι απλή στην διεξαγωγή της, παρουσιάζει ποικίλα μειονεκτήματα. (Zhang L. et al., 2012). Στα κύρια μειονεκτήματά της συγκαταλέγονται οι μεγάλοι όγκοι διαλυτών που χρησιμοποιεί, ο σχηματισμός γαλακτωμάτων, για την διάσπαση των οποίων απαιτούνται επιπλέον βήματα επεξεργασίας του εκχυλίσματος (π.χ. προσθήκη άλατος, οξέος κ.α.) καθώς και η παραγωγή μεγάλης ποσότητας αποβλήτων. Ακόμα χαρακτηρίζεται ως μια επίπονη και χρονοβόρα τεχνική εκχύλισης (Ahmed F.E., 2001). Με σκοπό τον περιορισμό των μειονεκτημάτων που εμφανίζονται κατά την εφαρμογή της LLE, αναπτύχθηκε η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid-phase microextraction, LPME) (Zhang L. et al., 2012).

Η LPME διακρίνεται στην μικροεκχύλιση σταγόνας (single-drop microextraction, SDME), στην μικροεκχύλιση υγρής φάσης σε κοίλη-ίνα (hollow fiber-based liquid-phase microextraction, HF-LPME) και στην μικροεκχύλιση διασποράς υγρού-υγρού (dispersive liquid-liquid microextraction, DLLME). Η SDME χρησιμοποιεί ως φάση δέκτη μια μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη, μη αναμίξιμο με το νερό, η οποία αιωρείται στο υδατικό διάλυμα του δότη. Από την άλλη η HF-LPME βασίζεται στη χρήση μιας πορώδους κοίλης μεμβράνης, η οποία συνδέεται από την μία άκρη με μια μικροσύριγγα και προσδίδει ένα προστατευτικό χαρακτήρα στην οργανική φάση, ενώ χρησιμεύει ως μια μεσο-επιφάνεια μεταξύ των φάσεων του δότη και του δέκτη. Η DLLME βασίζεται στη χρήση ενός τριαδικού διαλυτικού συστήματος. Αυτό αποτελείται από ένα υδατικό διάλυμα που περιέχει τις προσδιοριζόμενες ενώσεις και από ένα μίγμα του διαλύτη εκχύλισης, μη αναμίξιμο με το νερό, και του διαλύτη διασποράς, αναμίξιμο με το νερό. Οι τεχνικές αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την εκχύλιση υπολειμμάτων

φυτοφαρμάκων. Στα κύρια πλεονεκτήματά τους συγκαταλέγονται η ταχύτητα και η απλότητά τους, η χαμηλή κατανάλωση οργανικών διαλυτών, οι υψηλοί παράγοντες εμπλουτισμού και τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που προσφέρουν. Η DLLME εφαρμόζεται πιο συχνά για τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων, πιθανώς λόγω του γεγονότος ότι είναι πιο απλή σε σύγκριση με τις SDME και HF-LPME (Zhang L. et al., 2012). Ωστόσο παρουσιάζει χαμηλή απόδοση εκχύλισης και μικρή εκλεκτικότητα των οργανικών διαλυτών εκχύλισης έναντι όλων των κατηγοριών παρασιτοκτόνων, δημιουργώντας περιορισμούς στην καθολική εφαρμογή της. Ακόμα θα πρέπει η πυκνότητα του διαλύτη εκχύλιση να είναι σημαντικά διαφορετική από αυτή του νερού, με σκοπό να πραγματοποιηθεί ο διαχωρισμός των φάσεων.

2.2.2. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid-phase extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μια γρήγορη, αξιόπιστη και εκλεκτική τεχνική προ-κατεργασίας δειγμάτων, που έχει αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό την LLE (Prodhan M.D.H. et al., 2017). Ξεκίνησε να αναπτύσσεται στα μέσα της δεκαετίας του 1970 εξελίσσεται διαρκώς και εφαρμόζεται για την εκλεκτική απομόνωση, παραλαβή και προσυγκέντρωση των επιθυμητών ενώσεων, τόσο από υδατικά όσο και από στερεά δείγματα (Zhang L. et al., 2012). Παραδείγματα αυτών αποτελούν τα ούρα, το αίμα, το νερό, τα φρούτα, τα λαχανικά, το χώμα και οι ζωικοί ιστοί (Prodhan M.D.H. et al., 2017). Η SPE λαμβάνει χώρα σε μικροστήλες ή δίσκους εκχύλισης και τα βασικά στάδια της περιλαμβάνουν (Zhang L. et al., 2012):

- την ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού με τη χρήση κατάλληλων διαλυτών
- τη φόρτωση του δείγματος και τη δέσμευση των αναλυτών στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού
- την έκπλυση του δείγματος με κατάλληλους διαλύτες, για την απομάκρυνση ανεπιθύμητων συστατικών
- την έκλυση του δείγματος με κατάλληλο διαλύτη ή μίγματα διαλυτών, για τη λήψη καθαρών εκχυλισμάτων που περιέχουν τους αναλυτές

Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες μεταξύ των οποίων συγκαταλέγονται το pH του διαλύματος, ο τύπος και η ισχύς του διαλύτη έκπλυσης, η πολικότητα και ο ρυθμός ροής του διαλύτη έκλυσης, καθώς επίσης και τα

φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του προσροφητικού υλικού (Lambropoulou D.A. et al., 2007).

Το pH του διαλύματος θεωρείται σημαντικός παράγοντας εξάρτησης της αποτελεσματικότητας της SPE, καθώς καθορίζει την σταθερότητα και τον ιοντισμό των αναλυτών. Σε αρκετές περιπτώσεις είναι απαραίτητη η τροποποίηση του pH, με σκοπό την αύξηση της σταθερότητας των φυτοφαρμάκων και την εξασφάλιση της κατακράτησης αυτών, στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού μέσω υδρόφοβων ή ιοντικών αλληλεπιδράσεων (Zhang L. et al., 2012). Όσον αφορά τα προσροφητικά υλικά, η επιλογή του κατάλληλου για την SPE, εξαρτάται κατά κύριο λόγο, από την κατανόηση του μηχανισμού αλληλεπίδρασης μεταξύ του προσροφητικού υλικού και των προσδιοριζόμενων ενώσεων, καθώς επίσης και από το υπόστρωμα του τροφίμου (Lambropoulou D.A. et al., 2007; Ahmed F.E., 2001). Τα προσροφητικά υλικά συμβάλλουν στην απόδοση εμπλουτισμού και στη μείωση του όγκου των οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται (Sobhanzadeh E. et al., 2009). Παραδείγματα αυτών αποτελούν, τα υλικά με προσδεσμένη αλυσίδα C₁₈ σε σίλικα, οι SDB και το GCB (Zhang L. et al., 2012).

Εκτός από το προσροφητικό υλικό, η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη έκλυσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο, στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της SPE. Οι διαλύτες επιλέγονται με γνώμονα την απόδοση της εκχύλισης, τη τοξικότητά τους, τη συμβατότητά τους με το χρωματογραφικό σύστημα, καθώς και με βάση τον όγκο του διαλύτη που απαιτείται, για την επίτευξη του επιθυμητού αποτελέσματος (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Ως διαλύτες εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί ο οξικός αιθυλεστέρας, η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη, το διχλωρομεθάνιο καθώς και μίγματα αυτών (Sobhanzadeh E. et al., 2009). Όσον αφορά τον διαλύτη έκλυσης, αυτός πρέπει να είναι κατάλληλος για να αποφευχθεί η εκρόφιση των φυτοφαρμάκων από το προσροφητικό υλικό, κατά το στάδιο της έκπλυσης (Zhang L. et al., 2012).

Η SPE έχει αποκτήσει ευρεία αποδοχή, χάρη στην απλότητα, το χαμηλό όγκο διαλυτών που χρησιμοποιεί και τις υψηλές ανακτήσεις που προσφέρει (Ahmed F.E., 2001; Lambropoulou D.A. et al., 2007). Ακόμα παρέχει απλή πειραματική διάταξη και επεκτείνει τη διάρκεια ζωής του χρωματογραφικού συστήματος (Prodhan M.D.H. et al., 2017). Τα εκχυλίσματα που λαμβάνονται είναι υψηλής καθαρότητας, ενώ υψηλή χαρακτηρίζεται και η ταχύτητα εκχύλισης των αναλυτών (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Σε σύγκριση με την LLE, η SPE αποτρέπει το σχηματισμό γαλακτώματος, συμβάλλει στην ταυτόχρονη ανάλυση πολλαπλών δειγμάτων ενώ είναι δυνατή και η αυτοματοποίησή της (Zanella R. et

al., 2012). Στα μειονεκτήματα της τεχνικής συγκαταλέγονται, η διαδικασία επιλογής των προσροφητικών υλικών και του διαλύτη έκλουσης, που χαρακτηρίζεται ως χρονοβόρες, καθώς και το γεγονός ότι οι εμπορικά διαθέσιμες μικροστήλες SPE, είναι μιας χρήσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση του κόστους των αναλύσεων (Zhang L. et al., 2012).

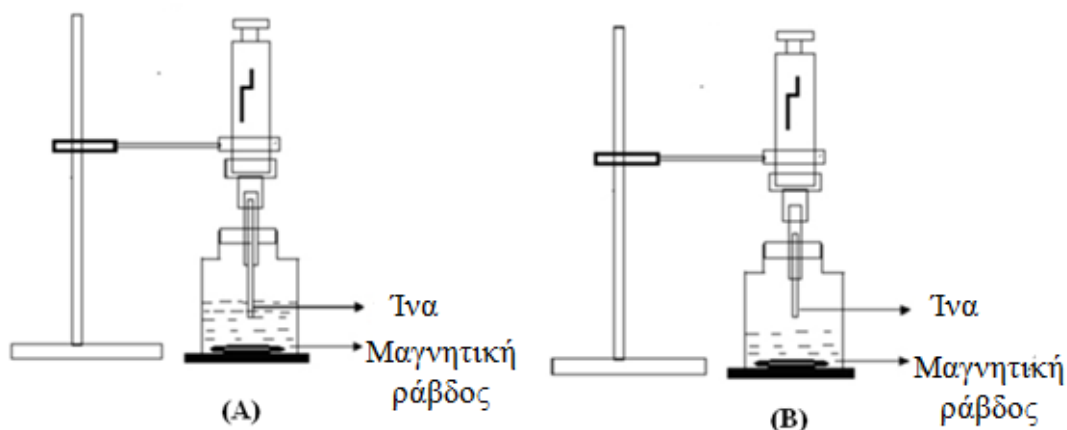
2.2.3. ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid-phase microextraction, SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), αναπτύχθηκε για πρώτη φορά το 1989 από τους Pawliszyn et al. Αποτελεί μια γρήγορη, απλή, εύκολα αυτοματοποιημένη και χωρίς χρήση διαλυτών, τεχνική προ-κατεργασίας του δείγματος (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Διαφορετικά είδη αναλυτών, συμπεριλαμβανομένων των πτητικών και μη πτητικών ενώσεων, μπορούν να εκχυλιστούν από μια ποικιλία υποστρωμάτων (Prodhan M.D.H. et al., 2017). Η SPME παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα έναντι άλλων συμβατικών τεχνικών, καθώς συνδυάζει την ταυτόχρονη εκχύλιση και προ-συγκέντρωση των επιθυμητών ενώσεων και την άμεση μεταφορά αυτών, στο χρωματογραφικό σύστημα (Zhang L. et al., 2012).

Η SPME περιλαμβάνει δύο στάδια: α) την προσρόφηση (κατανομή) των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο υλικό επίστρωσης της ίνας και β) την εκρόφησή τους η οποία μπορεί να είναι θερμική ή με έκλουση διαλύτη (Ahmed F.E., 2001). Οι επιθυμητές ενώσεις προσροφώνται εκλεκτικά σε μια ίνα από τηγμένο πυρίτιο, που έχει επιστρωθεί με πολυμερικό υλικό (στατική φάση) (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Η ίνα, προσαρμόζεται σε μια μικροσύριγγα για να προστατεύεται κατά τη μεταφορά της από το δείγμα, στο χρωματογραφικό σύστημα και το αντίστροφο. Η ίνα εκτίθεται στο υδατικό ή αέριο δείγμα έως ότου επέλθει ισορροπία κατανομής της προς ανάλυση ένωσης, μεταξύ του δείγματος και της ίνας. Στη συνέχεια οι αναλύτες εκροφώνται είτε μέσω της θερμικής ενέργειας της θύρας έγχυσης του αέριου χρωματογράφου, είτε με τη βοήθεια διαλυτών της κινητής φάσης, στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας (Zhang L. et al., 2012).

Υπάρχουν δύο βασικά είδη δειγματοληψίας της SPME. Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης άμεσης βύθισης (direct immersion- solid phase microextraction, DI-SPME) και η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης κεφαλής υπερκείμενου αέριου χώρου (headspace-solid phase microextraction, HS-SPME). Κατά την HS-SPME, η ίνα εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο πάνω από ένα αέριο, υγρό ή στερεό δείγμα. Στον αντίποδα, η DI-SPME βασίζεται στην εμβάπτιση της ίνας απευθείας σε καθαρά δείγματα. Η ίνα πολυ-διμεθυλο-σιλοξάνιο (polydimethylsiloxane, PDMS) έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στις εφαρμογές HS-

SPME, καθώς είναι ένα υψηλής χωρητικότητας και επιτρέπει την συλλογή μεγάλου εύρους αναλυτών (Sobhanzadeh E. et al., 2009). Στην Εικόνα 2. απεικονίζεται η πειραματική διάταξη της DI-SPME και της HS-SPME (Zhang L. et al., 2012).



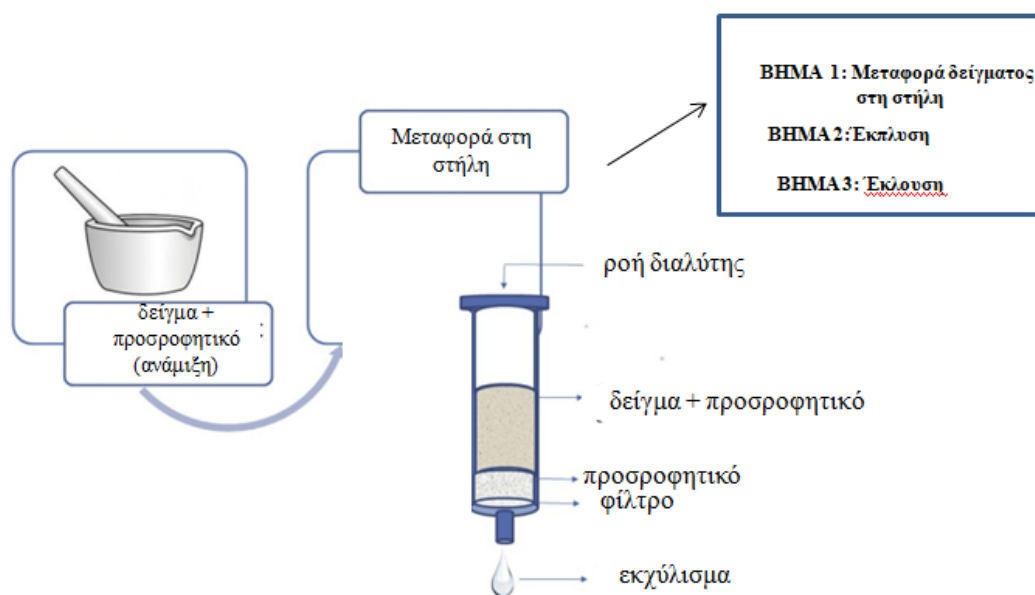
Εικόνα 2. Πειραματική διάταξη της DI-SPME (A) και της HS-SPME (B) (Zhang L. et al., 2012).

Η ευαισθησία και η αποτελεσματικότητα της τεχνικής εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες (π.χ. χρόνος και θερμοκρασία εκχύλισης, τύπος ίνας), ωστόσο φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά, από την ιοντική ισχύ και από το pH του δείγματος (Ahmed F.E., 2001; Zhang L. et al., 2012). Στα πλεονεκτήματα της SPME συγκαταλέγονται η καλή αναλυτική απόδοση, η απλότητα και το χαμηλό κόστος διεξαγωγής καθώς επίσης και η εξάλειψη της χρήσης οργανικών διαλυτών (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Ακόμα η ίνα από τηγμένο πυρίτιο μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί αρκετές φορές, ωστόσο είναι εύθραυστη και έχει υψηλό κόστος απόκτησης (Sobhanzadeh E. et al., 2009). Ένα εγγενές μειονέκτημα της τεχνικής, είναι η μεγαλύτερη διάρκεια της εκχύλισης. Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η εξισορρόπηση των αναλυτών μεταξύ του δείγματος και της ίνας, μπορεί να διαρκέσει έως και 1 ώρα. Ωστόσο τεχνικές όπως είναι η εφαρμογή υπερήχων, δόνησης και περιστροφής ινών και η ανάδευση έχουν χρησιμοποιηθεί για την μείωση του χρόνου εκχύλισης (Lambropoulou D.A. et al., 2007).

2.2.4. ΕΧΥΛΙΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΣΤΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ (*Matrix solid phase dispersion, MSPD*)

Η εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης στο υπόστρωμα (MSPD) χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τους Barker et al. (1989), για την εκχύλιση καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων από βιολογικά υποστρώματα, όπως είναι το ήπαρ και οι μύες. Με την πάροδο του χρόνου, αρκετοί συγγραφείς κατέδειξαν την δυνατότητα εφαρμογής της MSPD, για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων αλλά και άλλων ενώσεων σε φρούτα και λαχανικά (Hoff R.B. et al., 2018).

Η εκχύλιση MSPD παρουσιάζει πολλές ομοιότητες με την τεχνική SPE. Η κύρια διαφορά τους έγκεινται στο γεγονός ότι η MSPD, βρίσκει κυρίως εφαρμογή, στην κατεργασία στερεών δειγμάτων ή υγρών με υψηλό ιξώδες. Η MSPD βασίζεται, στην ομογενοποίηση του δείγματος με κατάλληλο προσροφητικό υλικό (στερεά φάση) και στη μεταφορά του μίγματος σε μικροστήλη, για έκπλυση και παραλαβή του εκχυλίσματος. Η ομογενοποίηση του δείγματος γίνεται χειροκίνητα, ενώ το προσροφητικό υλικό μεταβάλλει τη δομή του υποστρώματος, επιτρέπει την κλασμάτωση του δείγματος και συγκρατεί τις επιθυμητές ενώσεις (Lambropoulou D.A. et al., 2007; Zanella R. et al., 2012). Η έκπλυση χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων του υποστρώματος, ενώ η παραλαβή του εκχυλίσματος επιτυγχάνεται με τη χρήση κατάλληλων οργανικών διαλυτών. Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι η εκχύλιση και ο καθαρισμός του δείγματος, πραγματοποιείται στο ίδιο βήμα, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο το χρόνο ανάλυσης και την ποσότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται (Ahmed F.E., 2001). Στην Εικόνα 3 απεικονίζονται τα στάδια προκατεργασίας του δείγματος με τη χρήση της MSPD (Hoff R.B. et al., 2018).



Εικόνα 3. Στάδια προκατεργασίας του δείγματος με τη χρήση της τεχνικής MSPD (Hoff R.B. et al., 2018).

Τα κυριότερα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή της MSPD, είναι η σίλικα με πρόσδεση (C_8 , C_{18}) και το Florisil. Το Florisil είναι πολυμερές πυριτικού μαγνησίου και χρησιμοποιείται ως πληρωτικό υλικό εξαιτίας της υψηλής εκλεκτικότητάς του. Ο λιπόφιλος χαρακτήρας των C_8 και C_{18} , επιτρέπει την συγκράτηση λιπόφιλων ενώσεων (Sobhanzadeh E. et al., 2009). Αδρανή προσροφητικά όπως είναι η γη διατόμων, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων από χυμούς φρούτων και λιπαρά τρόφιμα, καθώς επιτρέπουν την πρόωρη έκλυση των συν-εκχυλιζόμενων ενώσεων. Κατά γενικό κανόνα, η επιλογή του προσροφητικού υλικού, εξαρτάται από την πολικότητα του αναλυτή και τις παρεμβολές του υποστρώματος (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Είναι σημαντικό να επιλεγεί η σωστή αναλογία δείγματος : προσροφητικού υλικού για την αποτελεσματική διασπορά του δείγματος στο προσροφητικό. Η αναλογία συνήθως κυμαίνεται από 1:1 έως 1:4 (Zhang L. et al., 2012).

Ο διαλύτης έκλυσης θεωρείται επίσης σημαντικός παράγοντας, για την αποτελεσματική εκρόφηση των φυτοφαρμάκων από το προσροφητικό υλικό και για την αποτελεσματική κατακράτηση των παρεμποδίσεων στη στήλη. Ως διαλύτες έκλυσης έχουν χρησιμοποιηθεί η μεθανόλη, το ακετονιτρίλιο, η ακετόνη, το διχλωρομεθάνιο και μίγματα αυτών (Zhang L. et al., 2012). Ακόμα, συχνή είναι και η χρήση διαλυτών που περιέχουν μυρμηκικό ή οξικό οξύ στην σύνθεσή τους, για τη ρύθμιση του pH. Αν και ορισμένα εκχυλίσματα MSPD είναι αρκετά καθαρά για άμεση ανάλυση, συχνά απαιτείται

ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού. Ακόμα σε ορισμένες περιπτώσεις, τα εκχυλίσματα συμπυκνώνονται για να βελτιώσουν την ευαισθησία της τεχνικής. Για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας της MSPD, είναι απαραίτητος και ο έλεγχος της ροής του διαλύτη έκλουσης (Hoff R.B. et al., 2018).

Η εκχύλιση MSPD παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, σε σχέση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης. Είναι απλή και ταχεία τεχνική με χαμηλό κόστος διεξαγωγής. Απαιτεί μικρή ποσότητα διαλυτών (συνήθως 5-10 mL), συμβάλλει στην εξάλειψη του σχηματισμού γαλακτώματος ενώ έχει υψηλή αξιοπιστία, εκλεκτικότητα και ευαισθησία. Ωστόσο, ως κύριο πλεονέκτημά της, θεωρείται η ταυτόχρονη εκχύλιση και ο καθαρισμός των δειγμάτων (Lambropoulou D.A. et al., 2007; Zanella R. et al., 2012). Στον αντίποδα στα κύρια μειονεκτήματά της συγκαταλέγεται η χειροκίνητη ομογενοποίηση του δείγματος, η οποία εξαρτάται από παραμέτρους όπως είναι η δύναμη και η τεχνική που εφαρμόζεται από τον αναλυτή. Ακόμα, η έλλειψη αυτοματισμού της διαδικασίας θεωρείται μειονέκτημά της, ωστόσο έχουν πραγματοποιηθεί προσπάθειες για ανάπτυξη αυτοματοποιημένης ή ημι-αυτοματοποιημένης MSPD (Hoff R.B. et al., 2018; Zanella R. et al., 2012).

2.2.5. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΠΕΡΙΣΤΡΕΦΟΜΕΝΗΣ ΡΑΒΔΟΥ ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (Stir bar sorptive extraction, SBSE)

Η εκχύλιση με χρήση ράβδου προσρόφησης (SBSE), αποτελεί μια τεχνική μικροεκχύλισης που εμφανίζει πολλές ομοιότητες με την SPME, αλλά έχει μεγαλύτερη ικανότητα εκχύλισης – απομόνωσης των αναλυτών. Αναπτύχθηκε αρχικά για την εκχύλιση οργανικών αναλυτών, από υδατικά υποστρώματα. Η SBSE βασίζεται στη χρήση μιας μαγνητικής ράβδου ανάδευσης, που είναι επικαλυμμένη με πολυμερικό υλικό (π.χ. πολυδιμεθυλο-σιλοξάνη (PDMS)). Η ράβδος ανάδευσης τοποθετείται στο δείγμα και οι αναλύτες προσροφώνται στην επιφάνειά της, καθώς το δείγμα αναδεύεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Ακολουθεί απομάκρυνση της ράβδου από το δείγμα και εκρόφηση των αναλυτών, είτε σε μονάδα θερμοκτικής εκρόφησης αέριου χρωματογράφου, είτε με τη χρήση διαλύτη στην περίπτωση εφαρμογής της υγρής χρωματογραφίας (Lambropoulou D.A. et al., 2007).

Όπως και στην SPME έτσι και στην SBSE, οι κύριοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου είναι ο τύπος και το πάχος του υλικού επικάλυψης της ράβδου ανάδευσης, ο χρόνος εκχύλισης, το pH και ο όγκος του δείγματος,

η παρουσία οργανικών διαλυτών καθώς και ο ρυθμός ανάδευσης. Όσο μεγαλύτερο είναι το πάχος του υλικού επίστρωσης, τόσο μεγαλύτερη είναι και η απόδοση της ράβδου έναντι των πολικών ενώσεων. Ωστόσο, η εκχύλιση των μη πολικών ή χαμηλής πολικότητας αναλυτών, δεν επηρεάζεται από το πάχος του υλικού επίστρωσης. Όσον αφορά το pH και την ιοντική ισχύ του διαλύματος, αυτή πρέπει να ρυθμιστεί κατάλληλα, με στόχο τη παρουσία των αναλυτών στη μη ιοντική τους μορφή, για την αποτελεσματικότερη προσρόφιση στο υλικό επίστρωσης της ράβδου. Η ρύθμιση του pH στην περιοχή 3-9 είναι επίσης απαραίτητη, για να αποφευχθεί η υποβάθμιση του υλικού επίστρωσης. Η προσθήκη αδρανών αλάτων, όπως είναι το χλωριούχο νάτριο, μεταβάλλει την ιοντική ισχύ του δείγματος και βελτιώνει την εκχύλιση, μειώνοντας την διαλυτότητα των πολικών ενώσεων (φαινόμενο salting-out)(Abdulra'uf L.B. et al., 2014).

Η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται επίσης και από το ρυθμό ανάδευσης και τη θερμοκρασία εκχύλισης. Υψηλοί ρυθμοί ανάδευσης, μεγαλύτεροι των 750 rpm, μπορούν να οδηγήσουν στο σχηματισμό φυσαλίδων αέρα στην επιφάνεια του διαλύματος. Παράλληλα μπορούν να μειώσουν το πάχος του υλικού επίστρωσης της ράβδου, εξαιτίας του φαινομένου της τριβής που εμφανίζεται μεταξύ της μαγνητικής ράβδου και των τοιχωμάτων του γυάλινου δοχείου (Abdulra'uf L.B. et al., 2014). Όσον αφορά την θερμοκρασία εκχύλισης, η αύξηση αυτής, αυξάνει την κατανομή των αναλυτών στην υδατική φάση, μειώνοντας την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Επίσης με την αύξηση της θερμοκρασίας μειώνεται η διάρκεια ζωής της μαγνητικής ράβδου. Συνεπώς, ανάλογα με τη φύση των αναλυτών και τη φύση του δείγματος, είναι απαραίτητη η εύρεση βέλτιστης θερμοκρασίας διεξαγωγής της SBSE (Prieto A. et al., 2010).

Η SBSE εξαρτάται επίσης από τον όγκο του δείγματος και την παρουσία οργανικών διαλυτών. Υψηλοί όγκοι δείγματος αυξάνουν τη χρωματογραφική απόκριση των μη πολικών αναλυτών, ενώ δεν επηρεάζουν σημαντικά την ανάλυση των πολικών φυτοφαρμάκων (Prieto A. et al., 2010). Η εκχύλιση των πολικών ενώσεων επηρεάζεται επίσης από την παρουσία οργανικών διαλυτών στο διάλυμα, όπως είναι η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Ο υψηλός όγκος διαλύτη, μπορεί δυνητικά να οδηγήσει στη λήψη χαμηλών ανακτήσεων των πολικών φυτοφαρμάκων καθώς μειώνει την συγγένειά τους με τη μαγνητική ράβδο (Abdulra'uf L.B. et al., 2014).

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της χρήσης της SBSE, είναι η χαμηλή κατανάλωση οργανικών διαλυτών. Ακόμα προσφέρει χαμηλά όρια ανίχνευσης, καθαρότερα εκχυλίσματα, ενώ είναι πιο ακριβής και πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με την SPME. Η εφαρμογή της ως πολυ-υπολειμματική μέθοδος προσδιορισμού φυτοφαρμάκων

είναι περιορισμένη, εξαιτίας των μειονεκτημάτων που εμφανίζονται κατά το στάδιο της εκρόφησης των αναλυτών. Όλοι οι αναλύτες δεν μπορούν να εκροφηθούν απευθείας στη θύρα έγχυσης ενός αέριου χρωματογράφου, καθώς πρέπει να προηγηθεί η εκχύλιση αυτών σε κατάλληλο διαλύτη. Το γεγονός αυτό, προσθέτει ένα επιπλέον βήμα στην συνολική αναλυτική τεχνική, αυξάνοντας το χρόνο διεξαγωγής της. Για να αποφευχθεί αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια ειδικά σχεδιασμένη μονάδα θερμικής εκρόφησης. (Sobhanzadeh E. et al., 2009; Lambropoulou D.A. et al., 2007).

2.2.6. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΟΥ ΡΕΥΣΤΟΥ (*Supercritical fluid extraction, SFE*)

Η τεχνική της εκχύλισης υπερκρίσιμου ρευστού, όπως υποδηλώνει και το όνομά της, πραγματοποιείται με τη βοήθεια υπερκρίσιμων ρευστών, τα οποία χρησιμοποιούνται ως διαλύτες εκχύλισης, για τη λήψη ενός συστατικού ή μιας ομάδας επιθυμητών αναλυτών από το υπόστρωμα. Η SFE, είναι πιο αποτελεσματική στην εξαγωγή των αναλυτών από στερεά υποστρώματα, ωστόσο έχει εφαρμοστεί και σε υδατικά υποστρώματα (Prodhan M.D.H. et al., 2017).

Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών διαφέρουν από εκείνες των διακριτών φάσεων υγρού και αερίου. Πιο συγκεκριμένα, τα υπερκρίσιμα ρευστά έχουν παρόμοια πυκνότητα με τα υγρά, αλλά χαμηλότερο ιξώδες και υψηλότερους συντελεστές διάχυσης (Ahmed F.E., 2001). Οι ιδιότητες αυτές, επιτρέπουν στα ρευστά να διαχέονται ως αέρια, μέσω στερεών υποστρωμάτων και να διαλύουν ως υγρά, τους αναλύτες (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Συνεπώς μπορούν να θεωρηθούν ως υποκατάστατα των οργανικών διαλυτών. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂), είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο υπερκρίσιμο ρευστό, για την εκχύλιση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων από τα τρόφιμα. Η επιλογή του CO₂ οφείλεται, στην κρίσιμη θερμοκρασία (31,2 °C) και πίεσή του (72,8 atm) καθώς και στο γεγονός ότι είναι μη τοξικό, μη εύφλεκτο, έχει χαμηλό οικονομικό κόστος, υψηλό βαθμό καθαρότητας και διατίθεται εύκολα στο εμπόριο (Lambropoulou D.A. et al., 2007; Ahmed F.E., 2001; (Zhang L. et al., 2012).

Ως μη πολικός διαλύτης, το CO₂ είναι αποτελεσματικό για την εξαγωγή μη πολικών και χαμηλής πολικότητας φυτοφαρμάκων. Για το λόγο αυτό, κατά την εκχύλιση φυτοφαρμάκων υψηλής πολικότητας (π.χ. methamidophos, amethoate), η προσθήκη πολικών τροποποιητών, όπως είναι η μεθανόλη και το νερό, κρίνεται απαραίτητη (Ahmed

F.E., 2001). Οι τροποποιητές μεταβάλλουν την πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης, ενισχύουν την ισχύ του υπερκρίσιμου διοξειδίου του άνθρακα και διευρύνουν τα όρια του πεδίου εφαρμογής της SFE (Sobhanzadeh E. et al., 2009). Κατά την χρήση της εκχύλισης SFE με διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) συχνά λαμβάνει χώρα και συνεκχύλιση άλλων ανεπιθύμητων μη πολικών ενώσεων. Για παράδειγμα σε τρόφιμα με υψηλή λιποπεριεκτικότητα και άλλα σύνθετα υποστρώματα, είναι δυνατή η συν-εκχύλιση λιπιδίων και σακχάρων. Συνεπώς σε αυτή τη περίπτωση, ένα στάδιο καθαρισμού του εκχυλίσματος πριν τον προσδιορισμό των αναλυτών, είναι απαραίτητο (Lambropoulou D.A. et al., 2007).

Σε σύγκριση με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης με διαλύτη, η SFE προσφέρει εκχυλίσματα υψηλότερης καθαρότητας σε μικρότερο χρονικό διάστημα, ενώ χρησιμοποιεί μικρότερους όγκους διαλυτών. Ακόμα χαρακτηρίζεται από υψηλή εκλεκτικότητα, ενώ είναι τεχνική φιλική προς το περιβάλλον (Zhang L. et al., 2012; Zanella R. et al., 2012). Παρά τα αποδεδειγμένα πλεονεκτήματά της, το υψηλό κόστος εξοπλισμού και οι συνθήκες λειτουργίας της SFE, έχουν περιορίσει την εφαρμογή της σε ορισμένα πεδία τροφίμων (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Ακόμα ο μικρός όγκος του εκχυλίσματος που λαμβάνεται, θεωρείται μειονέκτημα της SFE, στην περίπτωση που απαιτείται υψηλότερη μάζα δείγματος (Ahmed F.E., 2001).

2.2.7. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΚΥΜΑΤΩΝ (*Microwave assisted extraction, MAE*)

Ως τεχνική ταχείας εκχύλισης, η εκχύλιση με τη χρήση των μικροκυμάτων χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1986 (Zhang L. et al., 2012). Διαφορετική από τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, η MAE χρησιμοποιεί την ενέργεια των μικροκυμάτων ως πηγή θερμότητας, για την παραλαβή των αναλυτών από στερεά υποστρώματα (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Κατά την εφαρμογή της, τα δείγματα τροφίμων εκχυλίζονται με συμβατικούς διαλύτες και ακτινοβολούνται για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια, αποτρέποντας τον βρασμό του εναιωρήματος. Το στάδιο της ακτινοβολήσης επαναλαμβάνεται με σκοπό τη λήψη της μέγιστης δυνατής απόδοσης. Ακολουθεί ένα στάδιο καθαρισμού του εκχυλίσματος, και το υπερκείμενο που λαμβάνεται οδηγείται στο χρωματογραφικό σύστημα (Ahmed F.E., 2001).

Σε αντίθεση με την κλασσική θέρμανση, τα μικροκύματα θερμαίνουν ταυτόχρονα ολόκληρο το δείγμα του τροφίμου, χωρίς να προηγηθεί η θέρμανση του δοχείου μεταφοράς. Με αυτό τον τρόπο, μειώνεται ο απαιτούμενος χρόνος εκχύλισης

(Lambropoulou D.A. et al., 2007). Η MAE εφαρμόζεται κατά κύριο λόγο για την εκχύλιση θερμικά σταθερών ενώσεων, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί δυνητικά να οδηγήσει σε υποβάθμιση των θερμικά ασταθών αναλυτών (Sobhanzadeh E. et al., 2009). Έχει παρατηρηθεί ότι οι ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων αυξάνονται, όταν η ισχύς των μικροκυμάτων κυμαίνεται από 20 έως 80 Watt, ενώ οι ανακτήσεις παραμένουν σχεδόν αμετάβλητες, σε ένα εύρος ισχύς των 80-100 Watt (Zhang L. et al., 2012).

Εκτός από την ισχύ των μικροκυμάτων, άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της MAE είναι οι ιδιότητες και ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, ο χρόνος εκχύλισης και το υπόστρωμα τροφίμου από το οποίο εκχυλίζονται τα φυτοφάρμακα. Οι διαλύτες εκχύλισης που χρησιμοποιούνται συνήθως έχουν υψηλή διηλεκτρική σταθερά, για να απορροφούν αποτελεσματικά την ενέργεια των μικροκυμάτων. Παραδείγματα αυτών αποτελούν η μεθανόλη, η αιθανόλη και το νερό. Μη πολικοί διαλύτες με χαμηλές διηλεκτρικές σταθερές, όπως είναι το εξάνιο και το τουλουόλιο, δεν χρησιμοποιούνται συχνά κατά την MAE. Ωστόσο μίγματα αυτών με πολικούς διαλύτες (π.χ. εξάνιο-ακετόνη), ενδείκνυνται για την αποτελεσματική εκχύλιση διαφόρων αναλυτών. Όσον αφορά τον όγκο του διαλύτη, αυτός πρέπει να είναι επαρκής για να διασφαλιστεί η πλήρης διαβροχή του δείγματος σε αυτόν. Υψηλότερη αναλογία μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλότερες ανακτήσεις εξαιτίας ανεπαρκούς ανάδευσης του διαλύτη από τα μικροκύματα (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Χαμηλότερες ανακτήσεις μπορούν να ληφθούν και εξαιτίας του χρόνου εκχύλισης. Εκχύλιση που εκτελείται για περισσότερο από 4 λεπτά στα 100 W ή για 2 λεπτά στα 200 W και στα 400 W, έχει βρεθεί ότι οδηγεί σε χαμηλότερες ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων (Zhang L. et al., 2012).

Στα κύρια πλεονεκτήματα της MAE συγκαταλέγονται η υψηλή απόδοση εκχύλισης, με εξαίρεση την περίπτωση χρήσης μη πολικών διαλυτών, η δυνατότητα πλήρους αυτοματισμού και η δυνατότητα ταυτόχρονης εκχύλισης διαφόρων αναλυτών. Ακόμα πλεονεκτήματα της τεχνικής θεωρούνται, οι χαμηλές θερμοκρασιακές απαιτήσεις, η εξοικονόμηση του χρόνου διεξαγωγής της ανάλυσης, καθώς και η εξοικονόμηση της ποσότητας διαλυτών και υποστρώματος (Sobhanzadeh E. et al., 2009). Ωστόσο η έλλειψη εκλεκτικότητας, σε σύγκριση με τη τεχνική SFE, αποτελεί μειονέκτημα της MAE. Η ύπαρξη άλλων συν-εκχυλιζόμενων ενώσεων, λόγω ανεπαρκούς εκλεκτικότητας, απαιτεί οπωσδήποτε την εφαρμογή ενός σταδίου καθαρισμού του εκχυλίσματος, πριν το στάδιο του χρωματογραφικού προσδιορισμού (Zhang L. et al., 2012).

2.2.8. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΠΕΠΙΕΣΜΕΝΟΥ ΥΓΡΟΥ (Pressurized liquid extraction, PLE)

Η εκχύλιση πεπιεσμένου υγρού (PLE) γνωστή και ως επιταχυνόμενη εκχύλιση με διαλύτη (accelerated solvent extraction, ASE), συγκαταλέγεται στη κατηγορία των τεχνικών εκχύλισης στερεών και ημι-στερεών δειγμάτων (Zhang L. et al., 2012). Εκτελείται σε υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, ενώ χρησιμοποιεί συμβατικούς οργανικούς διαλύτες. Οι υψηλές θερμοκρασίες μειώνουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση του διαλύτη, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το ρυθμό εκχύλισης του δείγματος. Από την άλλη, η υψηλή πίεση διατηρεί τη θερμοκρασία του διαλύτη χαμηλότερη από το σημείο ζέσεως του, επηρεάζοντας με αυτό τον τρόπο τη διάχυσή του στο δείγμα. Ο συνδυασμός υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, οδηγεί στην βέλτιστη απόδοση της εκχύλισης, ελαχιστοποιώντας την ποσότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται και επιταχύνοντας την εξαγωγή των αναλυτών (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η εκχύλιση λαμβάνει χώρα σε χρόνο 5-10 λεπτά με την εφαρμογή θερμοκρασιών και πιέσεων της κλίμακα 50-200 °C και 500-3000 psi αντίστοιχα (Zanella R. et al., 2012).

Η τεχνική PLE μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω τριών διακριτών τρόπων λειτουργίας. Αυτοί είναι η δυναμική, η στατική και η μικτή ροή λειτουργίας. Κατά το δυναμικό τρόπο λειτουργίας, το δείγμα τοποθετείται στην συσκευή εκχύλισης και ο διαλύτης διοχετεύεται συνεχώς στο δοχείο του δείγματος, με σταθερό και προκαθορισμένο ρυθμό. Όσον αφορά το στατικό τρόπο λειτουργίας, η διαδικασία της εκχύλισης αποτελείται από έναν ή περισσότερους κύκλους εκχύλισης, με την ταυτόχρονη αναπλήρωση του διαλύτη ανάμεσα στους κύκλους. Μετά το πέρας της εκχύλισης, η περίσσεια του διαλύτη συλλέγεται σε κατάλληλα φιαλίδια και εξατμίζεται σε ρεύμα αζώτου (N₂) (Sobhanzadeh E. et al., 2009).

Ως διαλύτες εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί το n-εξάνιο, το διχλωρομεθάνιο (dichloromethane, DCM), ο οξικός αιθυλεστέρας (EtAc), το νερό και το υποκριτικό νερό. Ακόμα μίγματα όπως n-εξάνιο-DCM, n-εξάνιο-ακετόνη και n-εξάνιο-EtAc έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί (Lambropoulou D.A. et al., 2007; Zhang L. et al., 2012). Εξαιτίας της χαμηλής εκλεκτικότητας του διαλύτη εκχύλισης, ποικίλες συν-εκχυλιζόμενες ενώσεις μπορούν να εξαχθούν μαζί με τους αναλύτες. Συνεπώς, για τη λήψη ορθών αποτελεσμάτων, αλλά και για τη προστασία του αναλυτικού οργάνου, είναι απαραίτητη η εκτέλεση ενός σταδίου καθαρισμού του εκχυλίσματος, καθώς και η αφαίρεση υγρασίας αν ακολουθείται αεριοχρωματογραφική ανάλυση, πριν τον τελικό προσδιορισμό (Zhang L. et

al., 2012). Για το στάδιο αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί το άνυδρο θειϊκό νάτριο, η γη διατόμων, η κυτταρίνη και άλλα προσροφητικά υλικά (Sobhanzadeh E. et al., 2009).

Η PLE έχει εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε φρούτα και λαχανικά. Παραδείγματα αυτών αποτελούν ο προσδιορισμός μυκητοκτόνων σε πορτοκάλια και μπανάνες, καθώς και ο προσδιορισμός οργανοφωσφορικών (organophosphate, OPPs) σε μήλα και καρότα (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης τεχνικής εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την θερμοκρασία (Zanella R. et al., 2012). Οι Tanaka et al. (2007), απέδειξαν ότι οι ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων που μελετήθηκαν, αυξήθηκαν όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 60 °C στους 100 °C, ενώ στο εύρος θερμοκρασιών 100-150 °C, οι ανακτήσεις των περισσότερων φυτοφαρμάκων παρέμειναν σχεδόν σταθερές (Zhang L. et al., 2012).

Ένα από τα βασικότερα χαρακτηριστικά της επιτυχίας της PLE, είναι η ικανότητα εκτέλεσης πολλαπλών διαδοχικών εκχυλίσεων, έως και 24 δειγμάτων, χωρίς παρακολούθηση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παροχή ενός υψηλού επιπέδου αυτοματοποίησης. Σε σύγκριση με τη μέθοδο Soxhlet, η χρήση πεπιεσμένων υγρών συμβάλλει στην μείωση του χρόνου εκχύλισης, καθώς και στη μείωση του όγκου των διαλυτών που χρησιμοποιούνται. Ακόμα τα εκχυλίσματα είναι συνήθως πολύ πιο συμπυκνωμένα, σε σύγκριση με αυτά που λαμβάνονται με τις συμβατικές τεχνικές (Sobhanzadeh E. et al., 2009; Zhang L. et al., 2012; Lambropoulou D.A. et al., 2007). Στα πλεονεκτήματα της PLE συγκαταλέγονται επίσης, η υψηλή απόδοση εκχύλισης και η καλή περιβαλλοντική συμβατότητα (Zhang L. et al., 2012). Ωστόσο απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, κατά την εφαρμογή της PLE σε υψηλές θερμοκρασίες, καθώς υπάρχει κίνδυνος υποβάθμισης θερμικά ασταθών ενώσεων. Επιπρόσθετα η χρήση εξοπλισμού υψηλού κόστους και η ανάγκη ενός σταδίου καθαρισμού του εκχυλίσματος, αποτελούν μειονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής (Lambropoulou D.A. et al., 2007).

2.2.9. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΗΧΟΥΣ (Ultrasound-assisted extraction, UAE)

Η εκχύλιση με υπερήχους (UAE) αποτελεί μια εναλλακτική τεχνική εκχύλισης οργανικών και ανόργανων ενώσεων (Zhang L. et al., 2012). Μια πληθώρα ενώσεων, όπως είναι οι ενώσεις αρώματος, οι χρωστικές, τα αντιοξειδωτικά αλλά και άλλα συστατικά των τροφίμων, έχουν απομονωθεί από μια ποικιλία υποστρωμάτων (π.χ. ζωικοί ιστοί, φυτικά

υποστρώματα). Κατά την εκχύλιση, το δείγμα τοποθετείται με κατάλληλο οργανικό διαλύτη συνήθως σε λουτρό υπερήχων (Ahmed F.E., 2001).

Οι υπέρηχοι είναι ακουστικά κύματα υψηλής συχνότητας (20 kHz - 100 MHz) που μεταφέρουν πίεση κατά τη διέλευση τους σε ένα μέσο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία περιοχών χαμηλής και υψηλής πίεσης. Στη περίπτωση που οι διακυμάνσεις της πίεσης είναι αρκετά υψηλές τότε επέρχεται σχηματισμός μικροφουσαλίδων. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ακουστική σπηλαιώση (Tiwari B.K., 2015). Οι φουσαλίδες διασπώνται και επαναδημιουργούνται συνεχώς, επιφέροντας αλλαγές στη δομή του μέσου που υφίσταται την επίδραση των υπερηχητικών κυμάτων. Πιο συγκεκριμένα οι σχηματιζόμενες φουσαλίδες διαταράσσουν τα κυτταρικά τοιχώματα των δειγμάτων και προάγουν τη διείσδυση του διαλύτη στη μήτρα του εκχυλιζόμενου υλικού, η οποία διευκολύνει την απελευθέρωση των αναλυτών (Zhang L. et al., 2012). Η βίαιη κατάρρευσή τους είναι υπεύθυνη για την απελευθέρωση ενέργειας υπό την μορφή θερμότητας (Tadeo J.L. et al., 2010).

Λόγω του γεγονότος ότι οι υπέρηχοι είναι μηχανικά κύματα, τα χαρακτηριστικά τους όπως είναι η συχνότητα, η ένταση του παλμού, το μήκος και το πλάτος κύματος μπορούν να επηρεάσουν την ακουστική σπηλαιώση, και κατ' επέκταση την εκχύλιση των οργανικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, αύξηση της συχνότητας των υπερήχων, οδηγεί σε μείωση της έντασης του φαινομένου της σπηλαιώσης. Όσον αφορά την ένταση του παλμού των υπερήχων, αυτή σχετίζεται με το πλάτος πίεσης του υπερηχητικού κύματος. Αύξηση του πλάτους πίεσης του κύματος, οδηγεί σε βίαιη κατάρρευση των φουσαλίδων (Ahmed F.E., 2001).

Παράγοντες όπως ο διαλύτης εκχύλισης, η θερμοκρασία και η ύπαρξη δεδIALυμένων αερίων επιδρούν επίσης στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (Ahmed F.E., 2001). Ως διαλύτες εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί το εξάνιο, η ακετόνη, το ακετονιτρίλιο και ο οξικός αιθυλεστέρας (Zhang L. et al., 2012). Η επιλογή του διαλύτη, εξαρτάται κατά κύριο λόγο από την διαλυτότητα των ενώσεων-στόχων. Συνήθως προτιμούνται διαλύτες με χαμηλή τάση ατμών. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, η ίδια επηρεάζει τις ιδιότητες του διαλύτη. Αύξηση της θερμοκρασίας, οδηγεί σε μείωση του ιξώδους και της επιφανειακής τάσης του διαλύτη, προκαλώντας αύξηση της πίεσης ατμών αυτού. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση της αποτελεσματικότητας της μεθόδου, εξαιτίας της βίαιης κατάρρευσης των φουσαλίδων. Συνεπώς είναι απαραίτητος ο έλεγχος της θερμοκρασίας. Η ύπαρξη δεδIALυμένων αερίων, αποτελεί ακόμα ένα παράγοντα υψίστης σημασίας για την ανάπτυξη του φαινομένου της ακουστικής σπηλαιώσης, καθώς

τα αέρια στον όγκο του διαλύτη λειτουργούν ως πυρήνες δημιουργίας μικροφουσαλίδων (Ahmed F.E., 2001).

Η εκχύλιση με χρήση υπερήχων (UAE) παρουσιάζει μια πληθώρα πλεονεκτημάτων έναντι άλλων συμβατικών μεθόδων εκχύλισης. Σε αυτά συγκαταλέγονται η απλότητα, η ταχύτητα, η υψηλή απόδοση και η εκλεκτικότητα της μεθόδου. Ακόμα η μείωση του χρόνου εκχύλισης, η κατανάλωση χαμηλής ποσότητας δείγματος και διαλύτη καθώς και η διατήρηση της θερμοκρασίας σε χαμηλά επίπεδα καθ' όλη τη διάρκεια της εκχύλισης, καθιστούν την εκχύλιση UAE κατάλληλη για την απομόνωση και τον προσδιορισμό τόσο των οργανικών όσο και των ανόργανων ενώσεων (Zhang L. et al., 2012).

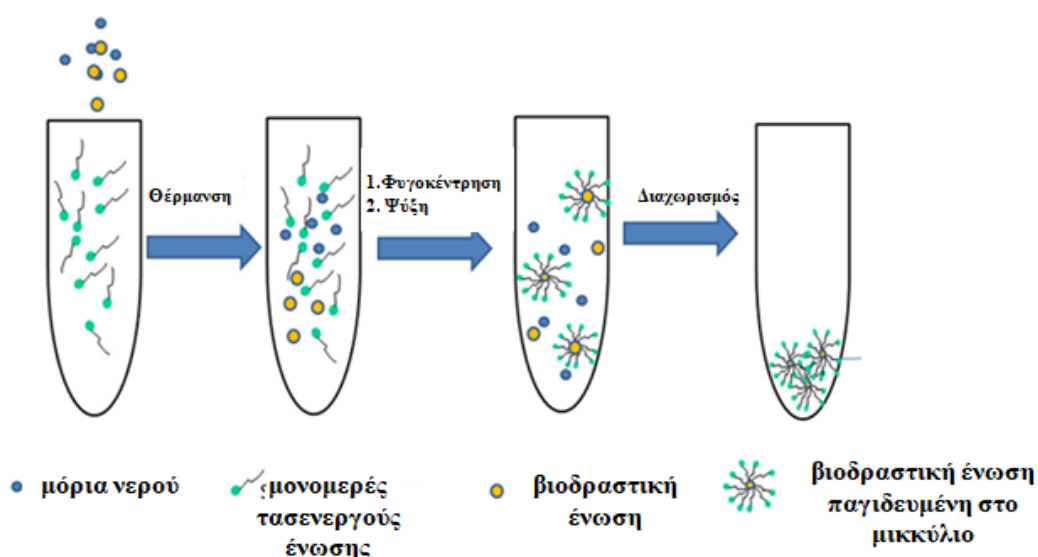
2.2.10. ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΗΜΕΙΟΥ ΝΕΦΕΛΩΣΗΣ (Cloud-point extraction, CPE)

Η εκχύλιση σημείου νεφέλωσης (CPE), θεωρείται μια καινοτόμα τεχνολογία εκχύλισης για ποικίλες ενώσεις. Έχει χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση βιοδραστικών ενώσεων από παραπροϊόντα τροφίμων και από φαρμακευτικά φυτά, για την απομόνωση και τον προσδιορισμό πρωτεϊνών, για την ανάλυση διαφόρων προσθέτων των τροφίμων καθώς και για την απομόνωση καταλοίπων φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών και μυκοτοξινών (Arya S.S. et al., 2019).

Η εκχύλιση σημείου νεφέλωσης στηρίζεται στη χρήση τασενεργών ενώσεων και στο σχηματισμό νεφελώδους διαλύματος (Zhang L. et al., 2012). Οι τασενεργές ενώσεις είναι αμφίφιλες ενώσεις, δηλαδή αποτελούνται από ένα υδρόφιλο και ένα υδρόφοβο μέρος (Kori S., 2019). Χαρακτηριστική ιδιότητα των τασενεργών ενώσεων είναι ότι με την αύξηση της συγκέντρωσής τους, πάνω από μια ορισμένη τιμή, τα μόριά τους σχηματίζουν κολλοειδή συσσωματώματα που είναι γνωστά ως μικκύλια. Η τιμή της συγκέντρωσης της τασενεργής ένωσης, πάνω από την οποία προκαλείται ο σχηματισμός των μικυλίων, είναι γνωστή ως κρίσιμη συγκέντρωση μικκυλίων (critical micellar concentration, CMC). Η συσσώρευση και κατ' επέκταση η καταβύθιση των μικκυλίων, έχει ως αποτέλεσμα τον εγκλωβισμό των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο εσωτερικό τους. Με τον τρόπο αυτό εκχυλίζονται οι αναλύτες από το υπόστρωμα (Zhang L. et al., 2012). Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των αναλυτών και της τασενεργής ένωσης μπορεί να είναι ηλεκτροστατικής ή υδρόφοβης φύσης ή συνδυασμός και των δύο (Kori S., 2019).

Η εκχύλιση σημείου νεφέλωσης (CPE), διεξάγεται σε 8 κύρια στάδια. Αρχικά στο δείγμα προστίθενται άλατα (π.χ. NaCl, KCl, Na₂SO₄, Na₃PO₄, KNO₃, CaCl₂, NaClO₄)

και η τασενεργή ένωση ενώ ταυτόχρονα ρυθμίζεται το pH του. Ακολουθεί η επώασή του δείγματος για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, ενώ στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση και ψύξη του δείγματος, διαχωρισμός των σχηματιζόμενων φάσεων και επεξεργασία της πλούσιας, σε τασενεργή ένωση, φάσης πριν την χρωματογραφική ανάλυση. Η επεξεργασία της πλούσιας σε τασενεργή ένωση φάσης είναι απαραίτητη καθώς το εκχύλισμα που λαμβάνεται μετά τον διαχωρισμό των φάσεων, έχει υψηλό ιξώδες και μπορεί δυνητικά να προκαλέσει προβλήματα στη στήλη εάν εγχυθεί απευθείας στο χρωματογραφικό σύστημα (Kori S., 2019). Στην Εικόνα 4. απεικονίζεται ο μηχανισμός δέσμευσης των αναλυτών με χρήση της τεχνικής CPE (Arya S.S. et al., 2019).



Εικόνα 4. Ο μηχανισμός δέσμευσης των αναλυτών με χρήση της τεχνικής CPE (Arya S.S. et al., 2019).

Λόγω των παραπάνω σταδίων, η αποτελεσματικότητα της CPE εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες. Σε αυτούς συγκαταλέγονται το είδος και η συγκέντρωση της τασενεργής ένωσης, το pH του δείγματος, η ιοντική ισχύς, η θερμοκρασία και ο χρόνος φυγοκέντρησης και επώασης. Χρόνος φυγοκέντρησης 5-10 λεπτών είναι συνήθως πιο αποδοτικός για την CPE, καθώς έχει θετική επίδραση στον διαχωρισμό των φάσεων και στον σχηματισμό του νεφελώματος (Kori S., 2019). Το είδος της τασενεργής ένωσης που θα επιλεγεί, καθορίζει τα χαρακτηριστικά του μικκυλίου που σχηματίζεται, ενώ η συγκέντρωση της τασενεργής ένωσης είναι σημαντική για την ακρίβεια και την αναπαραγωγιμότητα της ανάλυσης (Arya S.S. et al., 2019; Kori S., 2019). Η προσθήκη

άλατος, αυξάνει τη πυκνότητα και την ιοντική ισχύ της υδατικής φάσης, διευκολύνοντας με αυτό τον τρόπο, τον διαχωρισμό των δύο φάσεων ενώ μετατοπίζει την κατανομή των προσδιοριζόμενων ενώσεων στη φάση που είναι πλούσια σε τασενεργό. Η κατανομή και η παραμονή των αναλυτών στη φάση του μικκυλίου επηρεάζεται επίσης και από το pH, το οποίο ελέγχει τον ιονισμό των ενώσεων. Όσον αφορά τη θερμοκρασία, η αύξησή της οδηγεί σε μείωση του όγκου της φάσης που είναι πλούσια σε τασενεργή ένωση και κατ' επέκταση σε αύξηση της συγκέντρωσης των αναλυτών που είναι διαλυτές στη συγκεκριμένη φάση (Zhang L. et al., 2012).

Όπως όλες οι τεχνικές εκχύλισης, έτσι και η CPE παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κατά την εφαρμογή της. Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγονται το χαμηλό κόστος και οι ήπιες συνθήκες διεξαγωγής, η χρήση μη τοξικών τασενεργών ενώσεων, η εξάλειψη χρονοβόρων διαδικασιών που απαιτούνται σε συμβατικές τεχνικές εκχύλισης και η μειωμένη πιθανότητα σχηματισμού γαλακτώματος. Στον αντίποδα, τα κύρια μειονεκτήματά της είναι η έλλειψη αυτοματισμού, η ανάγκη επεξεργασίας του εκχυλίσματος πριν την χρωματογραφική ανάλυση, η μειωμένη απόδοση κατά την εκχύλιση πολικών ενώσεων με μη ιοντικές τασενεργές ενώσεις καθώς και οι περιορισμοί του θερμοκρασιακού εύρους, κυρίως κατά την εκχύλιση θερμικά ασταθών αναλυτών (Arya S.S. et al., 2019).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: Η ΧΡΗΣΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS ΩΣ ΤΕΧΝΙΚΗ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Τις τελευταίες δεκαετίες, ποικίλες μεθοδολογίες έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Παρόλα αυτά, οι ερευνητές καλούνται συνεχώς να αναπτύξουν νέες μεθόδους που χαρακτηρίζονται από ταχύτητα, ακρίβεια, εκλεκτικότητα και επαναληψιμότητα, ενώ ταυτόχρονα είναι φιλικές προς το περιβάλλον. Μια μεθοδολογία που περιλαμβάνει όλα αυτά τα εγγενή χαρακτηριστικά είναι η QuEChERS (Perestrelo R. et al., 2019).

Η QuEChERS αποτελεί ακρώνυμο των αγγλικών λέξεων Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (Γρήγορη, Εύκολη, Φθηνή, Αποτελεσματική, Ανθεκτική και Ασφαλής). Αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 2002, στο European Pesticide Residue Workshop (EPRW) στη Ρώμη, ενώ δημοσιεύτηκε ένα χρόνο αργότερα, από τους Anastassiades et al. (2003), ως πολύ-υπολειμματική μέθοδος προσδιορισμού φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά (Rejczak T. et al., 2015). Η ανάπτυξη αυτής της μεθόδου, οφείλεται στην προσπάθεια των Anastassiades και Lehotay, να αντικαταστήσουν τη μέθοδο “Luke” που χρησιμοποιούταν ευρέως από το 1975, για την πολύ-υπολειμματική ανάλυση των φυτοφαρμάκων σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά και άλλα δείγματα τροφίμων (Lehotay S.J. 2011).

Έως και σήμερα, η QuEChERS συνεχίζει να μονοπωλεί το ενδιαφέρον της ερευνητικής κοινότητας, ενώ θεωρείται μια ευρέως αποδεκτή τεχνική για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων, σε μια ευρεία κλίμακα τροφίμων (Valera-Martinez D.A. et al., 2020). Εκτός από τα φυτοφάρμακα, η QuEChERS χρησιμοποιείται επίσης για την ανάλυση φαρμακευτικών ενώσεων (π.χ. αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά, ηρεμιστικά κλπ), μυκοτοξινών, πολυφαινολών και πολυχλωριωμένων διφαινυλίων, στεροειδών ορμονών, ενώσεων τεταρτοταγούς αμμωνίου, φυτο-οιστρογόνων, αλκαλοειδών, όξινων φθαλικών εστέρων και ανόργανων ιόντων (Santana-Mayor A. et al., 2019). Ακόμα πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs), τερπένια, ναρκωτικά και διάφοροι περιβαλλοντικοί ρύποι έχουν προσδιοριστεί με τη χρήση της μεθόδου QuEChERS (Pavkovich A.M. et al., 2019; Perestrelo R. et al., 2019). Οι ενώσεις αυτές, έχουν εκχυλιστεί από ποικίλα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, των βιολογικών δειγμάτων και των περιβαλλοντικών δειγμάτων (Perestrelo R. et al., 2019).

Όπως όλες οι πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι προσδιορισμού, έτσι και η QuEChERS βασίζεται σε 3 κύρια στάδια επεξεργασίας του δείγματος. Αυτά είναι (Zanella R. et al., 2012):

1. Η απομόνωση των αναλυτών από το αντιπροσωπευτικό δείγμα μέσω της διεργασίας της εκχύλισης
2. Ο διαχωρισμός των αναλυτών από άλλα συν-εκχυλιζόμενα συστατικά του υποστρώματος, μέσω ενός σταδίου καθαρισμού του δείγματος (clean-up)
3. Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών

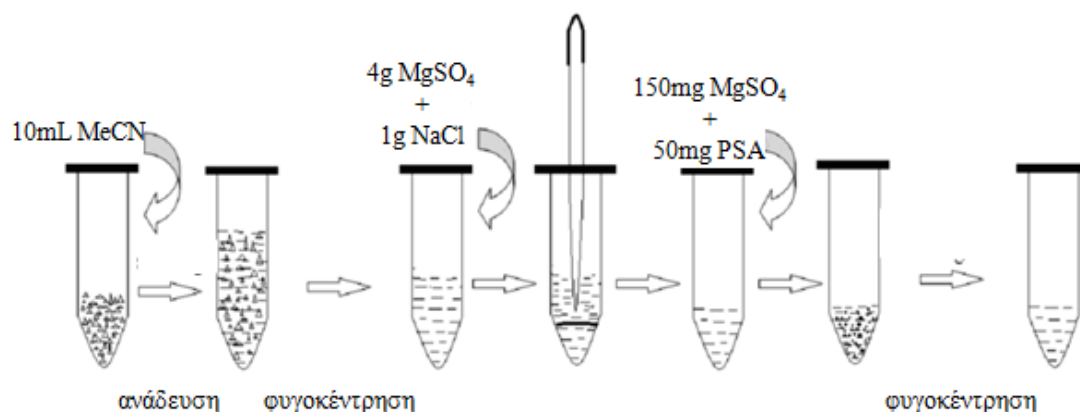
Για την QuEChERS, η απομόνωση των αναλυτών από το αντιπροσωπευτικό δείγμα πραγματοποιείται με την βοήθεια της εκχύλισης υγρού-υγρού (LLE). Η LLE βασίζεται στον διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος, μέσω της κατανομής αυτών σε δύο μη αναμίξιμα υγρά, εξαιτίας των διαφορετικών διαλυτοτήτων τους. Διάφοροι οργανικοί διαλύτες που είναι αναμίξιμοι ή μερικώς αναμίξιμοι με το νερό, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό του διαφασικού συστήματος. Παραδείγματα αυτών αποτελούν ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακετόνη, η μεθανόλη, η αιθανόλη και το ακετονιτρίλιο. Ο διαχωρισμός του μείγματος νερού - οργανικού διαλύτη, πραγματοποιείται με την προσθήκη ανόργανου άλατος. Ποικίλα ανόργανα άλατα, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μπορούν να προκαλέσουν διαφορετικού βαθμού διαχωρισμό. Επιπλέον, διεργασίες όπως η φυγοκέντρηση και η ανάδευση υποβοηθούν τον διαχωρισμό των φάσεων (Rejczak T. et al., 2015).

Μετά το πέρας του διαχωρισμού των φάσεων, ακολουθεί ο διαχωρισμός των ενώσεων - στόχων από άλλες συν-εκχυλιζόμενες ενώσεις. Το στάδιο αυτό ονομάζεται καθαρισμός (clean-up) του εκχυλίσματος και λαμβάνει χώρα μέσω της εκχύλισης διασποράς της στερεής φάσης (dispersive solid-phase extraction, d-SPE). Η d-SPE βασίζεται στην χρήση προσροφητικών υλικών τα οποία έρχονται σε επαφή με το εκχύλισμα που φέρει τους αναλυτές, προσροφούν τις συν-εκχυλιζόμενες ουσίες και κατ' επέκταση συμβάλλουν στον καθαρισμό του εκχυλίσματος (Musarurwa H. et al., 2019). Η χρήση μικρών ποσοτήτων προσροφητικών, η ταχύτητα καθαρισμού και το χαμηλό οικονομικό κόστος της d-SPE, είναι χαρακτηριστικά που την καθιστούν καταλληλότερη έναντι της κλασσικής SPE, κατά την εφαρμογή της QuEChERS. Στα πλεονεκτήματά της συγκαταλέγεται επίσης το γεγονός ότι (Rejczak T. et al., 2015):

- δεν χρησιμοποιεί συσκευές κενού και πίεσης για την λειτουργία της

- δεν απαιτεί έλεγχο της ροής του αέρα
- δεν απαιτεί στάδιο έκλυσης του αναλύτη και κατ' επέκταση δεν απαιτείται ξήρανση του δείγματος
- δεν απαιτεί εμπειρία για την εκτέλεσή της

Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών, κατά την εφαρμογή αυτής της μεθοδολογίας, επιτυγχάνεται μέσω αναλυτικών τεχνικών. Η υγρή (liquid chromatography, LC) και η αέρια (gas chromatography, GC) χρωματογραφία, συζευγμένη με την φασματομετρία μάζας (mass spectrometry, MS/MS) αποτελούν τις κύριες τεχνικές ανάλυσης. Ωστόσο ένα μεγάλο εύρος ανιχνευτών, εκτός από τον MS, έχουν χρησιμοποιηθεί από διάφορους ερευνητές (Pavkovich A.M. et al., 2019). Μεταξύ αυτών απαντώνται ο ανιχνευτής συστοιχίας διοδίων (diode-array detector, DAD), ο ανιχνευτής φθορισμού (fluorescence detector, FD) και ο ανιχνευτής υπεριώδους – ορατού (ultra-violet-visible, UV-Vis) συζευγμένα με την υγρή χρωματογραφία ενώ ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD) και ο ανιχνευτής θερμοϊονικής φλόγας (flame thermionic detector FTD ή nitrogen-phosphorus detector NPD) συζευγνύονται με αέρια χρωματογραφία (Santana-Mayor A. et al., 2019). Η περιορισμένη χρήση αυτών των ανιχνευτών, οφείλεται στην ανεπαρκή ευαισθησία που υποδεικνύουν, η οποία απαιτείται κατά τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων με την μέθοδο QuEChERS (Zanella R. et al., 2012). Στην Εικόνα 5 απεικονίζονται τα στάδια του διαχωρισμού και του καθαρισμού των αναλυτών κατά την εφαρμογή της QuEChERS (Zhang L. et al., 2012).



Εικόνα 5. Στάδια του διαχωρισμού και του καθαρισμού των αναλυτών κατά την εφαρμογή της QuEChERS (Zhang L. et al., 2012)

3.1. ΠΡΟΣΕΓΓΥΣΕΙΣ – ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ QuEChERS

Η πρωταρχική μέθοδος (original QuEChERS) που δημοσιεύτηκε το 2003, χρησιμοποιεί ως οργανικό διαλύτη το ακετονιτρίλιο και ως άλατα το άνυδρο θειϊκό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και το χλωριούχο νάτριο ($NaCl$) για την απομόνωση των αναλυτών από το αντιπροσωπευτικό δείγμα, ενώ ο διαχωρισμός των αναλυτών από άλλα συν-εκχυλιζόμενα συστατικά γίνεται με την χρήση προσροφητικού υλικού με πρωτοταγείς και δευτεροταγείς ομάδες αμίνης (PSA) (Rejczak T. et al., 2015; Musarurwa H. et al., 2019). Το υλικό PSA απομακρύνει τις συν-εκχυλιζόμενες ενώσεις μέσω ενός μηχανισμού ανταλλαγής ιόντων (Musarurwa H. et al., 2019).

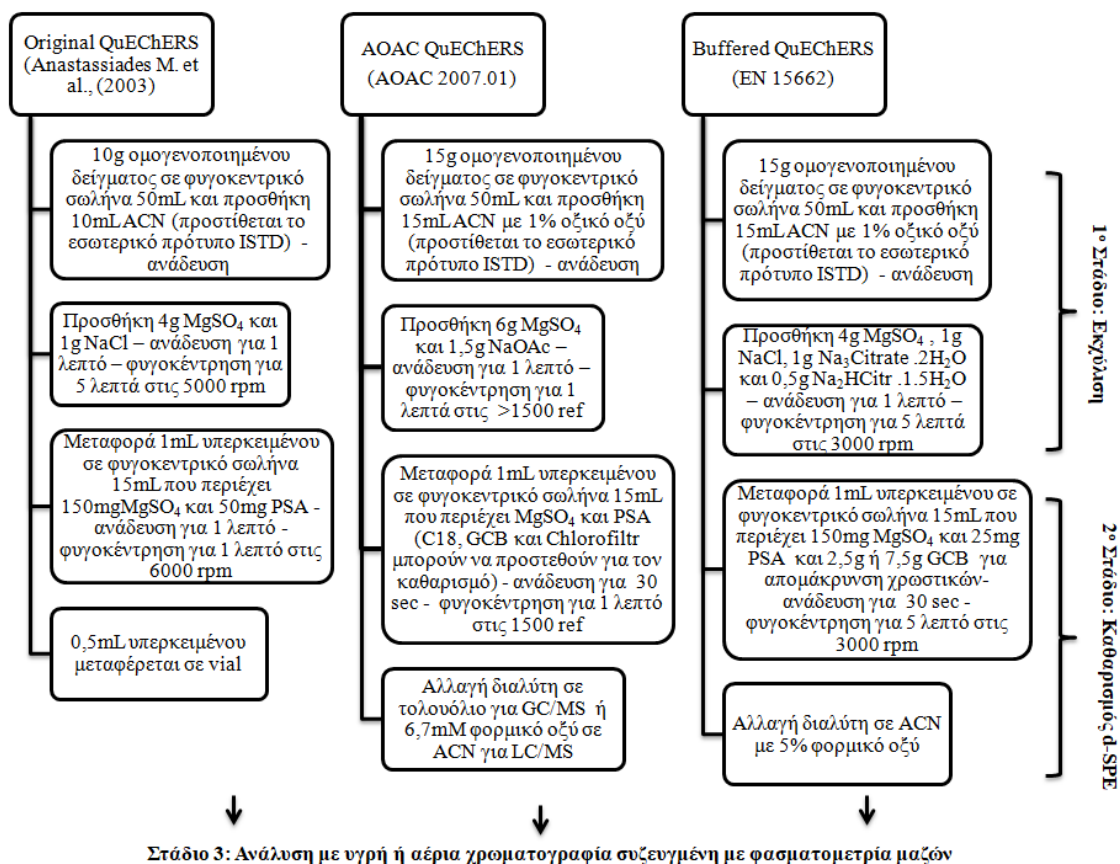
Η πρωταρχική μέθοδος στόχευε και εφαρμόστηκε στην απομόνωση και τον προσδιορισμό πολικών και βασικών φυτοφαρμάκων, από φρούτα και λαχανικά. Με σκοπό να διευρυνθεί το φάσμα εφαρμογής της που αφορά τόσο τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, όσο και τα υποστρώματα των τροφίμων από τα οποία εκχυλίζονταν, οι ερευνητές τροποποίησαν την αρχική προσέγγιση. Οι τροποποιήσεις αυτές αφορούν τα στάδια της απομόνωσης των αναλυτών και του καθαρισμού του εκχυλίσματος, ενώ συμβάλλουν στην βελτιστοποίηση της σταθερότητας φυτοφαρμάκων αλλά και άλλων ενώσεων που εξαρτώνται από το pH (Pavkovich A.M. et al., 2019).

Πιο συγκεκριμένα για την δέσμευση των όξινων φυτοφαρμάκων, οι Lehotay et al. (2007), χρησιμοποίησαν στο στάδιο της εκχύλισης, άλατα οξικού οξέος και οξικού νατρίου ως ρυθμιστικά, για την δημιουργία ενός ελαφρώς όξινου διαλύματος με τιμή pH μικρότερη του 5. Η προσέγγιση αυτή θεωρείται ως η επίσημη μέθοδος AOAC 2007.01 (Association of Official Agriculture Chemists), η οποία έλαβε το όνομά της από τον οργανισμό που υιοθέτησε και δημοσίευσε την συγκεκριμένη μέθοδο και δημοσιεύτηκε τον Ιανουάριο του 2007 (Rejczak T. et al., 2015; Lehotay S.J. 2011). Από την δημιουργία της έως σήμερα, πολλοί ερευνητές την έχουν εφαρμόσει για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε δείγματα καλαμποκιού, σιτηρών, ρυζιού, γάλακτος, μελιού και διάφορων τυροκομικών προϊόντων (Musarurwa H. et al., 2019).

Για την επίτευξη του ίδιου σκοπού, δηλαδή τη ρύθμιση του pH σε ένα επιθυμητό εύρος τιμών, οι Anastassiades et al. (2008), χρησιμοποίησαν ασθενέστερο ρυθμιστικό διάλυμα δι-νατρικού και τρι-νατρικού κιτρικού οξέος. Η προσέγγιση αυτή θεωρείται ως το ευρωπαϊκό πρότυπο EN 15662 και δημοσιεύτηκε το Δεκέμβρη του 2008. Η τροποποίηση εισήχθη καθώς οι Anastassiades et al. (2008), παρατήρησαν ότι η χρήση του οξικού οξέος, οδηγεί σε σχεδόν σταθερές τιμές pH, γεγονός που επιδρά σημαντικά στον καθαρισμό του

εκχυλίσματος με PSA. Η χρήση ρυθμιστικού διαλύματος δι-νατρικού και τρι-νατρικού κιτρικού οξέος, σε συνδυασμό με την προσθήκη διαλύματος φορμικού οξέος (5% σε ακετονιτρίλιο) μετά το πέρας του καθαρισμού του εκχυλίσματος, το οποίο ρυθμίζει το pH στην τιμή 5, βρέθηκε ότι είναι αποτελεσματικό για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων από συγκεκριμένα υποστρώματα (Rejczak T. et al., 2015; Lehotay S.J. 2011).

Τόσο η AOAC 2007.01 όσο και η EN 15662 QuEChERS, διατηρούν το pH του διαλύματος στην κλίμακα του 5-5,5 με αποτέλεσμα να επιτρέπουν την ικανοποιητική απομάκρυνση όξινων φυτοφαρμάκων, χωρίς να επηρεάζουν τους αλκαλικά ευαίσθητους αναλύτες. Έχει βρεθεί ότι η χρήση των ρυθμιστικών αλάτων, συμβάλει σε ανακτήσεις που αγγίζουν το 70% σε ορισμένες περιπτώσεις, που διαφορετικά παρουσίαζαν πολύ χαμηλή ανάκτηση. Παραδείγματα αυτών αποτελούν το pymetrozine, το imazalil και το thiabendazole (Santana-Mayor A. et al., 2019). Στην Εικόνα 6. απεικονίζονται τα στάδια προετοιμασίας του δείγματος κατά την εφαρμογή των τριών προσεγγίσεων της εκχύλισης QuEChERS (Original, AOAC και EN QuEChERS) (Musarurwa H. et al., 2019).



Εικόνα 6. Στάδια προετοιμασίας του δείγματος κατά την εφαρμογή των Original, AOAC και EN QuEChERS.

Η QuEChERS μπορεί να τροποποιηθεί και σε μικρο-κλίμακα (μ-QuEChERS), με αποτέλεσμα να παράγει ελάχιστες ποσότητες αποβλήτων, και να είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον. Με την χρήση μικρότερων ποσοτήτων δείγματος, αλάτων, διαλυτών και προσροφητικών υλικών (Perestrelo R. et al., 2019). Εκτός από την μ-QuEChERS, εξέλιξη αυτής της μεθόδου αποτελεί και η QuPPE (quick polar pesticides), που περιλαμβάνει μόνο ένα στάδιο, αυτό της εκχύλισης. Το στάδιο του καθαρισμού του εκχυλίσματος, με την τεχνική d-SPE, δεν πραγματοποιείται. Όπως υποδηλώνει και το όνομά της, η QuPPE συμβάλλει στην αποτελεσματική εξαγωγή των πολικών φυτοφαρμάκων από τα υποστρώματά τους. Προτάθηκε από τους Anastassiades et al. (2017), και απαρτίζεται από ένα στάδιο εκχύλισης, κατά το οποίο 10g δείγματος εκχυλίζονται με τη βοήθεια οξιμισμένης μεθανόλης. Στην περίπτωση αποξηραμένων φρούτων, λαχανικών και παρόμοιων προϊόντων, συνίσταται η χρήση 5g δείγματος, τα οποία ενυδατώνονται με νερό. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και φιλτράρισμα του υπερκειμένου, το οποίο στη συνέχεια εγχέεται στο χρωματογράφο (Valera-Martinez D.A. et al., 2020).

3.2. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QuEChERS

Η προετοιμασία του δείγματος είναι σημαντική για την λήψη αξιόπιστων και ποσοτικά ακριβών αποτελεσμάτων (Musarurwa H. et al., 2019). Οι παραδοσιακές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται χαρακτηρίζονται ως επίπονες, χρονοβόρες και πολύπλοκες. Συνήθως απαιτούν μεγάλες ποσότητες τοξικών οργανικών διαλυτών, οι οποίοι έχουν υψηλό οικονομικό κόστος και παράγουν μεγάλες ποσότητες αποβλήτων (Zanella R. et al., 2012; Perestrelo R. et al., 2019). Η ανάπτυξη της QuEChERS αντιστάθμισε όλα αυτά τα μειονεκτήματα, καθώς είναι απλή, εύκολη σε εφαρμογή, έχει χαμηλό κόστος και προσφέρει υψηλή απόδοση εκχύλισης (Zanella R. et al., 2012).

Η QuEChERS συνδυάζει την εκχύλιση, την απομόνωση και τον καθαρισμό των αναλυτών σε διαδικασία ενός βήματος, αποφεύγοντας σε μεγάλο βαθμό την ανάμιξη, τη διήθηση, την εξάτμιση και τη συμπύκνωση (Zhang L. et al., 2012). Επεξεργάζεται σημαντικά μεγάλο αριθμό δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα (Zanella R. et al., 2012). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι η ανάλυση μιας παρτίδας 10-20 δειγμάτων, μπορεί να αναλυθεί σε 30-40 λεπτά από έναν μόνο αναλυτή (Rejczak T. et al., 2015). Δεν απαιτεί υαλικά σκεύη και περίπλοκο εργαστηριακό εξοπλισμό ενώ παρέχει υψηλές ανακτήσεις για ένα ευρύ φάσμα πολικών, μετρίας πολικότητας και μη πολικών αναλυτών (Zanella R. et al., 2012; Rejczak T. et al., 2015). Ακόμα, η χρήση μικρών όγκων διαλυτών, η απουσία

χλωριωμένων διαλυτών και η παραγωγή μικρής ποσότητας αποβλήτων είναι χαρακτηριστικά που συνάδουν με τις αρχές της πράσινης χημείας (Rejczak T. et al., 2015).

3.3. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΙΔΡΟΥΝ ΣΤΗΝ ΑΠΟΔΟΣΗ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS

Μολονότι η QuEChERS περιλαμβάνει έναν αριθμό απλών αναλυτικών βημάτων, είναι γρήγορη και εύκολη στην εκτέλεσή της, η αποτελεσματικότητά της εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες που αφορούν κυρίως τα στάδια του διαχωρισμού και του καθαρισμού (Perestrelo R. et al., 2019). Συνεπώς κατά την ανάπτυξη της μεθόδου, οι ερευνητές θα πρέπει να εξετάσουν διαφορετικές συνθήκες. Οι ιδιότητες του υποστρώματος και του αναλύτη, ο διαλύτης εκχύλισης, η ποσότητα του διαλύτη και του δείγματος αλλά και η μεταξύ τους αναλογία, είναι βασικοί παράγοντες που πρέπει να εξεταστούν πριν την εφαρμογή της QuEChERS. Ακόμα το pH, η χρήση εσωτερικών προτύπων, το είδος και η ποσότητα των αλάτων αλλά και του προσροφητικού υλικού που χρησιμοποιούνται, καθώς και η ομογενοποίηση του δείγματος, επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Rejczak T. et al., 2015).

3.3.1. ΔΙΑΛΥΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Στην πλειονότητα των εφαρμογών της QuEChERS, ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιείται το ακετονιτρίλιο. Ωστόσο, και άλλοι διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό. Σε αυτούς συγκαταλέγονται τα μίγματα: εξάνιο-οξικός αιθυλεστέρας, διχλωρομεθάνιο-ακετόνη, διχλωρομεθάνιο-εξάνιο, εξάνιο-ακετόνη, ακετονιτρίλιο-εξάνιο και ακετονιτρίλιο-μεθανόλη (Santana-Mayor A. et al., 2019). Το ακετονιτρίλιο είναι υδατοδιαλυτό και μπορεί να διεισδύσει στην υδατική φάση συμβάλλοντας στην εκχύλιση ποικίλων ενώσεων. Ο διαχωρισμός του από την υδατική φάση πραγματοποιείται εύκολα, με τη χρήση αλάτων. (Rejczak T. et al., 2015).

Η πολικότητα του ακετονιτρίλιου είναι μεγαλύτερη από εκείνη της ακετόνης και του οξικού αιθυλεστέρα, επομένως τα μετρίας αλλά και υψηλής πολικότητας φυτοφάρμακα έχουν καλύτερη διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο, με αποτέλεσμα η ανάκτησή τους να αυξάνεται με την χρήση αυτού. Ο οξικός αιθυλεστέρας παρουσιάζει επιπρόσθετα μειονεκτήματα, μεταξύ των οποίων είναι η υψηλή πιθανότητα εξαγωγής λιπιδίων, η

χαμηλή ανάκτηση όξινων και βασικών φυτοφαρμάκων και η χαμηλότερη, σε σχέση με το ακετονιτρίλιο, απόδοση καθαρισμού κατά την εφαρμογή της d-SPE (Rejczak T. et al., 2015).

Χάρη στην εκλεκτικότητά του, το ακετονιτρίλιο μπορεί να απομονώσει ένα ευρύ φάσμα αναλυτών, χωρίς την συν-εκχύλιση ενώσεων - συστατικών του υποστρώματος (Valera-Martinez D.A. et al., 2020). Για παράδειγμα, η διαλυτότητα των λιπιδίων στην ακετονιτριλική φάση είναι περιορισμένη, συνεπώς η συν-εκχύλιση λιπιδίων με τη χρήση αυτού του διαλύτη, είναι σχετικά χαμηλή. Ωστόσο, προβλήματα κατά την ανάλυση φυτοφαρμάκων από υποστρώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια, μπορούν να εμφανιστούν. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, είτε την απώλεια μη πολικών φυτοφαρμάκων, είτε τη μείωση των ανακτήσεών τους (Rejczak T. et al., 2015).

Η συμβατότητα του ακετονιτριλίου με τις χρωματογραφικές τεχνικές (υγρή και αέρια χρωματογραφία), αποτελεί άλλο ένα πλεονέκτημα της χρήσης του ως διαλύτης εκχύλισης. Ωστόσο λόγω του γεγονότος ότι είναι λιγότερο πτητικός από άλλους κοινούς οργανικούς διαλύτες, το ακετονιτρίλιο απαιτεί για την εξάτμισή του στον αέριο χρωματογράφο, περισσότερο χρόνο και συνήθως περιλαμβάνει ένα στάδιο αλλαγής διαλύτη πριν την αεριοχρωματογραφική ανάλυση (Rejczak T. et al., 2015).

3.3.2. ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΑΛΑΤΩΝ

Η προσθήκη αλάτος, είναι μια πρακτική κατά την οποία ανόργανα άλατα προστίθενται σε μείγματα νερού και πολικών οργανικών διαλυτών, προκαλώντας αύξηση της ιοντικής ισχύος του υδατικού στρώματος, που συμβάλλει στον διαχωρισμό του πολικού οργανικού διαλύτη από το μείγμα. Το γεγονός αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, την δημιουργία ενός διφασικού συστήματος, με την υδατική φάση να καταλαμβάνει την κάτω στιβάδα και την οργανική φάση την υπερκείμενη στιβάδα (Pavkovich A.M. et al., 2019).

Η ποσότητα και το είδος του αλάτων που θα χρησιμοποιηθούν, είναι παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της QuEChERS. Κατά γενικό κανόνα, καθώς το μοριακό βάρος των αλάτων αυξάνεται, η διαλυτότητά τους στο νερό μειώνεται. Συνεπώς, όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση των αλάτων που θα προστεθούν, τόσο μεγαλύτερος είναι και ο διαχωρισμός των φάσεων που προσφέρουν. Η προσθήκη τους, βελτιώνει την ακρίβεια και την ευαισθησία της μεθόδου, ενώ παράλληλα επιδρά σημαντικά στις ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων που αναλύονται (Pavkovich A.M. et al., 2019).

Ο διαχωρισμός των φάσεων συνήθως επιτυγχάνεται με άλατα όπως, το άνυδρο θειικό μαγνήσιο ($MgSO_4$), το θειικό νάτριο (Na_2SO_4), το οξικό αμμώνιο ($NH_4CH_3CO_2$) και άλλα άλατα τεταρτοταγούς αμμωνίου (π.χ. χλωριούχο αμμώνιο, μυρμηκικό αμμώνιο), το χλωριούχο νάτριο ($NaCl$), το οξικό νάτριο ($NaOAc$), το διένυδρο τριβασικό κιτρικό νάτριο (SCTD), το άλας δινατρικού κιτρικού οξέος (SCDS) και συνδυασμούς αυτών (Perestrelo R. et al., 2019; Santana-Mayor A. et al., 2019). Μέσω μελετών έχει βρεθεί ότι, το άνυδρο θειικό μαγνήσιο, συμβάλει αποτελεσματικά στην απομάκρυνση μεγάλης ποσότητας νερού από την ακετονιτριλική φάση, αποδίδοντας τις καλύτερες ανακτήσεις, ειδικά σε πολικούς αναλύτες. Εκτός από το στάδιο του διαχωρισμού, το άνυδρο $MgSO_4$ προστίθεται και κατά το στάδιο του καθαρισμού του εκχυλίσματος, στοχεύοντας στην απομάκρυνση μεγαλύτερης ποσότητας ανεπιθύμητου ύδατος. Σε μερικές περιπτώσεις η χρήση χλωριούχου ασβεστίου ($CaCl_2$) έναντι $MgSO_4$ είναι προτιμητέα (Rejczak T. et al., 2015).

Για να απομακρυνθεί η μεγαλύτερη ποσότητα του νερού, η ποσότητα του συγκεκριμένου άλατος πρέπει να ξεπεράσει την συγκέντρωση κορεσμού. Η ποιότητα του $MgSO_4$ είναι εξίσου πολύ σημαντική. Συστήνεται η χρήση μικροσωματιδίων αυτού του άλατος (80-120 mesh), με καθαρότητα άνω του 98%. Επίσης προτείνεται η θέρμανση του άνυδρου $MgSO_4$ στους $500^\circ C$ για περισσότερο από 5 ώρες, με σκοπό την απομάκρυνση των φθαλικών υπολειμμάτων και οποιασδήποτε μικροποσότητας νερού υπάρχει, πριν την χρήση του. Ωστόσο λόγω της καλύτερης ποιότητας αντιδραστηρίων που παρασκευάζονται σήμερα, φαίνεται ότι το κομμάτι της θέρμανσης δεν είναι τόσο σημαντικό (Rejczak T. et al., 2015).

Το άνυδρο $MgSO_4$ κατά τον διαχωρισμό των φάσεων, μετέχει σε μια εξώθερμη αντίδραση ενυδάτωσης, παράγοντας θερμότητα έως και $40^\circ C$ (Valera-Martinez D.A. et al., 2020; Perestrelo R. et al., 2019). Το φαινόμενο αυτό, μπορεί δυνητικά να επηρεάσει την απόδοση της εκχύλισης, ορισμένων θερμικά ασταθών αναλυτών. Για την επίλυση του προβλήματος, συστήνεται η ψύξη του δείγματος πριν την εκχύλιση, ή η προσθήκη παγωμένου νερού σε θερμοκρασίες μικρότερες των $4^\circ C$. Ακόμα το ποσοστό της καθαρότητας του άλατος, έχει αποδειχθεί, ότι μεταβάλλει την τιμή της παραγόμενης θερμότητας, χωρίς ωστόσο να βελτιώνει τις ανακτήσεις των συγκεκριμένων αναλυτών (Perestrelo R. et al., 2019).

Σε πολλές περιπτώσεις, το άνυδρο θειικό μαγνήσιο συνδυάζεται με άλας $NaCl$. Το χλωριούχο νάτριο επιδρά στην πολικότητα του διαλύτη εκχύλισης και συνεπώς αυξάνει την επιλεκτικότητα της εκχύλισης. Ωστόσο, η αυξημένη ποσότητα αυτού του άλατος

συμβάλει στην μείωση της ακετονιτριλικής στιβάδας. Η καλύτερη αναλογία $MgSO_4:NaCl$ που προτείνεται από τους συγγραφείς είναι 4:1 (Rejczak T. et al., 2015). Ακόμα έχει αποδειχθεί ότι ο συνδυασμός των δύο αλάτων, βελτιώνει το σχήμα των κορυφών που λαμβάνονται στο χρωματογράφημα (Santana-Mayor A. et al., 2019).

Τόσο το $MgSO_4$ όσο και το Na_2SO_4 είναι άλατα με χαμηλή τάση ατμών, που τείνουν να εναποτίθενται ως στερεά σε επιφάνειες του ανιχνευτή MS, οδηγώντας σε απώλεια της ευαισθησίας του οργάνου. Για να αποφευχθεί αυτό το φαινόμενο, έχει προταθεί η αντικατάστασή τους με άλλα άλατα μεγαλύτερης πτητικότητας, που μπορούν εύκολα να εξατμιστούν και να αποσυντεθούν στο θάλαμο ιονισμού. Παραδείγματα αυτών αποτελούν το χλωριούχο αμμώνιο (NH_4Cl) και το μυρμηκικό αμμώνιο (NH_4HCO_2), τα οποία αποσυντίθενται σε θερμοκρασίες μικρότερες των $350^\circ C$ (Perestrelo R. et al., 2019; Santana-Mayor A. et al., 2019). Οι Han et al. (2016), επέδειξαν ότι η εκχύλιση με άλας το μυρμηκικό αμμώνιο, εκχυλίζει κατά τρεις φορές μικρότερη ποσότητα συν-εκχυλιζόμενων ουσιών στο αβοκάντο, σε σχέση με τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή της original QuEChERS (0,4% έναντι 1,3%) (Valera-Martinez D.A. et al., 2020).

3.3.3. ΕΙΔΟΣ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Τα προσροφητικά υλικά χρησιμοποιούνται κατά την διεργασία της d-SPE, δηλαδή κατά το στάδιο του καθαρισμού του εκχυλίσματος, και στόχο έχουν την προσρόφιση και ταυτόχρονη απομάκρυνση των συν-εκχυλιζόμενων ουσιών. Όσον αφορά την μέθοδο QuEChERS, περισσότερα από 50 προσροφητικά υλικά ή συνδυασμοί αυτών, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως, με σκοπό να ελεγχθεί η επίδρασή τους στο εκχύλισμα. Η αποτελεσματικότητά τους κρίνεται από το ποσοστό καθαρισμού που παρέχουν και κατ' επέκταση από τις ανακτήσεις των αναλυτών που προσφέρουν καθώς και από την μείωση των συνεκχυλιζόμενων συστατικών (Rejczak T. et al., 2015).

Τα προσροφητικά υλικά άμινο και αλούμινας συμβάλλουν στην απομάκρυνση των οργανικών οξέων, συμπεριλαμβανομένων και των λιπαρών οξέων, των σακχάρων και ορισμένων χρωστικών όπως είναι η χλωροφύλλη και οι ανθοκυάνες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας αποτελούν υλικά με πρωτοταγείς και δευτεροταγείς ομάδες αμίνης (PSA). Το κύριο μειονέκτημα της χρήσης τους είναι το γεγονός ότι επιφέρουν απώλειες των όξινων αναλυτών (Rejczak T. et al., 2015).

Μια άλλη κατηγορία προσροφητικών υλικών είναι αυτή που έχουν βάση τον άνθρακα. Τα υλικά αυτά είναι αποτελεσματικά για την απομάκρυνση των καρτοτενοειδών, της χλωροφύλλης και των στερολών, αλλά δεν προτείνονται για την ανάλυση μονο-επίπεδων αναλυτών, όπως είναι π.χ. τα φυτοφάρμακα hexachlorobenzene, chlorothalonil και thiabendazole (Rejczak T. et al., 2015). Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας είναι ο γραφίτιτοποιημένος άνθρακας (graphitized carbon black, GCB). Ο GCB συμβάλει στην απομάκρυνση των χρωστικών, γενικά των μη πολικών συνεκχυλιζόμενων παρεμποδίσεων και των στερολών (Pavkovich A.M. et al., 2019). Παρόμοια δράση συναντάται και κατά την χρήση του CarbonX ως προσροφητικό υλικό. Ωστόσο στη περίπτωση του CarbonX, δεν υπάρχουν μεγάλες απώλειες σε φυτοφάρμακα με επίπεδη δομή (Perestrelo R. et al., 2019).

Τα υλικά με προσδεμένη αλυσίδα C₈ και C₁₈ σε σίλικα (SiO₂) είναι προσροφητικά υλικά που αφαιρούν μη πολικά συνεκχυλιζόμενα συστατικά από εκχυλίσματα με περιεκτικότητα σε λιπαρά 2-20%. Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται τρόφιμα όπως είναι τα ψάρια, το λάδι, το αβοκάντο και τα δημητριακά. Έχει αποδειχθεί ότι δεν επηρεάζει τις ανακτήσεις των αναλυτών (Valera-Martinez D.A. et al., 2020). Μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με το προσροφητικό υλικό PSA, για απομάκρυνση συν-εκχυλιζόμενων ουσιών σε λιπαρά υποστρώματα (π.χ. καρύδια, ελιές, γάλα κλπ) (Santana-Mayor A. et al., 2019). Σε άλλες μελέτες έχει αποδειχθεί ότι η χιτοζάνη, θα μπορούσε να θεωρηθεί ως μια οικονομική εναλλακτική λύση έναντι του C₁₈, για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων από το γάλα (Perestrelo R. et al., 2019).

Στοχεύοντας στην εξέλιξη και την βελτιστοποίηση του καθαρισμού του εκχυλίσματος, ποικίλα νέα προσροφητικά υλικά έχουν αναπτυχθεί. Το ChloroFiltr[®] είναι ένα σύγχρονο πολυμερικό προσροφητικό υλικό που απομακρύνει αποτελεσματικά την χλωροφύλλη, σε ποσοστό μεγαλύτερο του 82%, χωρίς να συμβάλλει στην απώλεια των αναλυτών. Η χλωροφύλλη αποτελεί μια δύσκολη συν-εκχυλίζουσα ένωση, χάρη στο μη πτητικό της χαρακτήρα (Rejczak T. et al., 2015). Η χρήση μεγάλων ποσοτήτων ChloroFiltr[®] δεν συστήνεται, καθώς διογκώνεται στην ακετονιτριλική φάση και καθίσταται δύσκολη η λήψη κλάσματος υπερκειμένου (Valera-Martinez D.A. et al., 2020). Επιπλέον η χρήση του ChloroFiltr[®] δεν είναι αποτελεσματική κατά την ανάλυση των μυκοτοξινών και του εξαχλωροβενζολίου (Perestrelo R. et al., 2019).

Στην κατηγορία των σύγχρονων προσροφητικών υλικών, εντάσσονται και τα Z-Sep και Z-Sep Plus. Το Z-Sep, προέρχεται από την τροποποιημένη, με οξείδια ζirkονίου,

σίλικα ενώ το Z-Sep-Plus είναι προσροφητικό υλικό που αποτελείται από σωματίδια σίλικα που φέρουν ζιρκόνια και C₁₈ συζευγμένα μεταξύ τους. Είναι αποτελεσματικά στην απομάκρυνση μεγαλύτερης ποσότητας λίπους και χρωστικών, σε σχέση με το PSA και τον C₁₈, ενώ οι ανακτήσεις που λαμβάνονται με τη χρήση τους είναι μεγαλύτερες (Rejczak T. et al., 2015). Το Z-Sep χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τον C₁₈ για δείγματα με περιεκτικότητα λίπους μικρότερη του 15%, ενώ το Z-Sep Plus συστήνεται για δείγματα με λιπο-περιεκτικότητα μεγαλύτερη των 15% (Valera-Martinez D.A. et al., 2020).

Οι νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ως προσροφητικά υλικά, χάρη στην μεγάλη ειδική επιφάνεια που διαθέτουν και του υψηλού πορώδους τους. Τα εγγενή χαρακτηριστικά τους, τους καθιστούν ικανούς για την απομάκρυνση χρωστικών και λιπαρών οξέων από πολύπλοκα υποστρώματα όπως είναι το τσάι και το σκόρδο. Επιπλέον μαγνητικά τροποποιημένα MWCNTs έχουν χρησιμοποιηθεί, για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων και άλλων ενώσεων από αυγά (Valera-Martinez D.A. et al., 2020). Οι Den et al. (2013), εξέτασαν την αποτελεσματικότητα ενός σύνθετου προσροφητικού υλικού, που απαρτίζεται από MWCNTs και μαγνητικά νανοσωματίδια συζευγμένα με αμίνη, για την ανάλυση 8 φυτοφαρμάκων με οργανολογία GC-MS. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια συζευγμένα με αμίνη, αλληλεπίδρασαν με διάφορα πολικά οργανικά οξέα, ενώ οι MWCNTs ήταν αποτελεσματικοί στην προσρόφηση υψηλής περιεκτικότητας χρωστικών ουσιών και στερολών (Rejczak T. et al., 2015).

Ένα νέο εμπορικό προϊόν που αποτελείται από τροποποιημένους MWCNTs είναι το Cleanert[®] NANO. Το συγκεκριμένο προσροφητικό υλικό είναι αποτελεσματικό για την απομάκρυνση της χλωροφύλλης, των χρωστικών και των λιπαρών οξέων. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε φρούτα, λαχανικά και άλλα προϊόντα γεωργικής καλλιέργειας. Η χρήση του συνίσταται σε μικρές ποσότητες (10 με 15mg) (Perestrelo R. et al., 2019).

Στην κατηγορία των σύγχρονων προσροφητικών υλικών εντάσσεται και το EMR-Lipid, που χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση φωσφολιπιδίων και πρωτεϊνών (Perestrelo R. et al., 2019). Αφαιρεί επίσης έως και το 76% της συν-εκχυλιζόμενης χλωροφύλλης χωρίς να συμβάλλει στην απώλεια αναλυτών με επίπεδη δομή (Valera-Martinez D.A. et al., 2020). Για το συγκεκριμένο προσροφητικό, ο μηχανισμός δράσης του βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και αποκλεισμό μορίων λόγω μεγέθους (Perestrelo R. et al., 2019). Υδρογονάνθρακες μακράς αλυσίδας αλληλεπιδρούν με το προσροφητικό υλικό EMR-Lipid σχηματίζοντας σύμπλοκο το οποίο είτε καθιζάνει, είτε

παραμένει στην υδατική φάση (Valera-Martinez D.A. et al., 2020). Για την αποτελεσματική απομάκρυνση των συν-εκχυλιζόμενων ενώσεων, αλλά και για την ενεργοποίησή του, το EMR-Lipid απαιτεί επιπλέον ποσότητα νερού (Perestrelo R. et al., 2019). Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε μπαχαρικά, βρώσιμα φυτικά έλαια και παρθένο ελαιόλαδο όσο και σε προϊόντα μελιού (Valera-Martinez D.A. et al., 2020).

Άλλα προσροφητικά υλικά που έχουν αναφερθεί και έχει αποτιμηθεί η αποτελεσματικότητά τους κατά την εφαρμογή της QuEChERS, είναι η χιτίνη, το Florisil® και το Oasis PRiME HLB. Η χιτίνη που θεωρείται το δεύτερο σε αφθονία βιοπολυμερές στη φύση, χρησιμοποιείται για να αντικαταστήσει τα προσροφητικά σίλικα - C₁₈, PSA, GCB και το συνδυασμό αυτών. Η χρήση της, συμβάλλει στη μείωση του συνολικού κόστους της μεθόδου. Το Florisil® χρησιμοποιείται για την απομάκρυνση μη πολικών και χαμηλής πολικότητας ενώσεων από το εκχύλισμα, ενώ το Oasis PRiME HLB είναι πολυμερές που απομακρύνει φωσφολιπίδια από λιπαρά υποστρώματα. Στην περίπτωση του Oasis PRiME HLB, οι αναλυτές και όχι οι συν-εκχυλιζόμενες ουσίες, κατακρατούνται από το προσροφητικό. Έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε μπαχαρικά και φρούτα (Rejczak T. et al., 2015; Valera-Martinez D.A. et al., 2020; Santana-Mayor A. et al., 2019).

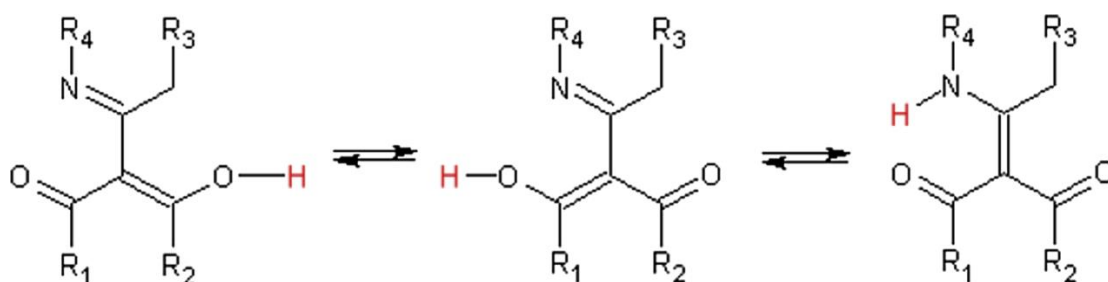
3.3.4. ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ

Οι περισσότεροι αναλυτές εμφανίζουν ικανοποιητικές ανακτήσεις με τις επίσημες μεθόδους QuEChERS, ωστόσο μερικοί παρουσιάζουν χαμηλές αποδόσεις και απαιτούν τροποποιήσεις ή ακόμα και ξεχωριστές διεργασίες. Στην κατηγορία αυτή εντάσσονται οι πολικοί, οι όξινοι και οι βασικοί αναλύτες (Rejczak T. et al., 2015).

Τα φυτοφάρμακα περιλαμβάνουν ενώσεις οι οποίες, μπορούν να ιονιστούν σε χαμηλές ή υψηλές τιμές pH αντίστοιχα, ανάλογα με τις φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Τα όξινα φυτοφάρμακα ιονίζονται σε υδατικό μέσο. Οι ιοντικές τους μορφές, είναι υδρόφιλες και η εκχύλισή τους με τη χρήση μη πολικών οργανικών διαλυτών, καθίσταται δύσκολη. Επιπλέον τα όξινα φυτοφάρμακα έχουν καρβοξυλικές ομάδες και μπορούν να συνδεθούν ομοιοπολικά με συστατικά του υποστρώματος, με αποτέλεσμα να μειώνεται η συγκέντρωση αυτών κατά την διεξαγωγή της μεθόδου (Musarurwa H. et al., 2019). Για την επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος, προτείνεται η διεργασία της αλκαλικής υδρόλυσης. Με την προσθήκη διαλύματος 5N NaOH, την παραμονή του δείγματος για 30

λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και την εξουδετέρωσή του με τη χρήση διαλύματος 5N H₂SO₄, οι αναλύτες απελευθερώνονται από τις ομοιοπολικές τους συζεύξεις (Rejczak T. et al., 2015). Οι Steinborn et al. (2017), εφάρμοσαν με επιτυχία την αλκαλική υδρόλυση κατά την ανάλυση των όξινων φυτοφαρμάκων dichlorprop, fluazifop και haloxyfop. Τα φυτοφάρμακα εκχυλίσθηκαν από διαφορετικά υποστρώματα τροφίμων, όπως είναι το φυστικοβούτυρο, οι ηλιόσποροι, το καλαμπόκι, το λευκό ψωμί και τα πορτοκάλια, χρησιμοποιώντας την μέθοδο QuEChERS (Musarurwa H. et al., 2019).

Ο σχηματισμός ισομερών δομών ορισμένων όξινων φυτοφαρμάκων, αποτελεί μια ακόμα δυσκολία κατά την ανάλυση αυτών. Τα ηλεκτρόνια που συμμετέχουν στον σχηματισμό διπλών δεσμών στο μόριο της ένωσης, μπορούν να εναλλάσσονται μεταξύ των ατόμων, τροποποιώντας την δομή του φυτοφαρμάκου. Με αυτό τον τρόπο, το μόριο του φυτοφαρμάκου υπάρχει σε υβριδική κατάσταση, μεταξύ διαφορετικών δομών που σχηματίζονται. Η δημιουργία των ισομερών, οδηγεί σε λήψη πολύπλοκων χρωματογραφημάτων. Στην Εικόνα 7 απεικονίζονται ισομερείς δομές όξινων φυτοφαρμάκων (Musarurwa H. et al., 2019).



Εικόνα 7. Ισομερείς δομές όξινων φυτοφαρμάκων.

Απώλειες όξινων φυτοφαρμάκων, μπορούν να προκληθούν επίσης, λόγω της χρήσης του PSA ως προσροφητικό μέσο, κατά το στάδιο του καθαρισμού του εκχυλίσματος (Rejczak T. et al., 2015). Το PSA κατατάσσεται στην κατηγορία των βασικών αντιδραστηρίων, όσον αφορά το pH, και δεν είναι κατάλληλο για την ανάλυση όξινων φυτοφαρμάκων, λόγω του γεγονότος ότι δημιουργεί αλληλεπιδράσεις οξέος - βάσεων με αυτά (Musarurwa H. et al., 2019). Σε αυτή τη περίπτωση, η χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων είναι υψίστης σημασίας, προκειμένου να ληφθούν τα όξινα φυτοφάρμακα. Στην περίπτωση του ethoxyquin, η διατήρηση των δειγμάτων σε χαμηλές θερμοκρασίες, συμβάλει στη λήψη καλύτερων ανακτήσεων (Rejczak T. et al., 2015).

Ένας άλλος πολύπλοκος αναλύτης, που δείχνει φτωχή αποτελεσματικότητα εκχύλισης και απαιτεί ξεχωριστή διαδικασία προσδιορισμού, είναι το ευρέως

χρησιμοποιούμενο μυκητοκτόνο, chlorothalonil. Η ανάλυσή του με πολυ-υπολειμματικές μεθόδους καθίσταται δύσκολη, λόγω της τάσης του να εμφανίζει απώλειες κατά την προετοιμασία του δείγματος, την αποθήκευση του εκχυλίσματος και κατά την διάρκεια της μέτρησής του με αέρια χρωματογραφία. Για τον ακριβή προσδιορισμό και την ποσοτικοποίησή του, απαιτούνται τροποποιήσεις. Αυτές περιλαμβάνουν την οξίνιση του εκχυλίσματος με διάλυμα θειικού οξέος, για την επίτευξη τελικού pH ίσο με 1. Η προσθήκη ρυθμιστικών αλάτων και ο καθαρισμός του εκχυλίσματος με d-SPE πρέπει να αποφευχθούν, για να μην υπάρξουν περεταίρω απώλειες. Η ανάλυσή του πραγματοποιείται με GC-MS ή LC-MS/MS με APCI στην αρνητικά φορτισμένη μορφή (Rejczak T. et al., 2015).

Μερικοί εξαιρετικά πολικοί αναλύτες με $\log K_{ow}$ μικρότερο του -2, θεωρούνται ακατάλληλοι προς ανάλυση με τη μέθοδο QuEChERS, λόγω του γεγονότος ότι δεν κατανέμονται ή κατανέμονται ασθενώς στην οργανική φάση, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν πολύ χαμηλές ανακτήσεις. Στην κατηγορία αυτή συγκαταλέγονται τα φυτοφάρμακα chlormequat, meriquat και glyphosat (Rejczak T. et al., 2015).

3.3.5. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΤΡΟΦΙΜΟΥ

Η επίδραση του υποστρώματος ορίζεται ως η διαφορά του σήματος προτύπου διαλύματος αναλύτη, σε σύγκριση με το σήμα του υποστρώματος, δεδιαλυμένα στον ίδιο διαλύτη. Η εκτίμηση της επίδρασης του υποστρώματος, είναι σημαντική για την εξαγωγή αποδεκτών αποτελεσμάτων, που χαρακτηρίζονται από αποδεκτή ακρίβεια (Rejczak T. et al., 2015).

Τρόφιμα με περιεκτικότητα σε νερό μικρότερη του 80%, απαιτούν ενυδάτωση, με σκοπό η συνολική μάζα του δείγματος να κυμαίνεται στα 10g. Η προσθήκη ύδατος αποσκοπεί στην αποδυνάμωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ αναλυτών και συστατικών του υποστρώματος, έτσι ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής διαχωρισμός. Οι αλληλεπιδράσεις των φυτοφαρμάκων με τη μήτρα των τροφίμων, οδηγούν συχνά σε χαμηλές ανακτήσεις λόγω μη – αποδοτικής εκχύλισης τους καθώς και λόγω συνεχυλιζόμενων ενώσεων, οι οποίες παρεμποδίζουν την χρωματιγραφική ανάλυση λόγω π.χ. έμφραξης αναλυτικών στηλών, μείωση του ιονισμού και συνεπώς του σήματος κ.α. (Rejczak T. et al., 2015; Musarurwa H. et al., 2019).

Στην κατηγορία των τροφίμων με περιεκτικότητα σε νερό μικρότερη του 80%, συγκαταλέγονται τα λιπαρά τρόφιμα (π.χ. ελιές και ελαιούχοι σπόροι, λάδι, γάλα και

γαλακτοκομικά προϊόντα, ψάρι, κρέας) και η ξηρά τροφή (π.χ. ξηροί καρποί, δημητριακά) (Rejczak T. et al., 2015; Musarurwa H. et al., 2019). Σε σύγκριση με τα λαχανικά, τα δημητριακά όπως το καλαμπόκι, και τα φρούτα έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, γι' αυτό και καθίστανται δύσκολα στην επεξεργασία τους. Κατά την εφαρμογή της QuEChERS, αποτελεσματικά προσροφητικά θεωρούνται τα υλικά με προσδεδεμένη αλυσίδα C₁₈ σε σίλικα, το Z-sep για την απομάκρυνση των λιπών, ενώ για τρόφιμα με υψηλή συγκέντρωση χρωστικών, χρησιμοποιούνται το GCB και το ChloroFiltr[®] (Musarurwa H. et al., 2019).

Τρόφιμα ζωικής προέλευσης (π.χ. γάλα, κρέας), είναι πλούσια σε πρωτεΐνες και λιπαρά συστατικά, τα οποία μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα φυτοφάρμακα. Τα μη πολικά φυτοφάρμακα συνδέονται με τα λιπίδια μέσω υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, ενώ οι ιοντικές μορφές των πρωτεϊνών και τα αμινοξέα σχηματίζουν ιοντικές αλληλεπιδράσεις, τόσο με τα βασικά, όσο και με τα όξινα φυτοφάρμακα. Η αποδέσμευση των πολικών φυτοφαρμάκων από τις πρωτεΐνες, επιτυγχάνεται μέσω της καθίζησης των πρωτεϊνών. Οργανικοί διαλύτες όπως είναι το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη και η αιθανόλη χρησιμοποιούνται για την καταβύθισή τους. Για την απομάκρυνση του λίπους, χρησιμοποιούνται προσροφητικά υλικά όπως είναι το Z-Sep και το Florisil[®] αλλά και στάδιο κατάψυξης του δείγματος (Musarurwa H. et al., 2019). Η επεξεργασία της κατάψυξης του εκχυλίσματος για μερικές ώρες, χρησιμοποιείται ώστε να επιτευχθεί η καθίζηση λιπών, σακχάρων και άλλων παρεμβολών του υποστρώματος. Η υπερκείμενη φάση στη συνέχεια λαμβάνεται ή φυγοκεντρείται σε ψυχόμενη φυγόκεντρο πριν την παραλαβή της. Σε ορισμένες περιπτώσεις, το φιλτράρισμα μέσω φίλτρων σύριγγας είναι επίσης απαραίτητο (Pavkovich A.M. et al., 2019).

Πολύ όξινα τρόφιμα όπως είναι οι φράουλες, τα σμέουρα και τα εσπεριδοειδή, ανήκουν στην κατηγορία, των δύσκολων προς ανάλυση υποστρωμάτων. Παρόλο που το pH των συγκεκριμένων φρούτων μπορεί να ρυθμιστεί, η ύπαρξη πηκτίνης και φλαβονοειδών στην φλούδα των εσπεριδοειδών, καθώς επίσης και η ύπαρξη μονοτερπενίων, αλειφατικών υδρογονανθράκων και χρωστικών στα έλαια αυτών, αποτελούν παρεμποδίσεις κατά την ανάλυση. Κατά την εφαρμογή της EN QuEChERS απαιτείται η προσθήκη διαλύματος 5N NaOH σε ποσότητα 600μL για τα εσπεριδοειδή και 200μL για τα σμέουρα (Rejczak T. et al., 2015).

3.3.6. ΟΜΟΓΕΝΟΠΟΙΗΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η ομογενοποίηση του δείγματος θεωρείται σημαντικός παράγοντας για την αποτελεσματική εφαρμογή της QuEChERS, όπως και σε κάθε μεθοδολογία ανάλυσης καθώς η μάζα του δείγματος που θα εκχυλιστεί θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική του αρχικού δείγματος (Rejczak T. et al., 2015). Η ομογενοποίηση του δείγματος πραγματοποιείται συνήθως είτε με αναδευτήρα δίνης (vortex), για τα υγρά δείγματα, είτε με τη χρήση κατάλληλης συσκευής ομογενοποίησης. Η χρήση vortex προτιμάται όταν ικανοποιεί τις απαιτήσεις ομογενοποίησης καθώς είναι πιο απλό στη χρήση, ενώ παράλληλα είναι πιο ασφαλές από άλλες συσκευές ομογενοποίησης, καθώς τα δείγματα δεν εκτίθενται σε μεταλλικές επιφάνειες, με αποτέλεσμα να αποφεύγονται οι επιμολύνσεις. Ακόμα το vortex έχει χαμηλό κόστος απόκτησης και δεν απαιτεί υψηλή τεχνογνωσία για την συντήρησή του (Santana-Mayor A. et al., 2019).

Η ομογενοποίηση των δειγμάτων με περιεκτικότητα μεγαλύτερη του 80% σε νερό, όπως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά, μπορεί να γίνει επίσης με κρυογονική άλεση ή κατόπιν λυοφυλίσωσης (freeze - drying). Η κρυογονική άλεση, βασίζεται στη χρήση του ξηρού πάγου και συνίσταται κατά την ανάλυση, ευαίσθητων στη θερμοκρασία, φυτοφαρμάκων. Ο ξηρός πάγος βοηθάει στην αύξηση της ομοιογένειας του δείγματος και στην πρόληψη της υποβάθμισης του αναλυτή (Pavkovich A.M. et al., 2019).

3.4. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Η μέθοδος QuEChERS έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό ενός μεγάλου εύρους αναλυτών. Σε αυτούς συγκαταλέγονται φαρμακευτικές ενώσεις (π.χ. αντιφλεγμονώδη, αντιβιοτικά, ηρεμιστικά κλπ), οι μυκοτοξίνες, οι πολυφαινόλες και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια, οι στεροειδής ορμόνες, οι ενώσεις τεταρτοταγούς αμμωνίου, τα φυτο-οιστρογόνα, τα αλκαλοειδή, οι όξινοι φθαλικοί εστέρες, τα ανόργανα ιόντα και τα φυτοφάρμακα (Santana-Mayor A. et al., 2019). Τα φυτοφάρμακα θεωρούνται μακράν τα πιο μελετημένα, καθώς η μέθοδος δημιουργήθηκε αρχικά για την ανάλυσή τους. Στον Πίνακα 1. αναφέρονται παραδείγματα ανάλυσης φυτοφαρμάκων με την μέθοδο QuEChERS, για μια πληθώρα υποστρωμάτων (Valera-Martinez D.A. et al., 2020).

Πίνακας 1. Προσδιορισμός υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων με εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS σε διάφορα υποστρώματα τροφίμων.

Αναλύτες	Υπόστρωμα	Εκχύλιση		Καθαρισμός δειγματος (d-SPE)	Αναλυτική τεχνική	Ανάκτηση (%)	LOQs (μg/kg)	Αναφορά
		Διαλύτης	Άλατα					
205 φυτοφάρμακα	Μπαχαρικό (2g)	MeCN (10mL)	MgSO ₄ (4g), NaCl (1g), Na ₃ Cit2H ₂ O (1g), Na ₂ HCit1.5H ₂ O (0.5 g)	EMR-lipid, EMR polish (0.2g NaCl και 0.8g MgSO ₄)	GC-MS/MS	70–120 για το 90% των αναλυτών	2	Halme E. et al., 2018
60 φυτοφάρμακα	Καραβίδες, γαρίδες	MeCN (10mL)	NaCl (3g)	PSA (50mg)	HPLC-MS/MS	70–120	0.4–10	Song S. et al., 2018
69 φυτοφάρμακα	Σιτάρι, ρύζι (2g)	H ₂ O με 2% (v/v) φορμικό οξύ (5mL) MeCN (20mL)	NaCl (3g)	Σιτάρι: MgSO ₄ (30mg), PSA (20mg) Ρύζι: MgSO ₄ (30mg), C ₁₈ (20mg)	LC-MS/MS	70–120 για το 90% των αναλυτών	40–200	Zhang Z. et al., 2016
60 φυτοφάρμακα	Φλοιός κανέλλας (2g)	MeCN (10mL)	(α) HCOONH ₄ (2.5g), (β) NaCl (2.5g)	MgSO ₄ (150 mg), C ₁₈ (50 mg)	LC-MS/MS	71-118 για το 73% των αναλυτών	0.5	Zhang Z. et al., 2018
40 φυτοφάρμακα	Μήλο, μπανάνα, μπρόκολο, σέλερι, στραφύλι, ροδάκινο, πράσινα φασόλια, πατάτα, πορτοκάλι (15, 10, 5, 2 και 1g)	MeCN (1mL/g)	4:1 MgSO ₄ :NaCl (0.5g ανά 1g δειγματος)	MgSO ₄ :PSA:C ₁₈ :Carbo nX (20:12:12:1w/w/w/w) (45mg)	(LP)GC-MS/MS και UHPLC-MS/MS	70–120		Lehotay S.J. et al., 2018
20 φυτοφάρμακα	Μήλο, μπρόκολο, κρεμμύδι (5g), τσάι (1g)	MeCN (20mL)	MgSO ₄ (2g), NaCl (2g)	PVPP(150mg),PSA(50 mg) και GCB (10mg)	UPLC-MS/MS	73–106	1-2	Guo J. et al., 2019
170 φυτοφάρμακα	Πράσινη πιπεριά, αγγούρι (15g)	MeOH με 1% (v/v) HOAc (15mL)	MgSO ₄ (6g) και NaOAc (1.5g)	MgSO ₄ (112.5mg) και PSA (18.75mg)	LC-MS/MS	70–120 για το 95% των αναλυτών	0.1	Golge O. et al., 2018
43 φυτοφάρμακα	Μέλι (0.5g)	MeCN (5mL)	MgSO ₄ (4g), NaCl (1g)	MgSO ₄ (150mg) και PSA(50mg)	GC-MS/MS και LC-MS/MS	85-116	2.8	Barganska Z. et al., 2018
81 φυτοφάρμακα	Ντομάτα (5g)	MeCN	MgSO ₄ (2g), NaOAc (1.5g)	MgSO ₄ (60mg) και PSA (20mg)	GC-MS	72-116	7.5-20 ng/g	Salamzadeh J. et al., 2018
47 φυτοφάρμακα	Τσάι (2g)	MeCN με 1% HAc	MgSO ₄ (4g), NaCl (1g)	MWCNTs (45mg), PSA (75mg)	GC-MS/MS	70-120	0.1-52.5	Li J. et al., 2017
2 φυτοφάρμακα	Βρεφικές τροφές (2.5g για στερεή τροφή, 5g για υγρή)	MeCN	MgSO ₄ (4g), NaCl (1g)	MgSO ₄ (150mg), C ₁₈ (50mg)	UHPLC-MS/MS	92-114	0.003	Koesukwiwat U. et al., 2018

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QuECHERS ΣΤΟ ΛΑΔΙ

Το ελαιόλαδο θεωρείται ένα από τα σπουδαιότερα προϊόντα παραγωγής της Μεσογείου, και ειδικότερα της Ελλάδας, ενώ αποτελεί την κύρια πηγή λιπιδίων στη μεσογειακή διατροφή. Παράγεται από τον καρπό των ελαιόδεντρων (*Olea europaea*) και η κατανάλωσή του έχει ευεργετική επίδραση στην ανθρώπινη υγεία, καθώς σχετίζεται με την μείωση του κινδύνου εμφάνισης καρδιαγγειακών παθήσεων, νευρολογικών διαταραχών, καρκίνου του μαστού αλλά και του παχέος εντέρου. Τα οφέλη του στην υγεία του ανθρώπου, έχουν προκαλέσει την αύξηση της ζήτησής του παγκοσμίως (Likudis Z. et al., 2014; Cuncha S.C. et al., 2010; García-Reyes J.F. et al., 2007).

Η περιοχή της Μεσογείου είναι υπεύθυνη για το 95% της παγκόσμιας παραγωγής του ελαιολάδου, εκ' των οποίων το 92% προέρχεται από χώρες όπως η Ισπανία (36%), η Ιταλία (25%), η Ελλάδα (18%), η Τυνησία (8%) και η Τουρκία (5%). Οι χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης αντιπροσωπεύουν ακόμα το 72% της παγκόσμιας κατανάλωσης του ελαιολάδου, ενώ σημαντική κρίνεται και η συνεισφορά των Ηνωμένων Πολιτειών, του Καναδά, της Αυστραλίας και της Ιαπωνίας (Caboni P. et al., 2010).

Η ποιότητα του ελαιολάδου εξαρτάται άμεσα από την ποιότητα της πρώτης ύλης. Ο καρπός του ελαιόδεντρου είναι επιρρεπής σε διάφορες ασθένειες που οφείλονται σε παράσιτα, μύκητες και έντομα. Η κυριότερη ασθένεια στα ελαιόδεντρα της Μεσογείου, είναι αυτή που προκαλείται από το παράσιτο *Bactrocera oleae* και είναι υπεύθυνη για την πρόωγη πτώση των καρπών (Hakme E. et al., 2018). Ωστόσο και άλλα παράσιτα όπως είναι τα *Dacus oleae*, *Prays oleae* και *Saissetia oleae* μπορούν δυνητικά να προσβάλλουν τους καρπούς της ελιάς, και να υποβαθμίσουν τον ελαιοκαρπό ή το παραγόμενο ελαιόλαδο (Amvrazi E.G. et al., 2009).

Προκειμένου να αποφευχθούν πιθανές απώλειες κατά την συγκομιδή των καρπών, ή την παραγωγή του ελαιολάδου, οι οποίες έχουν αρνητικό αντίκτυπο στην οικονομία της κάθε χώρας, γίνεται χρήση ποικίλων αγροχημικών προϊόντων στους ελαιώνες (García-Reyes J.F. et al., 2007). Διάφοροι τύποι φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων των εντομοκτόνων, των μυκητοκτόνων και των ζιζανιοκτόνων χρησιμοποιούνται για την καταστροφή, την πρόληψη ή τον έλεγχο των παρασίτων (Razzaghi N. et al., 2018).

Τα ζιζανιοκτόνα και τα εντομοκτόνα είναι μακράν τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα στις καλλιέργειες ελαιών και υπολείμματά τους εντοπίζονται συχνά στο ελαιόλαδο (Guardia Rubio M. et al., 2006). Τα παρασιτοκτόνα

που εφαρμόζονται στα ελαιόδεντρα του Ελλαδικού χώρου ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες. Για παράδειγμα διάφορα οργανοφωσφορικά, πυρεθρινοειδή, καρβαμικά και βενζοϋλουρίες χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα, ενώ ποικίλα υποκατάστατα ουρίας και άλατα διπυριδινίου εφαρμόζονται ως ζιζανιοκτόνα (Tsoutsis C. et al., 2008). Αντίστοιχα στα μυκητοκτόνα συγκαταλέγονται τριαζόλες, ιμιδαζόλες και σουλφοναμίδες (Cuncha S.C. et al., 2010). Στον Πίνακα 2., παρουσιάζονται οι εγκεκριμένες, από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, φυτοπροστατευτικές ενώσεις που εφαρμόζονται στα ελαιόδεντρα του Ελλαδικού χώρου και κατατάσσονται στις κατηγορίες των εντομοκτόνων, των μυκητοκτόνων και των ζιζανιοκτόνων αντίστοιχα (www.minagric.gr).

Πίνακας 2. Εγκεκριμένες φυτοπροστατευτικές ενώσεις που εφαρμόζονται στα ελαιόδεντρα του Ελλαδικού χώρου (www.minagric.gr).

	<i>Εντομοκτόνα</i>	<i>Ζιζανιοκτόνα</i>	<i>Μυκητοκτόνα</i>
1.	Abamectin (aka avermectin)	Diflufenican	Azoxystrobin
2.	Acetamiprid	Flazasulfuron	Difenoconazole
3.	β-Cyfluthrin	Florasulam	Dodine
4.	Deltamethrin	Fluazifop-p-butyl	Fenbuconazole
5.	Fenoxycarb	Flumioxazine	Kresoxim-methyl
6.	λ-Cyhalothrin	Fluroxypyr	Mancozeb
7.	Phosmet	Iodosulfuron	Pyraclostrobin
8.	Pyriproxyfen	MCPA	Tebuconazole
9.	Spinetoram	Mefenpyr	Trifoxystrobin
10.	Spinosad	Metribuzin	
11.	Spirotetramat	Oxyfluorfen	
12.	Thiacloprid	Penoxsulam	
13.	ζ-Cypermethrin	Tribenuron	

Με στόχο την προστασία του καταναλωτή και του περιβάλλοντος από τις επιβλαβείς επιπτώσεις που παρουσιάζουν τα παρασιτοκτόνα, έχουν θεσπιστεί νόμοι σε κάθε χώρα αλλά και διεθνώς, σχετικά με τα ανώτατα επιτρεπτά όρια (maximum residue levels, MRLs) των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων για ποικίλα γεωργικά προϊόντα (Cuncha S.C. et al., 2010). Επιπλέον έχουν θεσπιστεί εθνικά προγράμματα παρακολούθησης των υπολειμμάτων στα τρόφιμα παγκοσμίως (Ozkara A. et al., 2016). Η ποσότητα των υπολειμμάτων εξαρτάται από τον αριθμό των εφαρμογών της φυτο-προστατευτικής ένωσης, τον ρυθμό αποδόμησης του ενεργού συστατικού καθώς και από το διάστημα που επέρχεται από την εφαρμογή του φυτοφαρμάκου έως την συγκομιδή του καρπού. Τα

περισσότερα φυτοφάρμακα είναι λιποδιαλυτά, και εξαιτίας του γεγονότος ότι χρειάζονται κατά μέσο όρο 5 κιλά ελιές για να ληφθεί 1 λίτρο λάδι, η συσσώρευση υπολειμμάτων τους στο λάδι παρουσιάζει υψηλή πιθανότητα. (Guardia Rubio M. et al., 2006).

Τα MRLs ποικίλλουν ανάλογα με το είδος των παρασιτοκτόνων που χρησιμοποιούνται, τις κλιματολογικές συνθήκες της εκάστοτε περιοχής, καθώς και ανάλογα με το είδος του τροφίμου (Razzaghi N. et al., 2018). Ο κανονισμός Codex Alimentarius έχει θεσπίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια για πέντε παρασιτοκτόνα στο παρθένο ελαιόλαδο και για δύο στο εξευγενισμένο ελαιόλαδο. Πιο συγκεκριμένα, για το παρθένο ελαιόλαδο όρισε ανώτατα επιτρεπτά όρια για το carbaryl (25 mg/kg), το cypermethrin (0,5 mg/kg), το fenthion (1 mg/kg), το kresoxim-methyl (0,7 mg/kg) και το trifloxystrobin (0,9 mg/kg). Αντίστοιχα για το εξευγενισμένο ελαιόλαδο όρισε, για το cypermethrin (0,5 mg/kg) και για το trifloxystrobin (1,2 mg/kg) (Hakme E. et al., 2018).

Αντίστοιχα η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων, που χαρακτηρίζονται από αυξημένη αυστηρότητα ενώ καλύπτουν ένα ευρύτερο φάσμα φυτοφαρμάκων. 365 παρασιτοκτόνα για ελαιούχους σπόρους, 396 παρασιτοκτόνα για ελαιούχους καρπούς και 472 παρασιτοκτόνα για την ελιά και το ελαιόλαδο έχουν καθοριστεί σύμφωνα με τον κανονισμό ΕΚ αριθ. 396/2005. Τα ανώτατα επιτρεπτά όρια κυμαίνονται στο εύρος 0,01-0,05 mg/kg. Εξαιτίας του γεγονότος ότι το ελαιόλαδο προέρχεται από την επεξεργασία της ελιάς, διάφοροι παράγοντες επεξεργασίας (processing factor, PF) έχουν ενταχθεί στις τροποποιήσεις των κανονισμών. Οι PF εξαρτώνται από την διαδικασία της εκχύλισης. Για τα λιποδιαλυτά φυτοφάρμακα στο ελαιόλαδο, έχει εφαρμοστεί ο παράγοντας επεξεργασίας 5 (Hakme E. et al., 2018).

Στον Πίνακα 3. αναφέρονται τα διαφορετικά ανώτατα επιτρεπτά όρια που έχουν καθοριστεί από τον Codex Alimentarius, την Ευρωπαϊκή Ένωση καθώς και από το Ιαπωνικό Ίδρυμα Χημικών Ερευνών Τροφίμων για διάφορες κατηγορίες ελαιολάδου. Οι διαφορές στα MRLs που έχουν καθοριστεί για το ίδιο παρασιτοκτόνο από διαφορετικούς κανονισμούς, καθώς και η απαγόρευση χρήσης ορισμένων παρασιτοκτόνων σε ορισμένες χώρες μπορούν να προκαλέσουν σύγχυση κατά τις εμπορικές συναλλαγές (Hakme E. et al., 2018).

Πίνακας 3. Ανώτατα επιτρεπτά όρια (mg/kg) που έχουν καθοριστεί για ελαιόλαδα (Hakme E. et al., 2018).

Παρασιτοκτόνο	Ευρωπαϊκή Ένωση	Codex Alimentarius		Ιαπωνικό Ίδρυμα Χημικών Ερευνών Τροφίμων
	MRLs για ελαιόλαδο	Εξευγενισμένο ελαιόλαδο	Παρθένο ελαιόλαδο	Βρώσιμο παρθένο ελαιόλαδο
Carbaryl	0,1		25	25
Fenthion	0,05		1	1
Methidation	0,1			2
Dimethoate	0,6			
Cypermethrin	0,25	0,5	0,5	
Trifloxystrobin	1,5	1,2	0,9	

* τα ανώτατα επιτρεπτά όρια της Ευρωπαϊκής Ένωση για το ελαιόλαδο αναφέρονται για προεπιλεγμένο παράγοντα επεξεργασίας 5 για όλα τα αναγραφόμενα παρασιτοκτόνα εκτός από το dimethoate για το οποίο είναι 0,3.

Σύμφωνα με την ετήσια αναφορά της Ευρωπαϊκής Αρχής για την ασφάλεια των τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA), το 2012 το ποσοστό συμμόρφωσης στους κανονισμούς κυμαίνεται στο 78% μεταξύ των 794 δειγμάτων ελαιολάδου που μελετήθηκαν. 175 δείγματα περιείχαν ένα ή περισσότερα υπολείμματα παρασιτοκτόνων, ενώ τα φυτοφάρμακα που ανιχνεύθηκαν με μεγαλύτερη συχνότητα ήταν το chlorpyrifos (14,1%) και το terbuthylazine (12,0%). Επίσης το 68% των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν ανήκουν την κατηγορία των εντομοκτόνων, ενώ ακολουθούν τα μυκητοκτόνα με 14% και τα ζιζανιοκτόνα με 11%. Οι χημικές κατηγορίες των φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν είναι τα οργανοφωσφορικά (42%), τα οργανοχλωριωμένα (21%) και ακολουθούν τα πυρεθρινοειδή, οι αζόλες και οι τριαζίνες με ποσοστό 17%. Τα επίπεδα όλων των παρασιτοκτόνων ήταν κάτω από τα αντίστοιχα MRLs, σύμφωνα με το Ευρωπαϊκό κανονισμό. Εξαιρέση αποτέλεσε το terbuthylazine το οποίο σε 4 δείγματα ελαιολάδου εμφάνισε υπολειμματική συγκέντρωση μεγαλύτερη του MRL (Hakme E. et al., 2018).

4.1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΑ

Στοχεύοντας στη διασφάλιση της τήρησης των εθνικών και διεθνών οδηγιών που σχετίζονται με τα υπολείμματα παρασιτοκτόνων στα τρόφιμα, η παρακολούθηση αυτών καθίσταται επιτακτική ανάγκη. Εξαιτίας του μεγάλου εύρους των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται, αλλά και εξαιτίας των χαμηλών συγκεντρώσεων στις οποίες

απαντώνται, η ανάλυση των υπολειμμάτων θεωρείται ένας από τους δυσκολότερους και πιο απαιτητικούς τομείς της αναλυτικής χημείας (Cuncha S.C. et al., 2010). Έχουν δημοσιευθεί αρκετές μελέτες για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε σύνθετα λιπαρά υποστρώματα, προσφέροντας ποικίλες βελτιωμένες μεθόδους (Amvrazi E.G. et al., 2009). Οι λιπαρές ύλες καλύπτουν το 10-30% των συστατικών της ελιάς και το 95-100% των συστατικών του ελαιολάδου (Cuncha S.C. et al., 2010). Συνεπώς η ανάπτυξη τεχνικών που χαρακτηρίζονται από ακρίβεια, ευαισθησία και υψηλή εκλεκτικότητα κρίνεται απαιτητική. Μέχρι στιγμής οι μέθοδοι ανάλυσης των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα ελαιόλαδα περιλαμβάνουν δύο κύρια στάδια, το στάδιο της εκχύλισης των φυτοφαρμάκων, με ένα επακόλουθο καθαρισμό του εκχυλίσματος και το στάδιο του προσδιορισμού τους (Hakme E. et al., 2018).

Από το 2001 έως πρόσφατα ποικίλες τεχνικές εκχύλισης και καθαρισμού έχουν υιοθετηθεί για το ελαιόλαδο. Πιο συγκεκριμένα, από το 2001 έως το 2005 η κύρια τεχνική εκχύλισης υπήρξε η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE) ακολουθούμενη από την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Ωστόσο με την πάροδο του χρόνου και άλλες τεχνικές εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό. Σε αυτές συμπεριλαμβάνονται η εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης υποστρώματος (MSPD), η μικρο-εκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), η χρωματογραφία διαχωρισμού πηκτής (GPC) και η τεχνική QuEChERS.

Η χρήση της εκχύλισης QuEChERS για τον πολύ-υπολειμματικό προσδιορισμό παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο αλλά και σε άλλα έλαια, παρουσιάζει πολλές εφαρμογές. Στον Πίνακα 4. παρατίθενται οι αναφορές που κάνουν χρήση της μεθόδου QuEChERS για τον πολυ-υπολειμματικό προσδιορισμό των παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο, ο αριθμός των φυτοφαρμάκων που μελετήθηκε στην κάθε περίπτωση, οι τεχνικές καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και οι αναλυτικές τεχνικές, οι ανακτήσεις, οι % τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων (relative standard deviation, %RSD) και τα όρια ανίχνευσης (limit of detection, LODs) και ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQs).

Πίνακας 4. Βιβλιογραφική ανασκόπηση πολύ-υπολειμματικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκων στο ελαιόλαδο με χρήση της μεθόδου QuEChERS.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ		ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ	ΑΝΑΛΥΣΗ	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)	ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (RSD %)	LOD-LOQ (μg/kg)	ΑΝΑΦΟΡΑ
		ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΑΛΑΤΑ						
165 φυτοφάρμακα	Διάφοροι τύποι ελαίου (15g)	15mL ACN, 15μL εσωτερικό πρότυπο	6g MgSO ₄ , 15g NaCl, 15g sodium citrate tribasic dehydrate, 0,75g disodium hydrogen citrate sesquihydrate	Freezing out ακολουθώμενο από d-SPE EMR-lipid	UHPLC-QqQ-MS/MS	70-120	<20	LOQ: 10-50	Dias J.V. et al., 2016
213 φυτοφάρμακα	Διάφοροι τύποι ελαίου (15g)	15mL ACN	4g MgSO ₄ , 1g NaCl, 1g trisodium citrate dehydrate, 0,5g disodium hydrogen citrate sesquihydrate	Freezing out with dry ice στους -76°C ακολουθώμενο από: 1)d-SPE EMR-lipid 2)d-SPE (125mg PSA, 750mg MgSO ₄) 3)d-SPE (125mg Z-Sep, 750mg MgSO ₄) 4)d-SPE (45mg Z-Sep)	GC-EI-TOF-MS GC-MS/MS	70-120	1. 4,0 2. 7,2 3. 7,9 4. 9,7	LOQ: 10-20	Parrilla Vázquez P. et al., 2016
30 καρβαμικά	Διάφοροι τύποι ελαίου (3g)	7mL H ₂ O, 10mL ACN	4g άνδρο MgSO ₄ , 1g NaCl	d-SPE (150mg Z-Sep ⁺ , 150mg MgSO ₄)	UHPLC-MS/MS	71-110	≤10	LOQ: 0,09-2	Moreno-González D. et al., 2014
67 φυτοφάρμακα	Ελαιόλαδο (3g)	7mL Milli-Q H ₂ O, 10mL ACN με 1% οξικό οξύ	4g άνδρο MgSO ₄ , 1g NaCl	1)d-SPE (250mg PSA, 250mg C ₁₈ , 750mg anhydrous MgSO ₄) 2)d-SPE (250mg Z-Sep ⁺) 3)d-SPE (1.6g MgSO ₄ , 1g EMR-lipid, 0.4g NaCl)	UHPLC-QqQ-MS/MS	70-120 για τους 55 αναλύτες χρησιμοποιώντας EMR-lipid	<20	LOQ: 0,1-90 (EMR-lipid)	López-Blanco R. et al., 2016
162 φυτοφάρμακα	Παρθένο ελαιόλαδο (3g)	7mL Milli-Q H ₂ O, 10mL ACN με 1% οξικό οξύ	4g άνδρο MgSO ₄ , 1g NaCl	d-SPE (1g EMR-lipid, 400mg NaCl, 1600mg MgSO ₄)	Nanoflow LC-MS/MS	71-119	<20	LOQ: 0,05-50	He Z. et al., 2016

Πίνακας 4. (συνέχεια) Βιβλιογραφική ανασκόπηση πολύ-υπολειμματικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκων στο ελαιόλαδο με χρήση της μεθόδου QuEChERS.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ		ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ	ΑΝΑΛΥΣΗ	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)	ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (RSD %)	LOD-LOQ (µg/kg)	ΑΝΑΦΟΡΑ
		ΔΙΑΛΥΤΕ Σ	ΑΛΑΤΑ						
44 φυτοφάρμακα	Διάφοροι τύποι ελαίου (3g)	7mL H ₂ O, 10mL ACN	4g άνυδρο MgSO ₄ , 1g NaCl	1)d-SPE (250mg PSA, 250mg C ₁₈ , 250mg GCB, 750mg MgSO ₄) 2)d-SPE χρησιμοποιώντας συνδυασμό PSA- C ₁₈ και MgSO ₄ 3)d-SPE χρησιμοποιώντας PSA + MgSO ₄	LC-MS/MS	1) 52-131 2) 53-109 3) 76-110	1) 8-41 2) 3-19 3) 3-18	LOD: 1) 1-5 2) 10-50 3) 10-50	Polgár L. et al., 2012
100 φυτοφάρμακα	Ελαιόλαδο (3g)	7mL H ₂ O, 10mL ACN	4g άνυδρο MgSO ₄ , 1g NaCl	d-SPE (750mg MgSO ₄ , 250mg PSA, 250mg C ₁₈ , 250mg GCB)	LC-MS- Qtrap	73-130	<10	LOD: ≤1 LOQ: 0.03-10	Hernando M.D. et al., 2007
16 φυτοφάρμακα	Ελαιόλαδο (3g)	7mL H ₂ O, 10mL ACN	4g άνυδρο MgSO ₄ , 1g NaCl	d-SPE (150mg MgSO ₄ , 50mg PSA, 50mg C ₁₈ , 50mg GCB)	LC- MS/MS DSI-GC-MS	70-109	<20	LOQ: 10-50	Cunha S.C. et al., 2007
105 φυτοφάρμακα	Ελαιόλαδο (3g)	7mL H ₂ O, 10mL ACN	4g άνυδρο MgSO ₄ , 1g NaCl	d-SPE (250mg PSA, 250mg C ₁₈ , 250mg GCB, 750mg MgSO ₄)	LC-TOFMS	70-130 για το 72% των αναλυτών	<20	LOD: 0,20-84,0 LOQ: 0.40-277,2	Gilbert-López B. et al., 2010
21 φυτοφάρμακα	Διάφοροι τύποι ελαίου (6g)	14mL απεσταγμένο H ₂ O, 20mL ACN	8g άνυδρο MgSO ₄ , 2g NaCl	SPE: προσροφητικό υλικό C18, εκλουσιτικό ACN d-SPE (500mg Z-Sep ⁺ και 350mg Z-Sep ⁺)	HPLC-DAD	50-130 για το 64% των αναλυτών	< 22,1	LOQ: 50-790	Tuzimski T. et al., 2015
98 φυτοφάρμακα	Ελαιόλαδο (5g)	10mL ACN		Freezing out στους -20°C για τουλάχιστον 12 ώρες ακολουθούμενο από d-SPE (900mg MgSO ₄ , 150mg PSA, 12,5mg GCB)	GC-(EI)- MS/MS LC-(EI)- MS/MS	69,3-125,7	<26,5	LOQ: <10	Anagnostopoulou et al., 2013

Πίνακας 4. (συνέχεια) Βιβλιογραφική ανασκόπηση πολύ-υπολειμματικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκων στο ελαιόλαδο με χρήση της μεθόδου QuEChERS.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ		ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ	ΑΝΑΛΥΣΗ	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)	ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ (RSD %)	LOD-LOQ (µg/kg)	ΑΝΑΦΟΡΑ
		ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΑΛΑΤΑ						
158 φυτοφάρμακα	Ελαιόλαδο (0,5 g)	5mL H ₂ O, 30mL ACN με 1% οξικό οξύ	6g άνυδρο MgSO ₄ , 1,5g NaOAc	1)d-SPE (150mg άνυδρο MgSO ₄ , 50mg PSA, 50mg C ₁₈) για φυτοφάρμακα που αναλύονται με GC-MS/MS 2)Χωρίς κατεργασία καθαρισμού	1)LC- MS/MS 2)GC- MS/MS	1)100-114 2)106-111	1)3,81-5,53 2)6,5-7,2		Chamkasem N. et al., 2015
255 φυτοφάρμακα	Ελαιόλαδο (0,5, 1,2,5g)	5mL H ₂ O, 10mL ACN	4g NaCl	1)d-SPE (150mg PSA, 150mg C ₁₈) 2) d-SPE (250mg PSA, 250mg C ₁₈) 3)d-SPE (250mg PSA, 250mg C ₁₈ , 15mg GCB) 4) d-SPE (250mg PSA, 250mg C ₁₈ , 50mg GCB) 5)d-SPE EMR-lipid	GC-MS/MS	70-120 με εξαίρεση τους υψηλά λιπόφιλους αναλύτες	<20	LOQ: 5-50	Moreno- Gonzalez D. et al., 2018
165 φυτοφάρμακα	Διάφοροι τύποι ελαίου (15g)	15mL ACN	6g άνυδρο MgSO ₄ , 1,5g NaCl, 1,5g sodium citrate tribasic dehydrate, 0,75g disodium hydrogen citrate sesquihydrate	Freezing out ακολουθώμενο από d-SPE EMR-lipid	GC-MS/MS	70-120	<4	LOQ: 10-20	Dias J.V. et al., 2016
32 διαφορετικές χημικές κατηγορίες φυτοφαρμά- κων	Ελαιόλαδο (5 g)	10mL ACN		Freezing out στους -20°C για 12 ώρες και καθαρισμός 6mL εκχυλίσματος με 150mg PSA, 12,5mg GCB, 900mg MgSO ₄	1)LC- MS/MS 2)GC- MS/MS	70-120	20-25	LOD: 3	Anagnostopoul os C. et al., 2013
95 φυτοφάρμακα	Σογιέλαιο (5g)	5mL n- εξανίου και διπλή εκχύλιση με 5mL ACN	0,5g MgSO ₄	Freezing out στους -20°C για 4 ώρες ακολουθώμενο από d-SPE με 50mg Florisil και 100mg MgSO ₄	GC-MS/MS	82-107	2-15	LOQ: 40-160	Nguyen T.D. et al., 2010

Πίνακας 4. (συνέχεια) Βιβλιογραφική ανασκόπηση πολύ-υπολειμματικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκων στο ελαιόλαδο με χρήση της μεθόδου QuEChERS.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΑΛΥΤΩΝ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ		ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ	ΑΝΑΛΥΣΗ	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)	ΕΠΑΝΑΛΗ- ΨΙΜΟΤΗΤΑ (RSD %)	LOD- LOQ ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ΑΝΑΦΟΡΑ
		ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΑΛΑΤΑ						
32 φυτοφάρμακα	Διάφοροι τύποι ελαιόλαδου (5g)	10mL ACN		d-SPE (40mg AC, 300mg άνυδρο MgSO_4 , 150mg PSA)	GC-MS/MS	62-110			Deme P. et al., 2014
64 φυτοφάρμακα	Ελαιόλαδο (3g)	7mL H_2O , 10mL ACN	4g MgSO_4 , 1g NaCl	1)d-SPE (750mg άνυδρο MgSO_4 , 250mg PSA, 250mg C_{18})	LC- QExtractive- Orbitrap MS/MS			LOQ: 0,1-112,7	Moreno- Gonzalez D. et al., 2017
9 οργανοφωσφο- ρικά	Φυστικέλαιο (5g)	10mL ACN		Freezing-out στους -20°C και καθαρισμός με 0,5g Na_2SO_4 , 100mg CNT, 1g alumina	GC-MS	85,9-114,3	<8,46	LOD: 0,7-1,6	Su R. et al., 2011
28 φυτοφάρμακα	Σογιέλαιο (5g)	10mL ACN		Freezing-out στους -20°C και d-SPE: Α)150mg άνυδρο MgSO_4 Β)50mg PSA, 150mg άνυδρο MgSO_4 Γ)50mg PSA, 50mg C_{18} , 150mg άνυδρο MgSO_4	GC-MS	70-120	<20	LOQ: 20-250	Li L. et al., 2007

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ

Η αέρια χρωματογραφία (gas chromatography, GC), η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (high-performance liquid chromatography, HPLC) συζευγμένη με εκλεκτικούς ανιχνευτές (π.χ. ECD, NPD) καθώς και η υγρή ή αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS ή gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS), είναι οι κυριότερες αναλυτικές τεχνικές που έχουν χρησιμοποιηθεί ή χρησιμοποιούνται αντίστοιχα για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα (Prodhan M.D.H. et al., 2017).

5.1. ΥΓΡΗ ΚΑΙ ΑΕΡΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η αέρια χρωματογραφία έχει συνδυαστεί με μια πληθώρα ανιχνευτών, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από διαφορετικό βαθμό ευαισθησίας και εκλεκτικότητας. Σε αυτούς συγκαταλέγονται ο ανιχνευτής ιονισμού φλόγας (flame ionization detector, FID) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των περισσότερων οργανικών ενώσεων, ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (electron capture detector, ECD) που εφαρμόζεται για τον προσδιορισμό οργανοαλογονομένων ενώσεων καθώς και ο ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (nitrogen-phosphorus detector, NPD) και ο φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (flame photometric detector, FPD) (Prodhan M.D.H. et al., 2017). Αντίστοιχα η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης έχει συνδυαστεί με τον ανιχνευτή φθορισμού (fluorescence detector), τον ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους (ultraviolet-visible, UV-Vis) και τον ανιχνευτή με συστοιχία διοδίων (diode array detector, DAD), για τον ίδιο σκοπό. Από αυτούς, ο ανιχνευτής UV-Vis είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος. Ωστόσο πλέον η χρήση των συγκεκριμένων ανιχνευτών σε συνδυασμό με τις αντίστοιχες χρωματογραφίες δεν επιλέγονται, λόγω περιορισμένων σημείων ταυτοποίησης (identification points). Τα σημεία ταυτοποίησης είναι σημαντικά για την αποφυγή ψευδώς θετικών ή αρνητικών αποτελεσμάτων.

Στην πλειονότητα των περιπτώσεων, για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε ένα τρόφιμο, η αέρια χρωματογραφία συνδυάζεται με φασματομετρία μαζών (MS). Η τεχνική GC-MS συμβάλλει στην ανάλυση μη πολικών, ημιπολικών, πτητικών και ημιπτητικών φυτοφαρμάκων. Ωστόσο για πολικές, μη πτητικές και θερμικά

ασταθείς φυτοπροστατευτικές ενώσεις, όπως είναι οι τριαζόλες, οι φαινιλοουρίες και τα περισσότερα προϊόντα μετασχηματισμού των φυτοφαρμάκων, η χρήση της αέρια χρωματογραφίας δεν ενδείκνυται. Σε αυτή τη περίπτωση, η LC-MS είναι η τεχνική επιλογής (Lambropoulou D.A. et al., 2007). Η LC-MS καλύπτει ένα ευρύτερο πεδίο αναλύσεων, ενώ μειώνει τα πολλαπλά βήματα καθαρισμού του εκχυλίσματος και κατ' επέκταση τον συνολικό χρόνο και το κόστος της ανάλυσης. Ακόμα παρέχει μειωμένη πιθανότητα ψευδώς θετικών ευρημάτων και χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία. Τα πλεονεκτήματά της, την καθιστούν χρήσιμη σε ποικίλες εφαρμογές και αναλύσεις (Prodhan M.D.H. et al., 2017).

5.2. ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Η φασματομετρία μαζών είναι αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια των συστατικών ενός δείγματος ιοντίζονται και στη συνέχεια διαχωρίζονται σε σχέση με το λόγο της μάζας τους προς το φορτίο τους (m/z). Ο λόγος που οι οργανολογίες φασματομετρίας μαζών αποτελούν τους κυρίαρχους ανιχνευτές στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων είναι το γεγονός ότι συμβάλλει τόσο στον ποιοτικό όσο και στον ποσοτικό προσδιορισμό, παρέχοντας λεπτομερείς δομικές πληροφορίες για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις (Ahmed F.E., 2001). Ακόμα παρέχει πληροφορίες για την παρουσία και το ποσοστό των ισοτόπων μιας ένωσης. Στα κύρια πλεονεκτήματά της συγκαταλέγονται η μεγάλη εκλεκτικότητά της, που επιτυγχάνεται με την ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών, η υψηλή ευαισθησία της που φτάνει έως τα 10^{-18} mol, καθώς και η δυνατότητα εύρεσης της δομής άγνωστων ενώσεων (Νάνου Χ., 2018).

Τα κύρια μέρη ενός φασματογράφου μάζας είναι το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, η πηγή ιόντων όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα, ο αναλυτής μαζών που διαχωρίζει τα παραγόμενα ιόντα με βάση τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z), ο ανιχνευτής που συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και μετατρέπει την αφθονία τους σε ηλεκτρικό σήμα καθώς και ο ηλεκτρονικός υπολογιστής με κατάλληλο λογισμικό για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων (De Hoffmann et al., 2007).

5.2.1. ΠΗΓΗ ΙΟΝΤΩΝ

Η παραγωγή ιόντων των προσδιοριζόμενων ενώσεων είναι το πρώτο στάδιο στη φασματομετρία μαζών και λαμβάνει χώρα στη πηγή ιοντισμού. Οι τεχνικές ιοντισμού του δείγματος διακρίνονται σε «σκληρές» και «μαλακές» τεχνικές. Οι σκληρές τεχνικές

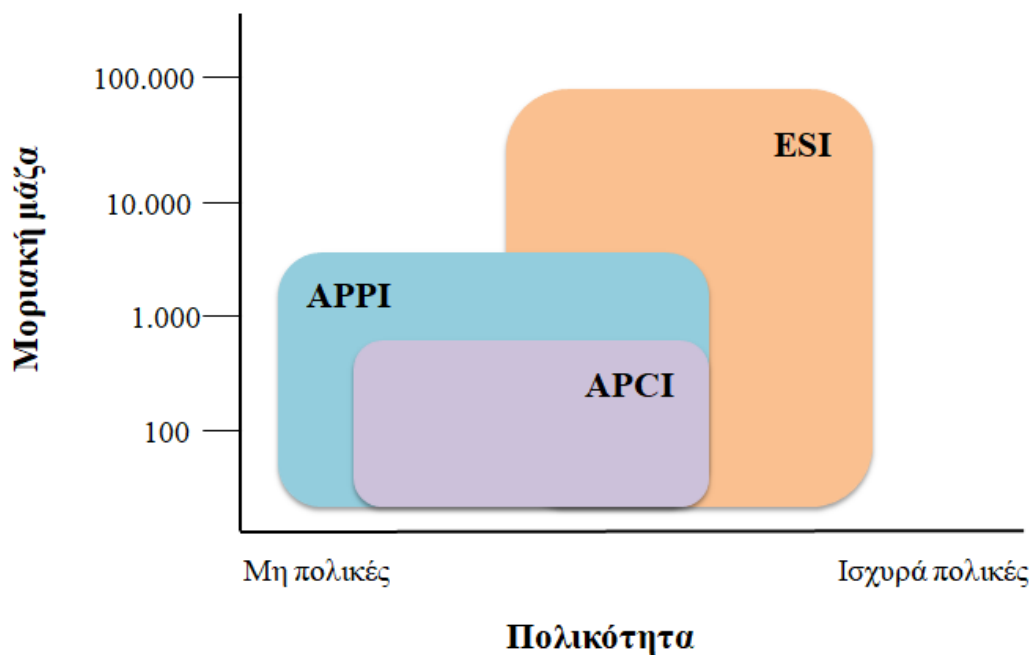
ιοντισμού χρησιμοποιούν υψηλή ενέργεια που προκαλεί τη διάσπαση της μητρικής ένωσης σε επιμέρους θυγατρικά ιόντα. Αντίστοιχα οι μαλακές πηγές ιοντισμού επιτυγχάνουν τον ιοντισμό των ενώσεων σε πιο ήπιες συνθήκες, προκαλώντας μηδαμινή έως και μικρού βαθμού θραύση των μορίων και παράγοντας μοριακά ή ψευδο-μοριακά ιόντα. Όπως γίνεται αντιληπτό η επιλογή της πηγής ιοντισμού είναι υψίστης σημασίας για την ανάλυση που θα ακολουθήσει (Νάνου Χ., 2018).

Ως πηγές ιοντισμού, κατά τον προσδιορισμό ενώσεων με αέρια χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών, χρησιμοποιούνται ο ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (electron impact, EI) και ο χημικός ιοντισμός (chemical ionization, CI), τεχνικές που εφαρμόζονται σε συνθήκες κενού. Κατά τον ιοντισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, ο αναλύτης που βρίσκεται σε αέρια φάση, βομβαρδίζεται από ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια που παράγονται από θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου (W) ή ρηνίου (Re) και επιταχύνονται μέσω μιας τάσης 70eV. Μέσω της σύγκρουσης, επιτυγχάνεται η απώλεια ενός ηλεκτρονίου από το μόριο-αναλύτη και κατ' επέκταση ο ιοντισμός αυτού. Στα πλεονεκτήματα του ιοντισμού με πρόσκρουση ηλεκτρονίων συγκαταλέγονται το επαναλήψιμο φάσμα μαζών και η επαρκής θραυσματοποίηση που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της δομής. Ωστόσο τα κύρια μειονεκτήματά του είναι η απουσία ή η χαμηλή αφθονία του μοριακού ιόντος καθώς και το γεγονός ότι το δείγμα θα πρέπει να είναι θερμικά σταθερό και επαρκώς πτητικό. Ο χημικός ιοντισμός διακρίνεται σε θετικό χημικό ιοντισμό (positive chemical ionization, PCI) και σε αρνητικό χημικό ιοντισμό (negative chemical ionization, NCI). Κατά την εφαρμογή του PCI, ο ιοντισμός των μορίων γίνεται με βομβαρδισμό αυτών με αέριο αντιδραστήριο συνήθως μεθανίου, αμμωνίας ή αζώτου όπου και προκύπτουν ψευδο-μοριακά ιόντα προσθήκης. Αντίστοιχα κατά την εφαρμογή του NCI ηλεκτρόνια χαμηλής ενέργειας συγκρούονται με μόρια του αναλύτη δημιουργώντας ισχυρά μοριακά ιόντα. Ο χημικός ιοντισμός πραγματοποιείται σε πιο ήπιες συνθήκες σε σύγκριση με τον ιοντισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων, παρέχει απλά φάσματα μαζών και πληροφορίες για το μοριακό ιόν, ωστόσο η ελλιπής θραυσματοποίηση δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίηση της ένωσης μέσω έρευνας σε βιβλιοθήκες MS.

Αντίστοιχα κατά τον προσδιορισμό ενώσεων με υγρή χρωματογραφία - φασματομετρία μαζών, ο ιοντισμός των μορίων πραγματοποιείται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Ως πηγές ιοντισμού χρησιμοποιούνται ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI), ο χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure chemical ionization, APCI) και ο

φωτοϊοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης (atmospheric pressure photo ionization APPI). Κατά τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκάσμο το δείγμα υπό την μορφή διαλύματος εξέρχεται από την στήλη και ψεκάζεται μέσω τριχοειδούς ακροφυσίου σε υψηλή δυναμικό των 3-6kV, παρουσία εκνεφωτή (ρεύμα αζώτου) δημιουργώντας αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων. Καθώς τα μόρια του διαλύτη εξατμίζονται, τα σταγονίδια συρρικνώνονται και αυξάνεται το φορτίο στην επιφάνειά τους. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα, οι ηλεκτροστατικές απώσεις των φορτίων να υπερνικούν την τάση συγκράτησης με αποτέλεσμα την έκρηξη της σταγόνας (διασπάσεις Coulomb) και την παραγωγή φορτισμένων ιόντων. Η τεχνική ιοντισμού ESI συνίσταται για μόρια μετρίως πολικά έως πολικά και υψηλού μοριακού βάρους ενώσεις, γι' αυτό και χρησιμοποιείται συχνά στην ανάλυση φυτοφαρμάκων που περιέχουν σουλφονικό οξύ ή καρβοξυλικές ομάδες στη χημική τους δομή (Lambropoulou D.A. et al., 2007, Νάνου X., 2018).

Σε αντίθεση με τον ESI, ο χημικός ιοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης δεν εφαρμόζει δυναμικό στο τριχοειδές ακροφύσιο ενώ τα ιόντα δημιουργούνται μέσω μιας ακίδας στην οποία εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό. Το δείγμα θερμαίνονται (250-400°C) και επέρχεται εξάτμιση του διαλύτη και των μορίων του αναλύτη. Ο διαλύτης ιοντίζεται με τη βοήθεια της ακίδας υψηλού δυναμικού και μεταφέρει το φορτίο στα μόρια του αναλύτη. Η συγκεκριμένη πηγή ιοντισμού παρέχει πληροφορίες για το μοριακό ιόν, ωστόσο είναι ακατάλληλη για ενώσεις με υψηλό μοριακό βάρος μεγαλύτερο των 2000 Dalton. Αντίστοιχα ο φωτοϊοντισμός σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης, είναι μια μαλακή τεχνική ιοντισμού, που αναπτύχθηκε με σκοπό να συμπεριλάβει ενώσεις που υπόκεινται ανεπαρκώς σε ιοντισμό με τις άλλες δύο τεχνικές ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης. Ο ιοντισμός γίνεται μέσω πηγής φωτός (UV, Laser, ξενίου, υδραργύρου). Στην Εικόνα 8. παρουσιάζονται το πεδίο εφαρμογής των τεχνικών ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση.



Εικόνα 8. Πεδίο εφαρμογής των τεχνικών ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση.

5.2.2. ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ

Οι αναλυτές μάζας χρησιμοποιούν στατικά ή δυναμικά, μαγνητικά ή ηλεκτρικά πεδία με στόχο τον διαχωρισμό των φορτισμένων μορίων. Ο ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να μπορεί να διαχωρίζει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές m/z και να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων. Μπορούν να ταξινομηθούν σε 3 κύριες κατηγορίες:

1. Αναλυτές σάρωσης (π.χ. τετράπολο (quadrupole, Q), αναλυτής μαγνητικού τομέα (magnetic sector))
2. Παλμικοί αναλυτές μαζών (π.χ. τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT), αναλυτής χρόνου πτήσης (time of flight (TOF), αναλυτής κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (FT-ICR))
3. Υβριδικοί αναλυτές μαζών που περιλαμβάνουν συνδυασμούς αναλυτών σε σειρά (π.χ. Orbitrap, Q-TOF)

Η αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών, συνήθως χρησιμοποιεί τέσσερις κύριους αναλυτών μάζας, για το διαχωρισμό των ιόντων, ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε χρωματογραφικής ανάλυσης. Αυτοί είναι το απλό και το τριπλό τετράπολο αντίστοιχα (quadrupole Q, triple- quadrupole TQ), η παγίδα ιόντων (IT), ο αναλυτής χρόνου πτήσης (TOF) και ο αναλυτής μαγνητικού τομέα. Οι αναλυτές μαζών

Q, TQ, IT εντάσσονται στην κατηγορία των αναλυτών χαμηλής διακριτικής ικανότητας (low resolution MS, LRMS) ενώ οι αναλυτές TOF και μαγνητικού τομέα εντάσσονται στην κατηγορία των αναλυτών υψηλής διακριτικής ικανότητας (high resolution MS, HRMS). Αντίστοιχα η υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών, χρησιμοποιεί ως αναλυτές μαζών χαμηλής διακριτικής ικανότητας, την γραμμική παγίδα ιόντων (linear ion trap, LIT), το απλό και το τριπλό τετράπολο (quadrupole Q, triple-quadrupole TQ), ενώ από τους αναλυτές μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας κάνει χρήση τον αναλυτή χρόνου πτήσης (TOF) και τον υβριδικό αναλυτή Orbitrap. Τα τυπικά χαρακτηριστικά επιλεγμένων αναλυτών μαζών παρουσιάζονται στον Πίνακα 5 (Νάνου Χ., 2018, De Hoffmann et al., 2007).

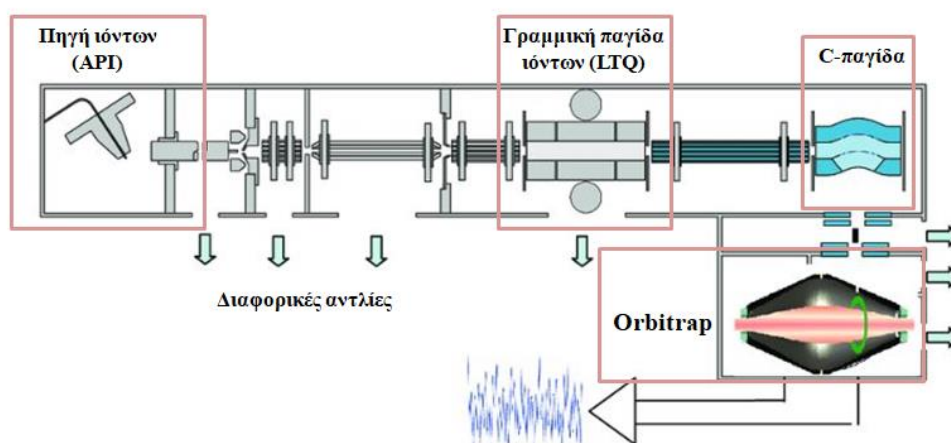
Πίνακας 5. Τυπικά χαρακτηριστικά επιλεγμένων αναλυτών μαζών.

	Αναλυτής μαζών	Διακριτική ικανότητα (FWHM)	Ακρίβεια μάζας (ppm)	Ευαισθησία (g)	Απαιτήσεις κενού (Torr)
LRMS	Τετράπολο (quadrupole, Q)	Έως 5.000	50	10^{-15}	10^{-5}
	Παγίδα ιόντων (ion trap, IT)	10.000	50	10^{-15}	10^{-3}
HRMS	Χρόνου πτήσης (time of flight, TOF)	20.000	3	10^{-12}	10^{-6}
	Μαγνητικού τομέα	50.000	~1	10^{-12}	10^{-6}
	Orbitrap	100.000	2	10^{-15}	10^{-10}

5.2.3. ΥΒΡΙΔΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΜΑΖΩΝ LIT-ORBITRAP

Ο υβριδικός αναλυτής μαζών LIT-Orbitrap (linear ion trap-Orbitrap) συνδυάζει τη γραμμική παγίδα ιόντων LTQ με την τροχιακή παγίδα μαζών Orbitrap. Αποτελείται από δύο ειδικά διαμορφωμένα ηλεκτρόδια (αξονικό ή κεντρικό και κυλινδρικό ή εξωτερικό). Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στην τροχιακή παγίδευση των ιόντων. Τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Ionization, API), συσσωρεύονται στη γραμμική παγίδα ιόντων και μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση μεθόδων σάρωσης MS και MSⁿ (n=1-10). Στη συνέχεια τα ιόντα επιταχύνονται ευθύγραμμα και συλλέγονται στην παγίδα ιόντων σχήματος C (C-trap) και με απότομη αύξηση του δυναμικού εισέρχονται και παγιδεύονται σε ηλεκτροστατικά πεδία γύρω από το αξονικό ηλεκτρόδιο του Orbitrap. Τα παγιδευμένα ιόντα κινούνται σε κυκλική τροχιά γύρω από το αξονικό ηλεκτρόδιο και ανιχνεύονται οι ταλαντώσεις τους κατά μήκος αυτού.

Τα αξονικά ταλαντευόμενα ιόντα παράγουν ένα περιοδικό σήμα στα εξωτερικά ηλεκτρόδια, το οποίο ανιχνεύεται ως αποτυπωμένο ρεύμα (image current), ενισχύεται και μετατρέπεται 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 (Νάνου Χ., 2018). Στην Εικόνα 9. παρουσιάζεται η σχηματική απεικόνιση του αναλυτή μαζών LIT-Orbitrap.



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή μαζών LIT-Orbitrap.

Ο αναλυτής τροχιακής παγίδας Orbitrap, επιτρέπει την ανίχνευση μορίων με μεγάλο μοριακό βάρος (έως 2000 Da), έχει υψηλή διακριτική ικανότητα (έως και 150.000 FWHM), παρέχει ακρίβεια μάζας 4 ή/και 5 δεκαδικών ψηφίων και σχετικό σφάλμα μάζας μικρότερο των 5mg/L, εξασφαλίζοντας υψηλή αξιοπιστία. Έχει ένα ευρύ πεδίο εφαρμογών, όπως πρωτεϊνική ανάλυση, ανάλυση λιπιδίων, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση μεταβολιτών καθώς και περιβαλλοντική ανάλυση και ανάλυση υπολειμμάτων στα τρόφιμα. Ωστόσο έχει υψηλές απαιτήσεις κενού (10^{-10} Torr).

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η βελτιστοποίηση, η επικύρωση και η εφαρμογή αναλυτικών μεθοδολογιών για τον πολύ – υπολειμματικό προσδιορισμό παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο. Η βελτιστοποίηση της μεθόδου αφορά το στάδιο καθαρισμού (clean-up step), κατά την εφαρμογή της QuEChERS για την εκχύλιση των φυτοφαρμάκων από το υπόστρωμα – ελαιόλαδο.

Συνολικά επιλέχθηκαν 39 φυτοφάρμακα που ανήκουν σε διάφορες χημικές κατηγορίες των φυτοπροστατευτικών ενώσεων, έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και εμφανίζουν διαφορετικό περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Η επιλογή τους έγινε με βάση την εγκεκριμένη χρήση τους στην ελιά, καθώς και σύμφωνα με πηγές της διεθνούς βιβλιογραφίας για παρασιτοκτόνα που εφαρμόζονται συχνά σε καλλιέργειες ελιάς.

Για το λόγο αυτό, αναπτύχθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους, δύο μεθοδολογίες οι οποίες ακολούθησαν την ίδια πορεία εκχύλισης και χρωματογραφικής ανάλυσης (original QuEChERS / UHPLC-Orbitrap-MS), ενώ η ειδοποιός διαφορά τους έγκεινται στην επιλογή των κύριων προσροφητικών υλικών, που επιλέχθηκαν για το στάδιο του καθαρισμού. Τα προσροφητικά υλικά που επιλέχθηκαν είναι το EMR-lipid και το Z-Sep⁺. Η επικύρωση των μεθόδων πραγματοποιήθηκε με βάση την ισχύουσα νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όπως αυτή ορίζεται στην Κοινοτική Απόφαση SANTE/12682/2019 και SANTE/11312/2021.

Τα αποτελέσματα της μελέτης μπορούν να ενισχύσουν την διεθνή βιβλιογραφία παρέχοντας δύο επικυρωποιημένες μεθοδολογίες για τον πολύ – υπολειμματικό προσδιορισμό παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο, καθώς και δεδομένα που αφορούν τη σύγκριση των δύο κυριότερων προσροφητικών υλικών, που χρησιμοποιούνται κατά την εφαρμογή της QuEChERS σε λιπαρά υποστρώματα όπως είναι το λάδι.

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που προσδιορίστηκαν σε αυτή τη μελέτη, επιλέχθηκαν με βάση την εγκεκριμένη χρήση τους στην ελιά, όπως αυτή έχει καθοριστεί από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, καθώς και μέσω της βιβλιογραφικής ανασκόπησης για παρασιτοκτόνα που εφαρμόζονται συχνά σε καλλιέργειες ελιάς.

Στον Πίνακα 6. παρουσιάζονται τα 39 παρασιτοκτόνα που επιλεγήκαν για το πολύ-υπολειμματικό προσδιορισμό τους στο ελαιόλαδο, κάνοντας χρήση της μεθοδολογίας QuEChERS, η οποία συνδυάστηκε με την υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας- υψηλής ακρίβειας και διακριτικής ικανότητας (UHPLC-Orbitrap-MS). Ακόμα, αναγράφονται και τα ανώτατα επιτρεπτά όρια ανίχνευσής τους (MRLs) στις επιτραπέζιες ελιές και στις ελιές που προορίζονται για ελαιοπαραγωγή.

Πίνακας 6. Ανώτατα επιτρεπτά όρια ανίχνευσής (MRLs) των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων, σε επιτραπέζιες ελιές και ελιές που προορίζονται για ελαιοπαραγωγή.

	MRLs (mg/kg)		ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ
	ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ ΕΛΙΕΣ	ΕΛΙΕΣ ΓΙΑ ΕΛΑΙΟΠΑΡΑΓΩΓΗ	
Alachlor	*0.02	*0.02	Reg. (EU) No 899/2012
Azoxystrobin	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2022/476
Benalaxyl	*0.01	*0.01	Reg.(EU) No 2021/616
Boscalid	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2021/590
Chlorfenviphos	*0.01	*0.02	Reg. (EU) No 1138/2013
Chlopyrifos	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2020/1085
Diazinon	*0.01	*0.02	Reg. (EU) No 834/2013
Difenoconazole	2	2	Reg. (EU) 2019/552
Dimethoate	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2021/155
Diuron	*0.01	*0.02	Reg. (EU) No 777/2013
Deltamethrin	1	0.6	Reg. (EU) 2018/832
Fenbuconazole	*0.01	*0.01	Reg.(EU) 2019/1559
Fenoxycarb	3	3	Reg. (EU) 2019/973
Florasulam	*0.01	*0.01	Reg. (EU) No 1317/2013
Fluquinconazole	*0.01	*0.01	Reg.(EU) 2019/1559
Iodosulfuron-methyl	*0.01	*0.02	Reg. (EU) No 289/2014
Imazalil	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2020/856
Isoproturon	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2019/1792
Kresoxsim	0.2	0.2	Reg. (EU) 2020/856
Metalaxyl	*0.05	*0.01	Reg. (EU) 2017/1164
Myclobutanil	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2020/770
Mefenpyr-diethyl	-	-	
Nicosulfuron	*0.01	*0.02	Reg. (EU) No 617/2014
Pirimicarb	*0.01	*0.02	Reg. (EU) 2016/71
Penoxsulam	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2018/1516

Πίνακας 6. (συνέχεια) Ανώτατα επιτρεπτά όρια ανίχνευσης (MRLs) των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων, σε επιτραπέζιες ελιές και ελιές που προορίζονται για ελαιοπαραγωγή.

	MRLs (mg/kg)		ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ
	ΕΠΙΤΡΑΠΕΖΙΕΣ ΕΛΙΕΣ	ΕΛΙΕΣ ΓΙΑ ΕΛΑΙΟΠΑΡΑΓΩΓΗ	
Phosmet	3	3	Reg. (EU) No 737/2014
Pyriproxyfen	*0.05	*0.05	Reg. (EU) 2020/856
Pyraclostrobin	*0.02	*0.02	Reg. (EU) 2020/1633
Quizalofop-p-ethyl	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2019/973
Spinetoram	0.07	0.06	Reg. (EU) 2022/93
Spirotetramat	1.5	1.5	Reg. (EU) 2022/93
Terbuthylazine	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2021/1795
Trifloxystrobin	0.3	0.3	Reg. (EU) 2019/1791
Thiabendazole	*0.01	*0.02	Reg. (EU) 2021/1807
Thiamethoxam	0.4	0.4	Reg. (EU) 2017/671
Tebuconazole	0.5	0.5	Reg. (EU) 2018/1514
Thiacloprid	4	4	Reg. (EU) 2019/50
Tribenuron-methyl	*0.01	*0.01	Reg. (EU) 2015/1040
λ-cyhalothrin	1	0.5	Reg. (EU) 2021/590

(*) οι τιμές με αστερίσκο υποδεικνύουν κατώτατα όρια αναλυτικού προσδιορισμού.

2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ, ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Για τον προσδιορισμό των παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο δημιουργήθηκαν τα ακόλουθα διαλύματα και απαιτήθηκε ο αναγραφόμενος εργαστηριακός εξοπλισμός.

2.1. ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ - ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν σε αυτή την εργασία, προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) και η καθαρότητά τους είναι μεγαλύτερη του 99%. Οι ενώσεις βρίσκονταν σε στερεή και σε υγρή μορφή.

Δημιουργήθηκαν πρότυπα διαλύματα αναφοράς (stock solution), συγκέντρωσης 2000 mgL⁻¹, του κάθε φυτοφαρμάκου, σε διαλύτη ακετονιτρίλιο LC-MS Grade (καθαρότητας ≥99,9%). Εξαίρεση αποτελεί το thiabendazole που παρασκευάστηκε στον ίδιο διαλύτη, αλλά σε συγκέντρωση 1000 mgL⁻¹. Ακολούθως παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα εργασίας (working solution), μειγμάτων παρασιτοκτόνων με ανάμιξη κατάλληλων όγκων των προτύπων διαλυμάτων αναφοράς και διαδοχικές αραιώσεις αυτών, σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Όλα τα διαλύματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 8 mL και αποθηκεύτηκαν σε καταψύκτη στους -20°C.

2.2. ΔΙΑΛΥΤΕΣ - ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των πυκνών διαλυμάτων, τα στάδια προ-κατεργασίας καθώς και για την τελική χρωματογραφική ανάλυση είναι:

- Ακετονιτρίλιο LC-MS Grade (καθαρότητας $\geq 99,9\%$) του οίκου Fisher Scientific ((Leicestershire, UK).
- Μεθανόλη LC-MS Grade (καθαρότητας $\geq 99,9\%$) του οίκου Fisher Scientific (Leicestershire, UK).
- Νερό LC-MS Grade του οίκου Fisher Scientific (Leicestershire, UK)

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (καθαρότητα 99,5%), του οίκου Alfa Aesar ThermoFisher (Kandel, Germany).
- Μυρμηκικό αμμώνιο, του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany).
- Χλωριούχο νάτριο του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany).
- Προσροφητικό υλικό με πρωτοταγής και δευτοροταγής ομάδες αμίνης (PSA), μέγεθος πόρων 40-63 μm , του οίκου Chromatific (Heidenrod, Germany).
- Z-Sep⁺ SupelTM Que, του οίκου Sigma- Aldrich (USA).
- Bond Elut EMR-Lipid, του οίκου Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).
- Οξικό οξύ του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

2.3. ΥΛΙΚΑ - ΣΚΕΥΗ

Τα υλικά – σκεύη που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Φιαλίδια 61 x 6,6 mm, clear glass, 8mL, του οίκου Lab Logistics Group GmbH – Meckenheim.
- Φιαλίδια 32 x 11,6 mm, clear glass, 2mL, του οίκου Target Analysis A.E Kinesis
- Σωλήνας πολυπροπυλενίου τύπου falcon 50 mL, 28mm, του οίκου MilliporeSigma (Cork, Ireland).
- Σωλήνας πολυπροπυλενίου τύπου falcon 15 mL, 17mm, του οίκου MilliporeSigma (Cork, Ireland).
- Σύριγγες όγκου 1 mL, του οίκου Softcare laboratory series (Changzhou, Jiangsu, China).

- Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου 10-1000 μL , του οίκου Eppendorf (Vienna, Austria).
- Φίλτρα 13mm, με μέγεθος πόρων 0,22 μm PTFE του οίκου Membrane Solutions (USA).
- Λοιπός εργαστηριακός εξοπλισμός (σκαφίδια ζύγισης, ποτήρι ζέσεως των 250mL, βαθμονομημένα σιφόνια των 5 mL, μεταλλικές σπάτουλες, ταινία parafilm, γυάλινες πιπέτες Pasteur).

2.4. ΟΡΓΑΝΑ - ΣΥΣΚΕΥΕΣ

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

- Σύστημα UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL που αποτελείται από υγρή χρωματογραφία υπερυψηλή απόδοση (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) συζευγμένη με ανιχνευτή μαζών LTQ-Orbitrap, αυτόματο δειγματολειτουργία (Accela AS autosampler model 2.1.1), αντία αυτόματης ροής δείγματος (Accela quaternary gradient UHPLC-pump model 1.05.0900) και φασματοόμετρο μάζας LTQ Orbitrap XL 2.5.5 SP1, της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany).
- Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 4 δεκαδικών ψηφίων (Denver Instrument Company, AA-160, Göttingen, Germany).
- Συσκευή απόσταξης νερού.
- Μαγνητικός αναδευτήρας (Velp Scientifica, Europe).
- Φυγόκεντρος Heraeus Megafuge 8, της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany).
- Στήλη χρωματογραφίας C18 (Restek), 150x 4,6mm με 5 μm μέγεθος σωματιδίων (Restek, USA).
- Στήλη χρωματογραφίας Thermo hypersil gold, 150 x 2,1mm με 5 μm μέγεθος σωματιδίων (Bremen, Germany).

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΠΟΡΕΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΗΣ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ QuEChERS

Η συγκεκριμένη μελέτη πραγματοποιήθηκε με κύριο στόχο την σύγκριση δύο προσροφητικών υλικών, ως προς την ικανότητά τους να απομακρύνουν λίπη και άλλες συν-εκχυλιζόμενες ενώσεις, κατά την εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS (original

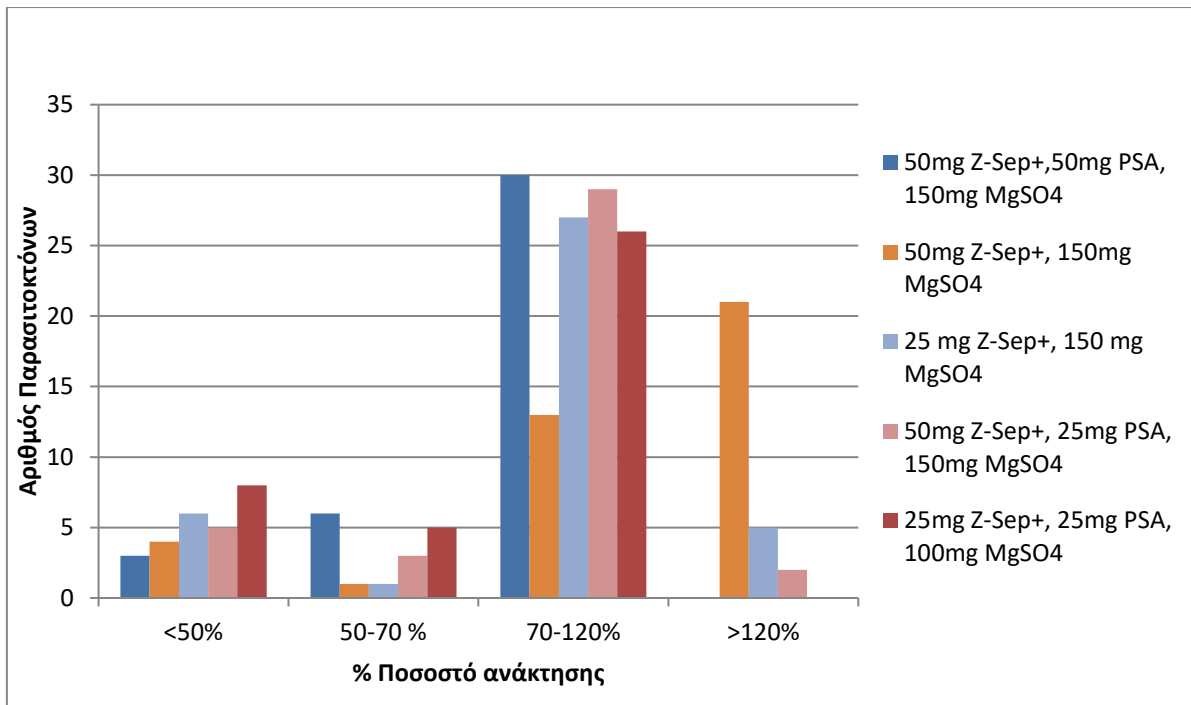
QuEChERS), για τον πολύ-υπολειμματικό προσδιορισμό παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο. Σε όλα τα πειράματα ανάπτυξης των αναλυτικών μεθόδων και επικύρωσης αυτών, ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το εξαιρετικά παρθένο ελαιόλαδο (προϊόν βιολογικής γεωργίας), της ελληνικής εταιρίας Gaea. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, το ελαιόλαδο αποθηκευόταν σε σκιερό, δροσερό μέρος μακριά από έντονο φως, προκειμένου να αποτραπεί η αλλοίωσή του.

Με στόχο της εύρεση της βέλτιστης πειραματικής πορείας για τον πολυ-υπολειμματικό προσδιορισμό των 39 παρασιτοκτόνων, συγκρίθηκαν ποικίλες τροποποιήσεις της πρωταρχικής μεθόδου (original QuEChERS). Το πρώτο στάδιο ήταν κοινό για όλες τις εκδοχές που μελετήθηκαν. Αυτό περιελάμβανε περιληπτικά τη μεταφορά 3g ελαιολάδου σε σωλήνες πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL, την προσθήκη 7 mL H₂O LC-MS Grade καθώς και τη προσθήκη 10 mL ακετονιτριλίου LC-MS Grade με 1% οξικό οξύ, την ανακίνηση σε vortex για 1 min, την επακόλουθη προσθήκη 4g άνυδρου MgSO₄ και 1g NaCl, την εκ' νέου ανακίνηση στο vortex για 1 min και την φυγοκέντρηση για 5 min στις 4000 rpm.

Κατά το δεύτερο στάδιο, τα πρωτόκολλα διαφοροποιούνταν κατά κύριο λόγο στις αναλογίες των προσροφητικών υλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα ακόλουθα πρωτόκολλα:

- 50mg Z-Sep⁺, 50mg PSA, 150mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου
- 50mg Z-Sep⁺, 150mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου
- 25 mg Z-Sep⁺, 150 mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου
- 50mg Z-Sep⁺, 25mg PSA, 150mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου
- 25mg Z-Sep⁺, 25mg PSA, 100mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου

Όλες οι παραπάνω εκδοχές, μελετήθηκαν σε επίπεδο εμβολιασμού 100 μg/Kg, ενώ η σύγκριση έγινε με κύριο γνώμονα το ποσοστό ανάκτησης των φυτοφαρμάκων. Το ποσοστό % των ανακτήσεων των παρασιτοκτόνων για κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 1.



Διάγραμμα 1. % Ποσοστό ανάκτησης των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων, κατά την εφαρμογή των διαφορετικών εκδοχών της μεθόδου QuEChERS σε ελαιόλαδο με χρήση του προσροφητικού Z-Sep⁺.

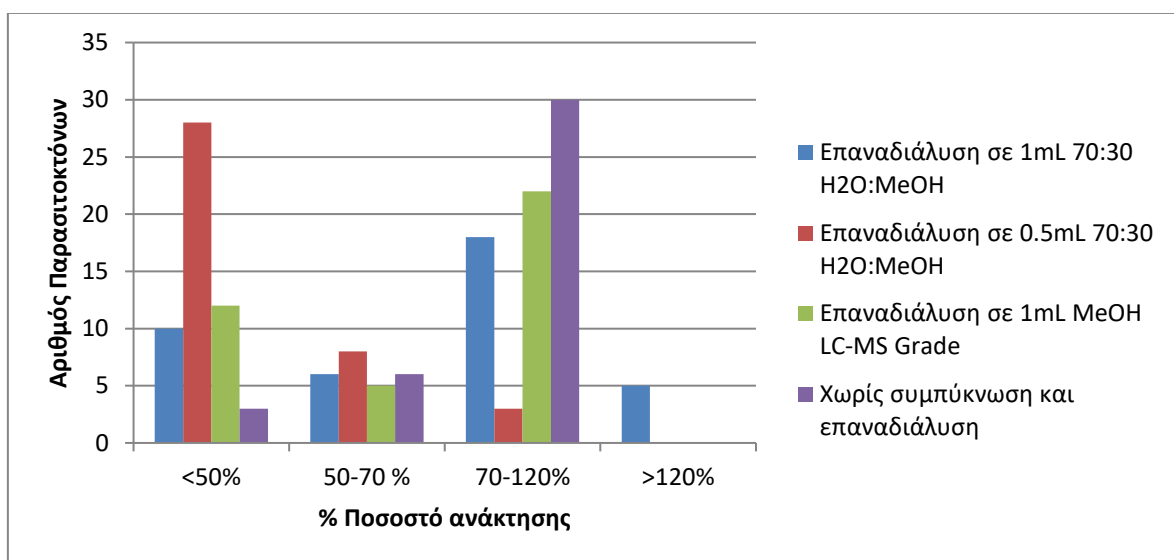
Σύμφωνα με τα πρωταρχικά πειράματα βελτιστοποίησης (Διάγραμμα 1.), έγινε αντιληπτό ότι το πρωτόκολλο: 50mg Z-Sep⁺, 50mg PSA, 150mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου, επέδειξε τα καλύτερα ποσοστά ανάκτησης των παρασιτοκτόνων που μελετήθηκαν. Πιο συγκεκριμένα οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν στο εύρος 72-107% για το 92% των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων.

Ακολούθως πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, κατά την οποία γινόταν συμπύκνωση του δείγματος, υπό την επίδραση ήπιου ρεύματος αζώτου, μέχρι ξηρού και επαναδιάλυση αυτού σε διαφορετικές αναλογίες της κινητής φάσης, με στόχο τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου που έκανε χρήση του Z-Sep⁺ ως προσροφητικό υλικό. Πιο συγκεκριμένα μελετήθηκαν τα πρωτόκολλα:

- 1 mL υπερκειμένου συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκε σε 1 mL της κινητής φάσης που αποτελούνταν από H₂O LC-MS Grade και MeOH LC-MS Grade σε αναλογία 70:30
- 2 mL υπερκειμένου συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκε σε 0,5 mL της κινητής φάσης που αποτελούνταν από H₂O LC-MS Grade και MeOH LC-MS Grade σε αναλογία 70:30
- 1 mL υπερκειμένου συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκε σε 1 mL MeOH LC-MS Grade. Από τη συγκεκριμένη σειρά πειραμάτων, έγινε ορατό ότι το

στάδιο της συμπύκνωσης μέχρι ξηρού, έχει αρνητικό αντίκτυπο στις ανακτήσεις των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων.

Και στις τρεις περιπτώσεις που αναφέρθηκαν παραπάνω, χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες αναλογίες προσροφητικών υλικών (50mg Z-Sep⁺, 50mg PSA, 150mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου). Η συγκεκριμένη επιλογή των αναλογιών κρίθηκε βέλτιστη από την προηγούμενη σειρά πειραμάτων. Τα ποσοστά % των ανακτήσεων των παρασιτοκτόνων για κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 2.



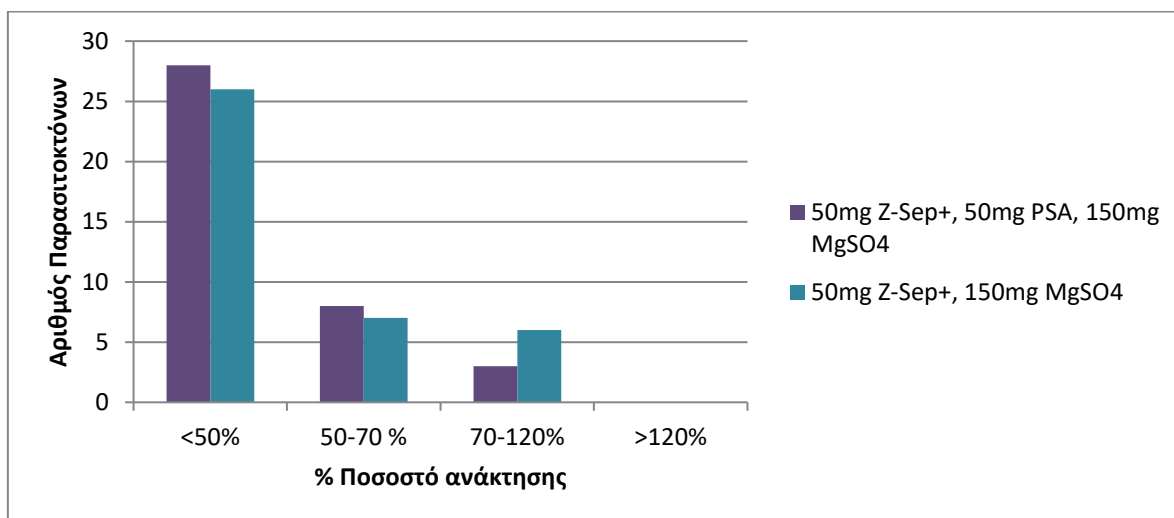
Διάγραμμα 2. Τα % ποσοστά ανάκτησης των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων, κατά την εφαρμογή της QuEChERS με επαναδιάλυση του εκχυλίσματος σε διαφορετικούς όγκους ή διαλύτες.

Το τρίτο στάδιο βελτιστοποίησης αφορούσε τον καθαρισμό (clean-up) του εκχυλίσματος, με διαφορετικές αναλογίες προσροφητικών, συμπύκνωσης αυτού μέχρι ξηρού και επαναδιάλυσης σε όγκο 0.5mL της κινητής φάσης που αποτελούνταν από H₂O LC-MS Grade και MeOH LC-MS Grade σε αναλογία 70:30. Τα δύο πρωτόκολλα που συγκρίθηκαν μεταξύ τους είναι:

- 50mg Z-Sep⁺, 50mg PSA, 150mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου
- 50mg Z-Sep⁺, 150mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου

Κατά το στάδιο αυτό επιτυγχανόταν και η προ-συγκέντρωση των αναλυτών. Τα δύο πρωτόκολλα αναπτύχθηκαν σε μία προσπάθεια επίτευξης υψηλότερων ανακτήσεων ορισμένων παρασιτοκτόνων και ταυτόχρονης ελάττωσης των συν-εκχυλιζόμενων ανεπιθύμητων ενώσεων. Και σε αυτή τη περίπτωση, οι εκδοχές μελετήθηκαν σε επίπεδο

εμβολιασμού 100 µg/Kg. Το % ποσοστό των ανακτήσεων των παρασιτοκτόνων για κάθε μια από τις παραπάνω περιπτώσεις, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 3.



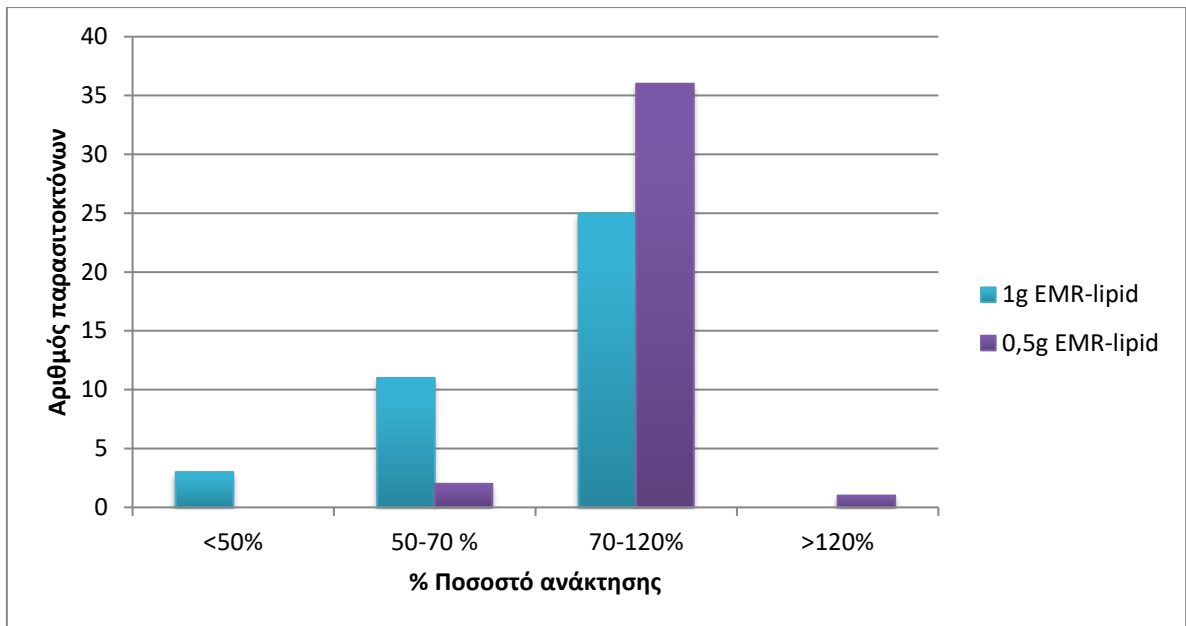
Διάγραμμα 3. % Ποσοστό ανάκτησης έπειτα από καθαρισμό του εκχυλίσματος, με διαφορετικές αναλογίες προσροφητικών, συμπύκνωσης αυτού μέχρι ξηρού και επαναδιάλυσης σε όγκο 0.5mL της κινητής φάσης.

Από τις δύο παραπάνω σειρές πειραμάτων, παρατηρήθηκε ότι, η συμπύκνωση μέχρι ξηρού, υπό την επίδραση ήπιου ρεύματος αζώτου, εμφανίζει αρνητικό αντίκτυπο στις ανακτήσεις των παρασιτοκτόνων. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων που μελετήθηκαν, τα ποσοστά των ανακτήσεων ήταν μικρότερα του 50%.

Ακολουθώς πραγματοποιήθηκε προσπάθεια εύρεσης της βέλτιστης πειραματικής πορείας για τον πολυ-υπολειμματικό προσδιορισμό των 39 παρασιτοκτόνων με τη χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικό υλικό. Το πρώτο στάδιο (στάδιο εκχύλισης) ήταν κοινό με τις υπόλοιπες εκδοχές που αναπτύχθηκαν παραπάνω, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο (clean-up) συγκρίθηκαν τα ακόλουθα πρωτόκολλα:

- 1g EMR-lipid ανά 5mL υπερκειμένου
- 0,5g EMR-lipid ανά 5mL υπερκειμένου

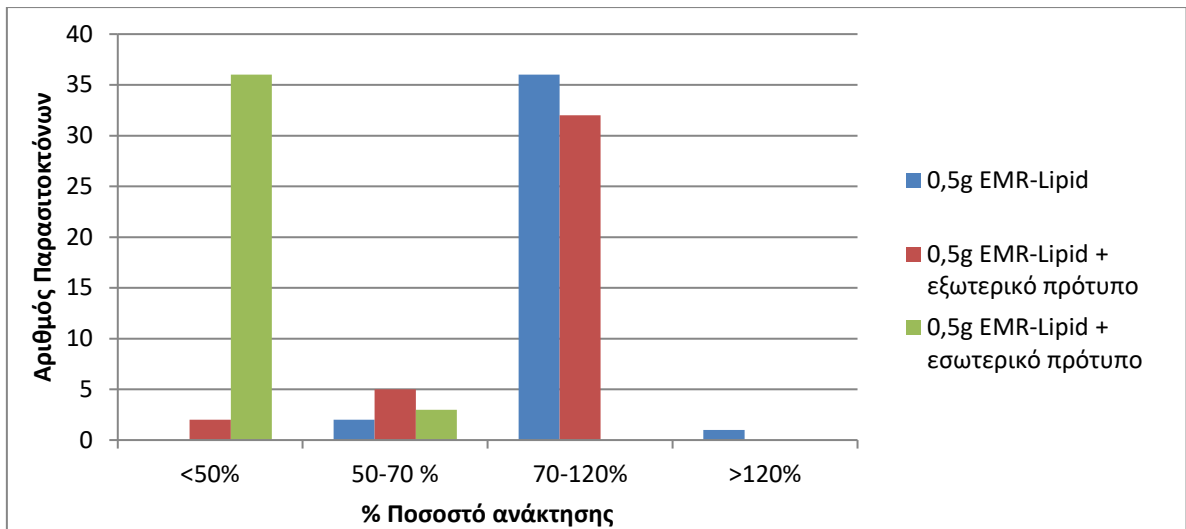
Στο Διάγραμμα 4. παρουσιάζονται τα ποσοστά % των ανακτήσεων των παρασιτοκτόνων για τις δύο παραπάνω περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του 0,5g EMR-lipid παρουσιάζει τις υψηλότερες τιμές ανάκτησης των παρασιτοκτόνων. Πιο συγκεκριμένα υπέδειξε ανακτήσεις στο εύρος 70-121% για το 95% των αναλυτών.



Διάγραμμα 4. % Ποσοστό ανάκτησης των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων, κατά την εφαρμογή των διαφορετικών εκδοχών της μεθόδου QuEChERS με χρήση του προσροφητικού υλικού EMR-lipid.

Τέλος μελετήθηκε και η περίπτωση χρήσης εσωτερικού και εξωτερικού προτύπου, με στόχο τη βελτιστοποίηση της μεθόδου που χρησιμοποιεί το EMR-lipid ως προσροφητικό υλικό. Και στις δύο περιπτώσεις, δημιουργήθηκε διάλυμα 100 μg/kg του ζιζανιοκτόνου prometryn, ενώ το επίπεδο εμβολιασμού ήταν τα 100 μg/Kg. Τα % ποσοστά των ανακτήσεων των παρασιτοκτόνων για τις ακόλουθες περιπτώσεις παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 5 :

- 0,5g EMR-Lipid ανά 5ml υπερκειμένου και prometryn ως εσωτερικό πρότυπο
- 0,5g EMR-Lipid ανά 5ml υπερκειμένου και prometryn ως εξωτερικό πρότυπο



Διάγραμμα 5. % Ποσοστό ανάκτησης με χρήση του ζιζανιοκτόνου prometryn ως εσωτερικό και εξωτερικό πρότυπο.

Η παρουσία του συγκεκριμένου ζιζανιοκτόνου ωστόσο, δεν καθίσταται αποδοτική για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Τα δύο πρωτόκολλα που τελικά αναπτύχθηκαν και συγκρίθηκαν είναι:

➤ **Πρωτόκολλο εκχύλισης QuEChERS με χρήση του Z - Sep⁺ ως προσροφητικό υλικό**

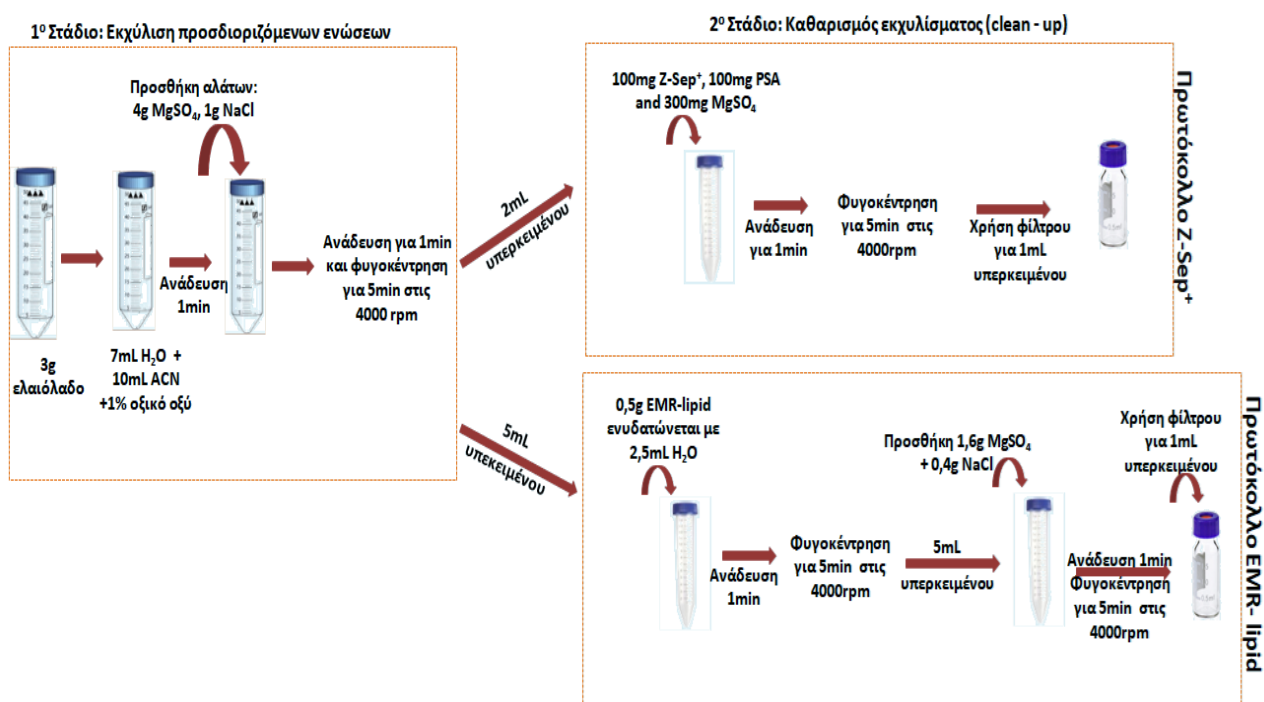
Κατά το πρώτο στάδιο της εκχύλισης, 3g ελαιολάδου μεταφέρονται σε σωλήνες πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL. Ακολουθεί η προσθήκη 7 mL H₂O LC-MS Grade καθώς και η προσθήκη 10 mL ακετονιτριλίου LC-MS Grade με 1% οξικό οξύ. Ο δοκιμαστικός σωλήνας κλείνεται ερμητικά και ανακινείται σε vortex για 1 min. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 4g άνυδρου MgSO₄ και 1g NaCl, ενώ ακολουθεί ανακίνηση στο vortex για 1 min. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 rpm.

Κατά το δεύτερο στάδιο (*clean-up step*), 2 mL υπερκειμένου μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης των 15 mL που περιέχει 100 mg Z-Sep⁺, 100 mg PSA και 300 mg άνυδρου MgSO₄. Ακολουθεί έντονη ανάδευση στο vortex για 1 min και στη συνέχεια πραγματοποιείται φυγοκέντρωση στις 4000 rpm για 5 min. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης γίνεται λήψη 1 mL υπερκειμένου, το οποίο διηθείται μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE και διάμετρο πόρων 0,22μm. Το διήθημα μεταφέρεται τελικά σε υάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτό πώμα, συμβατά με τους αυτόματους δειγματολήπτες για τη χρωματογραφική ανάλυση (Εικόνα 10).

➤ **Πρωτόκολλο εκχύλισης QuEChERS με χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικό υλικό**

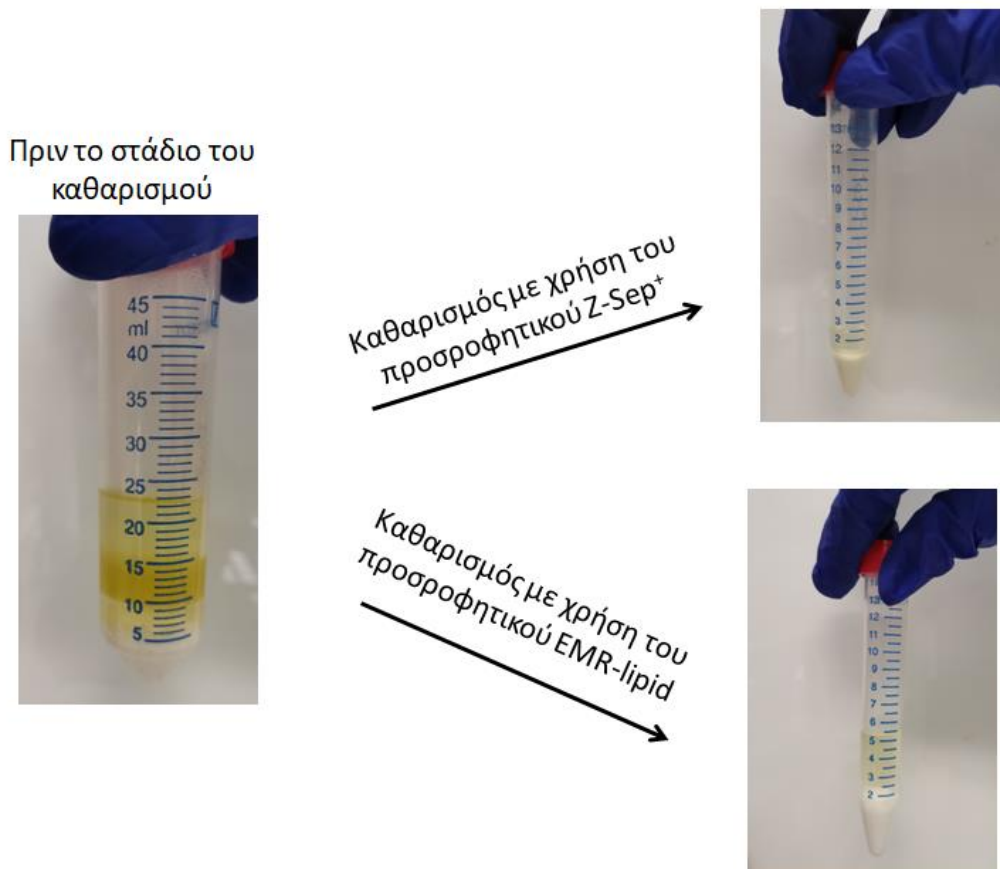
Κατά το πρώτο στάδιο της εκχύλισης, 3g ελαιόλαδου μεταφέρονται σε σωλήνες πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL. Ακολουθεί η προσθήκη 7 mL H₂O LC-MS Grade καθώς και η προσθήκη 10 mL ακετονιτριλίου LC-MS Grade με 1% οξικό οξύ. Ο δοκιμαστικός σωλήνας κλείνεται ερμητικά και ανακινείται σε vortex για 1 min. Στη συνέχεια γίνεται προσθήκη 4g άνυδρου MgSO₄ και 1g NaCl, ενώ ακολουθεί ανακίνηση στο vortex για 1 min. Το δείγμα φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 rpm.

Κατά το δεύτερο στάδιο (*clean-up step*), 0,5g EMR-lipid μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL και ενυδατώνεται με τη προσθήκη 2,5 mL H₂O LC-MS Grade. Ακολουθεί ανακίνηση του σωλήνα φυγοκέντρησης για 1 min στο vortex και στη συνέχεια προστίθενται 5 mL υπερκειμένου. Πραγματοποιείται φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 5min. Σε ένα δεύτερο σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL, που περιέχει 1,6g άνυδρου MgSO₄ και 0,4g NaCl μεταφέρονται 5 mL υπερκειμένου και το δείγμα ανακινείται για 1min στο vortex και φυγοκεντρείται εκ' νέου στις 4000 rpm για 5min. Τέλος πραγματοποιείται λήψη 1 mL υπερκειμένου, το οποίο διηθείται μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE και διάμετρο πόρων 0,22μm. Το διήθημα μεταφέρεται τελικά σε υάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτό πώμα, συμβατά με τους αυτόματους δειγματολήπτες για τη χρωματογραφική ανάλυση (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Τελικά πρωτόκολλα εκχύλισης δείγματος ελαιόλαδου με χρήση των δύο προσροφητικών υλικών (Z-Sep⁺, EMR-lipid)

Ακόμα στην Εικόνα 11. παρουσιάζονται οι διαφορές στα εκχυλίσματα (πριν και μετά τον καθαρισμό) τα οποία λαμβάνονται έπειτα από το στάδιο του καθαρισμού με τα δύο συγκρινόμενα προσροφητικά (EMR-lipid, Z-Sep⁺).



Εικόνα 11. Εκχυλίσματα πραγματικού δείγματος ελαιολάδου πριν και μετά το στάδιο του καθαρισμού των δύο συγκρινόμενων μεθοδολογιών.

4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Για την χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (UHPLC) συζευγμένης με γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) και αναλυτή τροχιακής παγίδας Orbitrap της εταιρίας Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany). Το σύστημα περιλαμβάνει αυτόματο θερμοστατούμενο δειγματολήπτη (Accela AS), αντλία αυτόματης ροής δείγματος και φασματόμετρο μάζας. Ο υβριδικός αναλυτής μαζών είναι εξοπλισμένος με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού (ion max electrospray ionization), η οποία λειτούργησε στην παρούσα μελέτη, σε συνθήκες παραγωγής θετικών ιόντων. Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η Hypersil Gold (100x 2.1mm, 1.9μm). Η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Xcalibur 2.1 της εταιρίας Thermo Electron.

Ο διαχωρισμός των αναλυτών τελέστηκε με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης διάρκειας 10 λεπτών, του οποίου η κινητή φάση αποτελούνται από:

(A): νερό με 0,1% φορμικό αμμώνιο (H₂O + 1% FA)

(B): μεθανόλη με 0,1% φορμικό αμμώνιο (MeOH + 1% FA)

Η αρχική σύσταση των διαλυτών ήταν 70% (A) και 30% (B) για διάρκεια 1min, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε βαθμωτή έκλουση σύμφωνα με το παρακάτω πρόγραμμα (Πίνακας 7.).

Πίνακας 7. Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης στο σύστημα UHPLC-MS-Orbitrap.

Χρόνος (min)	%A (H ₂ O,0,1% FA)	%B (MeOH,0,1% FA)	Ταχύτητα ροής (μL min ⁻¹)
0	70	30	250
1	70	30	250
2	30	70	250
5	0	100	250
7	0	100	250
7,10	70	30	250
10	70	30	250

Η ανίχνευση των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης και για εύρος μαζών 120-1000 Da και διακριτική ικανότητα 60.000 FWHM. Η υψηλή διακριτική ικανότητα είναι απαραίτητη για τον διαχωρισμό των σημάτων δύο διαδοχικών ενώσεων, και διασφαλίζει ότι τα ιόντα μιας μόνο ένωσης συμβάλλουν σε μια συγκεκριμένη μέτρηση. Η ταυτοποίηση των αναλυτών έγινε με βάση τα ακόλουθα κριτήρια:

1. τον καθορισμό του χρόνου κατακράτησης του κάθε αναλυτή
2. την καταγραφή των ψευδο-μοριακών ιόντων, λαμβάνοντας υπόψη την ακριβή μάζα των αναλυτών και το σφάλμα μάζας (μικρότερο των 5mg/L)
3. την ακριβή μάζα των θυγατρικών ιόντων MS/MS, σε σχέση με αυτά της πρότυπης ένωσης (ακρίβεια τεσσάρων δεσμευμένων ψηφίων) και σχετικό σφάλμα μάζας μικρότερο των 5mg/L

Σύμφωνα με το SANTE/11312/2021, ο χρόνος κατακράτησης του αναλύτη στο εκχύλισμα και στο πρότυπο διάλυμα δεν πρέπει να ξεπερνά το εύρος του ± 0.1 min. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων που μελετήθηκαν, ως ψευδο-μοριακά ιόντα $[M+H]^+$ ανιχνεύθηκαν τα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα της κάθε ένωσης, με εξαίρεση τα εντομοκτόνα deltamethrin και λ -cyhalothrin, τα οποία απαντώνται με χαρακτηριστικά ψευδομοριακά ιόντα προσθήκης αμμωνίου (NH_4^+).

Για την επιβεβαίωση των θετικών ανιχνεύσεων, έγινε καταγραφή των χαρακτηριστικών θυγατρικών ιόντων θραυσματοποίησης με ακρίβεια μάζας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία σάρωσης εξαρτώμενης από δεδομένα, και επιλέχθηκε η τεχνική θραυσματοποίησης CID (collision induced dissociation) με εφαρμογή ενέργειας θραύσης 35%. Στον Πίνακα 8. παρουσιάζονται οι τιμές των παραμέτρων που επιλέχθηκαν για τη χρωματογραφική ανάλυση.

Πίνακας 8. Τιμές των παραμέτρων που επιλέχθηκαν για τη λειτουργία του συστήματος UHPLC-MS-Orbitrap.

ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	ΤΙΜΕΣ
Πλήρης σάρωση (Full scan)	
Εύρος μαζών	120-1000Da
Δυναμικό εκνέφωσης (spray voltage)	3,7 kV
Διακριτική ικανότητα (resolution)	60.000 FWHM
Ροή αερίου (sheath gas)	40 au
Ροή βοηθητικού αερίου αποδιάλυσης (auxiliary gas flow)	15au
Θερμοκρασία τριχοειδούς σωλήνα μεταφοράς ιόντων (capillary temperature)	320 °C
Δυναμικό πρόσκρουσης (collision energy)	45 Ev
Σχετικό σφάλμα μάζας m/z (mass tolerance)	<5mg/L
Σάρωση εξαρτώμενη από δεδομένα	
Τεχνική θραυσματοποίησης	CID (collision induced dissociation)
Ενέργεια θραύσης (normalized collision energy, NCE)	35%
Διακριτική ικανότητα (resolution)	15000
Λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων	Thermo Xcalibur 2.1

Στον Πίνακα 9. παρουσιάζονται οι χρόνοι κατακράτησης (t_R), οι μοριακοί τύποι των ψευδο-μοριακών ιόντων, οι θεωρητικές και πειραματικές μάζες, το σχετικό σφάλμα μαζών (Δppm), ο αριθμός των ισοδύναμων διπλών δεσμών και δακτυλίων των ψευδο-μοριακών ιόντων (RDBE) καθώς και τα θυγατρικά ιόντα κατά το θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων, για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του Z-Sep⁺ ως προσροφητικού υλικού. Αντίστοιχα στον Πίνακα 10. παρουσιάζονται τα ίδια δεδομένα για την περίπτωση του EMR-lipid.

Πίνακας 9. Χρόνοι κατακράτησης (t_R), μοριακοί τύποι των ψευδο-μοριακών ιόντων, θεωρητικές και πειραματικές μάζες, σχετικό σφάλμα μαζών (Δppm), αριθμός των ισοδύναμων διπλών δεσμών και δακτυλίων των ψευδο-μοριακών ιόντων (RDBE) και τα θυγατρικά ιόντα κατά το θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων, για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του Z-Sep⁺ ως προσροφητικού υλικού.

	ΕΙΔΟΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΟΥ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ [M+H] ⁺	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΑΖΑ (m/z)	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΑΖΑ (m/z)	t_R (min)	Σχετικό σφάλμα μάζας (Δppm)	RDBE	ΘΥΓΑΤΡΙΚΑ ΙΟΝΤΑ 35% NCE
Alachlor	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₄ H ₂₁ ClNO ₂	270.1255	270.1247	4.72	-2.973	4.5	238.0987, 162.1273
Azoxystrobin	Μυκητοκτόνο	C ₂₂ H ₁₈ N ₃ O ₅	404.1241	404.1232	4.13	-2.220	15.5	372.0964, 345.1200
Benalaxyl	Μυκητοκτόνο	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃	326.1751	326.1743	5.07	-2.300	9.5	294.1482, 208.1328, 266.1536, 148.1117
Boscalid	Μυκητοκτόνο	C ₁₈ H ₁₃ Cl ₂ N ₂ O	343.0399	343.0391	4.29	-2.580	12.5	307.0624, 139.9893
Chlorfenviphos	Εντομοκτόνο	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₃ O ₄ P	358.9758	358.9762	5.05	-1.769	4.5	115.0462, 127.0149, 98.9835
Chlorpyrifos	Εντομοκτόνο	C ₉ H ₁₂ Cl ₃ NO ₃ PS	349.9336	349.9328	3.50	-2.086	3.5	321.9015, 293.8702, 197.9270, 275.8604
Diazinon	Εντομοκτόνο	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS	305.1083	305.1078	5.11	-1.856	3.5	169.0789, 153.1017, 277.0762, 249.0447
Difenoconazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₃ O ₃	406.0720	406.0713	5.48	-1.609	11.5	337.0386, 251.0020
Dimethoate	Εντομοκτόνο	C ₅ H ₁₃ NO ₃ PS ₂	230.0069	230.0063	2.85	-2.381	0.5	198.9641, 170.9692
Diuron	Ζιζανιοκτόνο	C ₉ H ₁₁ Cl ₁₂ N ₂ O	233.0243	233.0238	4.03	-2.210	4.5	187.1477, 159.0798
Deltamethin	Εντομοκτόνο	C ₂₂ H ₂₃ Br ₂ NO ₃	523.0051	523.0030	6.67	-0.0021	13	304.1321
Fenbuconazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₄	337.1215	337.1205	4.78	-2.880	12.5	194.0475, 125.0148
Fenoxycarb	Εντομοκτόνο	C ₁₇ H ₂₀ NO ₄	302.1387	302.1381	4.82	-2.034	8.5	116.0699, 256.0959
Florasulam	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₂ H ₉ F ₃ N ₅ O ₃ S	360.0373	360.0364	3.19	-2.364	9.5	327.1191, 129.0378, 191.9919, 296.0743
Fluquinconazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₆ H ₉ Cl ₂ FN ₅ O	376.0163	376.0152	4.59	-2.979	13.5	349.0043, 306.9825
Iodosulfuron methyl	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₄ H ₁₄ IN ₅ NaO ₆ S	529.9602	529.9587	4.00	-2.864	9.5	389.8889
Imazalil	Μυκητοκτόνο	C ₁₄ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O	297.0556	297.0550	3.82	-1.970	7.5	255.0078, 158.9757, 176.0382, 109.0754
Isoproturon	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O	207.1492	207.1489	3.98	-1.254	4.5	165.1015, 162.0906
Kresoxim-methyl	Μυκητοκτόνο	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄	314.1387	314.1382	4.91	-1.670	9.5	267.1008, 282.1110, 222.0910
Metalaxyl	Μυκητοκτόνο	C ₁₅ H ₂₂ NO ₄	280.1543	280.1539	3.96	-1.552	5.5	248.1274, 220.1326, 192.1378
Myclobutanil	Μυκητοκτόνο	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₄	289.1215	289.1208	4.49	-2.182	8.5	220.0880, 125.0151
Mefenpyr-diethyl	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₆ H ₁₉ Cl ₂ N ₂ O ₄	373.0716	373.0706	5.11	-2.651	7.5	299.0573, 327.0518
Nicosulfuron	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₅ H ₁₉ N ₆ O ₆ S	411.1081	411.1070	3.53	-2.772	9.5	366.0491, 213.0322, 182.0554, 156.0764
Pirimicarb	Εντομοκτόνο	C ₁₁ H ₁₉ N ₄ O ₂	239.1503	239.1496	3.54	-2.561	4.5	182.1282, 195.1597, 239.1496
Penoxsulam	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₆ H ₁₅ F ₅ N ₅ O ₅ S	484.0709	484.0694	3.64	-3.009	9.5	444.0567, 195.0744, 464.0629
Phosmet	Εντομοκτόνο	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ PS ₂	318.0018	318.0011	4.12	-2.146	6.5	160.0387, 133.0280
Pyriproxyfen	Εντομοκτόνο	C ₂₀ H ₂₀ NO ₃	322.1438	322.1429	5.97	-2.763	11.5	227.1061, 136.0751, 96.0438

Πίνακας 9. (συνέχεια) Χρόνοι κατακράτησης (t_R), μοριακοί τύποι των ψευδο-μοριακών ιόντων, θεωρητικές και πειραματικές μάζες, σχετικό σφάλμα μαζών (Δppm), αριθμός των ισοδύναμων διπλών δεσμών και δακτυλίων των ψευδο-μοριακών ιόντων (RDBE) και τα θυγατρικά ιόντα κατά το θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων, για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του Z-Sep⁺ ως προσροφητικού υλικού.

	ΕΙΔΟΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΟΥ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ [M+H] ⁺	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΑΖΑ (m/z)	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΑΖΑ (m/z)	t_R (min)	Σχετικό σφάλμα μάζας (Δppm)	RDBE	ΘΥΓΑΤΡΙΚΑ ΙΟΝΤΑ 35% NCE
Pyraclostrobin	Μυκητοκτόνο	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₃ O ₄	388.1059	388.1049	5.15	-2.345	11.5	194.0805, 296.0576, 164.0701
Quizalofop-p-ethyl	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₂ O ₄	373.0950	373.0945	5.68	-1.129	11.5	299.0573
Spinetoram	Εντομοκτόνο	C ₄₂ H ₇₀ NO ₁₀	748.4994	748.4992	5.58	-0.286	8.5	688.0282
Spirotetramat	Εντομοκτόνο	C ₂₁ H ₂₈ NO ₅	374.1962	374.1953	4.56	-2.297	8.5	330.2054, 302.1745, 270.1485
Terbutylazine	Ζιζανιοκτόνο	C ₉ H ₁₇ ClN ₅	230.1167	230.1162	4.34	-1.998	3.5	174.0537
Trifloxystrobin	Μυκητοκτόνο	C ₂₀ H ₂₀ F ₃ N ₂ O ₄	409.1370	409.1362	5.39	-1.951	10.5	186.0521
Thiabendazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₀ H ₈ N ₃ S	202.0433	202.0427	2.69	-3.289	8.5	202.0425, 175.0318
Thiamethoxam	Εντομοκτόνο	C ₈ H ₁₁ ClN ₅ O ₃ S	292.0266	292.0258	1.91	-2.548	5.5	211.0641, 246.0329
Tebuconazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₆ H ₂₃ ClN ₃ O	308.1524	308.1517	5.01	-2.228	6.5	308.0031
Thiacloprid	Εντομοκτόνο	C ₁₀ H ₁₀ ClN ₄ S	253.0309	253.0305	3.24	-1.863	7.5	126.0100, 186.0134, 226.0194
Tribenuron-methyl	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₅ H ₁₈ N ₅ O ₆ S	396.0972	396.0962	3.87	-2.652	9.5	155.0922, 364.0698, 199.0053
λ-cyhalothrin	Εντομοκτόνο	C ₂₃ H ₂₃ ClF ₃ N ₂ O ₃	467.1344	467.1334	6.20	-2.101	11.5	226.0854, 450.1074

Πίνακας 10. Χρόνοι κατακράτησης (t_R), μοριακοί τύποι των ψευδο-μοριακών ιόντων, θεωρητικές και πειραματικές μάζες, σχετικό σφάλμα μαζών (Δppm), αριθμός των ισοδύναμων διπλών δεσμών και δακτυλίων των ψευδο-μοριακών ιόντων (RDBE) και τα θυγατρικά ιόντα κατά το θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων, για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικού υλικού.

	ΕΙΔΟΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΟΥ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ [M+H] ⁺	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΑΖΑ (m/z)	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΑΖΑ (m/z)	t_R (min)	Σχετικό σφάλμα μάζας (Δppm)	RDBE	ΘΥΓΑΤΡΙΚΑ ΙΟΝΤΑ 35% NCE
Alachlor	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₄ H ₂₁ ClNO ₂	270.1255	270.1253	4.67	-0.974	4.5	238.0987
Azoxystrobin	Μυκητοκτόνο	C ₂₂ H ₁₈ N ₃ O ₅	404.1241	404.1234	4.12	-1.304	15.5	372.0966
Benalaxyl	Μυκητοκτόνο	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃	326.1751	326.1747	5.02	-1.104	9.5	294.1477, 266.1531, 208.1325, 148.1115
Boscalid	Μυκητοκτόνο	C ₁₈ H ₁₃ Cl ₂ N ₂ O	343.0399	343.03922	4.27	-2.113	12.5	307.0623, 139.9891
Chlorfenviphos	Εντομοκτόνο	C ₁₂ H ₁₅ Cl ₃ O ₄ P	358.9758	358.9764	5.02	-1.017	4.5	155.0462, 127.0148, 98.9834
Chlorpyrifos	Εντομοκτόνο	C ₉ H ₁₂ Cl ₃ NO ₃ PS	349.9336	349.9333	5.98	-0.772	3.5	321.9011, 293.8698, 197.9268, 275.8587
Diazinon	Εντομοκτόνο	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS	305.1083	305.1081	5.07	-0.578	3.5	169.0786, 153.1015, 277.0757, 249.0443
Difenoconazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₃ O ₃	406.0720	406.0717	5.46	-0.772	11.5	251.0015, 337.0380
Dimethoate	Εντομοκτόνο	C ₅ H ₁₃ NO ₃ PS ₂	230.0069	230.0065	2.80	-1.642	0.5	198.9640, 170.9691
Diuron	Ζιζανιοκτόνο	C ₉ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O	233.0243	233.0245	4.00	-1.566	4.5	187.1475, 159.0798
Deltamethin	Εντομοκτόνο	C ₂₂ H ₂₃ Br ₂ NO ₃	523.0051	523.0025	6.32	-4.971	13	304.7527
Fenbuconazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₄	337.1215	337.1210	4.73	-1.189	12.5	125.0145, 194.0472,
Fenoxycarb	Εντομοκτόνο	C ₁₇ H ₂₀ NO ₄	302.1387	302.1384	4.79	-0.843	8.5	256.0960, 116.0700
Florasulam	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₂ H ₉ F ₃ N ₅ O ₃ S	360.0373	359.1960	3.17	-1.225	9.5	327.1193, 191.9919, 129.0379, 296.0744
Fluquinconazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₆ H ₉ Cl ₂ FN ₅ O	376.0163	376.0147	4.70	-4.122	13.5	349.003, 306.9820
Iodosulfuron methyl	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₄ H ₁₄ IN ₅ NaO ₆ S	529.9602	529.9594	3.98	-1.355	9.5	388.8889
Imazalil	Μυκητοκτόνο	C ₁₄ H ₁₅ Cl ₂ N ₂ O	297.0556	297.0555	3.79	-0.253	7.5	255.0078, 158.9757, 176.0381, 109.0753
Isoproturon	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₂ H ₁₉ N ₂ O	207.1492	207.1491	3.95	-0.192	4.5	165.1015, 162.0905, 134.0957
Kresoxim-methyl	Μυκητοκτόνο	C ₁₈ H ₂₀ NO ₄	314.1387	314.1382	4.88	-1.606	9.5	267.1008, 282.1111, 222.0915
Metalaxyl	Μυκητοκτόνο	C ₁₅ H ₂₂ NO ₄	280.1543	280.1540	3.93	-1.016	5.5	248.1277, 220.1329, 192.1380
Myclobutanil	Μυκητοκτόνο	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₄	289.1215	289.1212	4.46	-0.695	8.5	220.0879, 125.0148
Mefenpyr-diethyl	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₆ H ₁₉ Cl ₂ N ₂ O ₄	373.0716	373.0712	5.05	-1.043	7.5	299.0572, 327.0286
Nicosulfuron	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₅ H ₁₉ N ₆ O ₆ S	411.1081	411.1078	3.50	-0.850	9.5	182.0555, 213.0322, 366.0491, 156.0761
Pirimicarb	Εντομοκτόνο	C ₁₁ H ₁₉ N ₄ O ₂	239.1503	239.1500	3.50	-1.013	4.5	182.1282, 195.1596, 239.1494
Penoxsulam	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₆ H ₁₅ F ₅ N ₅ O ₅ S	484.0709	484.0699	3.61	-1.894	9.5	444.0593, 195.0745, 464.0627
Phosmet	Εντομοκτόνο	C ₁₁ H ₁₃ NO ₄ PS ₂	318.0018	318.0015	4.09	-0.951	6.5	160.0386
Pyriproxyfen	Εντομοκτόνο	C ₂₀ H ₂₀ NO ₃	322.1438	322.1435	5.91	-0.900	11.5	227.1060, 136.0751, 96.0436, 185.0589

Πίνακας 10. (συνέχεια) Χρόνοι κατακράτησης (t_R), μοριακοί τύποι των ψευδο-μοριακών ιόντων, θεωρητικές και πειραματικές μάζες, σχετικό σφάλμα μαζών (Δppm), αριθμός των ισοδύναμων διπλών δεσμών και δακτυλίων των ψευδο-μοριακών ιόντων (RDBE) και τα θυγατρικά ιόντα κατά το θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων, για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικού υλικού.

	ΕΙΔΟΣ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΟΥ	ΜΟΡΙΑΚΟΣ ΤΥΠΟΣ [M+H] ⁺	ΘΕΩΡΗΤΙΚΗ ΜΑΖΑ (m/z)	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΜΑΖΑ (m/z)	t_R (min)	Σχετικό σφάλμα μάζας (Δppm)	RDBE	ΘΥΓΑΤΡΙΚΑ ΙΟΝΤΑ 35% NCE
Pyraclostrobin	Μυκητοκτόνο	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₃ O ₄	388.1059	388.1052	5.11	-1.572	11.5	194.0840, 296.0575, 164.0700
Quizalofop-p-ethyl	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₂ O ₄	373.0950	373.0946	5.63	-0.968	11.5	299.0573
Spinetoram	Εντομοκτόνο	C ₄₂ H ₇₀ NO ₁₀	748.4994	748.4995	5.53	0.142	8.5	688.0510
Spirotetramat	Εντομοκτόνο	C ₂₁ H ₂₈ NO ₅	374.1962	374.1959	4.53	-0.827	8.5	330.2047, 302.1737, 270.1479
Terbutylazine	Ζιζανιοκτόνο	C ₉ H ₁₇ ClN ₅	230.1167	230.1165	4.31	-0.912	3.5	174.0535, 232.0549
Trifloxystrobin	Μυκητοκτόνο	C ₂₀ H ₂₀ F ₃ N ₂ O ₄	409.1370	409.1364	5.34	-1.438	10.5	186.0520, 116.0489
Thiabendazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₀ H ₈ N ₃ S	202.0433	202.0431	2.60	-1.260	8.5	175.0317, 202.0425
Thiamethoxam	Εντομοκτόνο	C ₈ H ₁₁ ClN ₅ O ₃ S	292.0266	292.0260	1.82	-2.000	5.5	211.0640, 246.0328
Tebuconazole	Μυκητοκτόνο	C ₁₆ H ₂₃ ClN ₃ O	308.1524	308.1522	4.97	-0.735	6.5	308.0026
Thiacloprid	Εντομοκτόνο	C ₁₀ H ₁₀ ClN ₄ S	253.0309	253.0307	3.20	-0.677	7.5	126.0100, 186.0135, 226.0195
Tribenuron-methyl	Ζιζανιοκτόνο	C ₁₅ H ₁₈ N ₅ O ₆ S	396.0972	396.0965	3.85	-1.920	9.5	155.0921, 364.0696, 199.0052
λ-cyhalothrin	Εντομοκτόνο	C ₂₃ H ₂₃ ClF ₃ N ₂ O ₃	467.1344	467.1339	6.15	-1.052	11.5	226.0849, 450.1069

5. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ

Η επικύρωση των δύο μεθοδολογιών που συγκρίθηκαν στηρίχθηκε στα προβλεπόμενα, κατά την Ευρωπαϊκή Ένωση, κριτήρια, ενώ ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των παρασιτοκτόνων, βασίστηκε στις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου που ορίζει η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στην Κοινοτική Απόφαση SANTE/12682/2019 και SANTE/11312/2021.

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των παρασιτοκτόνων λήφθηκαν υπόψη τα εξής κριτήρια:

- Ο χρόνος κατακράτησης (RT) του κάθε παρασιτοκτόνου στο δείγμα που μελετάται, να συμφωνεί με εκείνον του προτύπου βαθμονόμησης
- Η ακρίβεια μάζας των ψευδο-μοριακών ιόντων, σε σχέση με την πρότυπη ουσία (ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων), με σχετικό σφάλμα μάζας μικρότερο των 5 mg/L
- Η ακρίβεια μάζας των θυγατρικών ιόντων MS² σε σχέση με τα αντίστοιχα της πρότυπης ουσίας (ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων), με σχετικό σφάλμα μάζας μικρότερο των 5 mg/L

Αντίστοιχα ο ποσοτικός προσδιορισμός των παρασιτοκτόνων πραγματοποιήθηκε μέσω της δημιουργίας καμπυλών βαθμονόμησης. Από την γραμμική εξίσωση βαθμονόμησης ($Y = a + bx$) που προκύπτει με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, όπου y το αναλυτικό σήμα, x η συγκέντρωση της ένωσης, a η τομή της ευθείας με τον άξονα των yy' και b η κλίση της ευθείας, προσδιορίστηκε η συγκέντρωση του κάθε παρασιτοκτόνου.

Όσον αφορά την επικύρωση των δύο συγκρινόμενων μεθόδων, αυτή πραγματοποιήθηκε προσδιορίζοντας τους εξής παράγοντες ποιότητας: τη γραμμικότητα, τη % μέση ανάκτηση του κάθε φυτοφαρμάκου και τις % σχετικές τυπικές τους αποκλίσεις, την επαναληψιμότητα, την αναπαραγωγιμότητα, την ακρίβεια της μεθόδου, την επίδραση της μήτρας (ME), τα όρια ανίχνευσης (LODs) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQs) καθώς και η διευρυμένη αβεβαιότητα (%U). Τόσο η % μέση ανάκτηση του κάθε παρασιτοκτόνου, όσο και η διευρυμένη αβεβαιότητα υπολογίστηκαν και για τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (30 μg/kg, 100 μg/kg και 300 μg/kg). Η επικύρωση της μεθόδου είναι σημαντική και αναφέρεται στην επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων, ότι η μέθοδος ικανοποιεί προδιαγεγραμμένες απαιτήσεις.

5.1. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ

Για τον προσδιορισμό της γραμμικότητας παρασκευάστηκε μια πρότυπη καμπύλη 7 σημείων, σε εμβολιασμένα δείγματα με ένα εύρος συγκεντρώσεων από 5 μg/kg έως 500 μg/kg. Πιο συγκεκριμένα τα 7 σημεία της πρότυπης καμπύλης ήταν τα 5, 10, 25, 100, 250 και 500 μg/kg. Το χαμηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης 5 μg/kg ανταποκρίνεται στην απαίτηση δημιουργίας μεθόδου, με όριο ποσοτικοποίησης μικρότερο από το θεσπιζόμενο MRL του παρασιτοκτόνου.

Ο συντελεστής συσχέτισης (correlation coefficient, r^2), ο οποίος παρέχει πληροφορίες για την γραμμικότητα της μεθόδου, προσδιορίζεται από την εξίσωση 1, ενώ υπολογίστηκε για όλα τα παρασιτοκτόνα, και για τις δύο συγκρινόμενες μεθοδολογίες.

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

Τιμές r^2 κοντά στο 1 υποδηλώνουν πολύ καλή γραμμικότητα της μεθόδου.

5.2. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΚΤΗΣΕΩΝ

Η εκτίμηση της ακρίβειας (ορθότητα και συστηματικό σφάλμα) της μεθόδου βασίστηκε στον υπολογισμό των ανακτήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα ελαιολάδου. Τα τρία επίπεδα εμβολιασμού για τα οποία προσδιορίστηκαν οι % μέσες ανακτήσεις του κάθε παρασιτοκτόνου, είναι τα 30 μg/kg, 100 μg/kg και 300 μg/kg. Η ορθότητα ορίζεται ως η εγγύτητα μεταξύ της τιμής του μέσου όρου των πειραματικών μετρήσεων και της αποδεκτής τιμής αναφοράς (SANTE 2019). Για να είναι μία μέθοδος ορθή θα πρέπει οι ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων να υπάγονται στο εύρος 70-120%, ενώ κατά γενικό κανόνα να μην είναι μικρότερες του 30% και μεγαλύτερες του 140% για τα επίπεδα εμβολιασμού που μελετήθηκαν.

Για κάθε επίπεδο εμβολιασμού πραγματοποιήθηκαν επίσης δύο σειρές πειραμάτων, με στόχο να προσδιοριστεί η πιστότητα της μεθόδου υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (repeatability, RSD_r) και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (reproducibility RSD_R). Η πρώτη σειρά πειραμάτων περιελάμβανε τον εμβολιασμό 5 δειγμάτων, για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, τα οποία κατεργάστηκαν και αναλύθηκαν την ίδια μέρα (intra-day). Μέσω αυτής της διαδικασίας, υπολογίστηκε η επαναληψιμότητα της κάθε μεθόδου.

Αντίστοιχα, η δεύτερη σειρά πειραμάτων περιελάμβανε τον εμβολιασμό 5 δειγμάτων, για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, και την κατεργασία αυτών σε 5 διαδοχικές μέρες (inter-day), στοχεύοντας στο υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας. Επιπρόσθετα αναλύθηκαν και τυφλά δείγματα, μη εμβολιασμένων δειγμάτων ελαιολάδου, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι το υπόστρωμα είναι απαλλαγμένο από τα προσδιοριζόμενα παρασιτοκτόνα.

Η σχετική τυπική απόκλιση, που χρησιμοποιείται τόσο για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας όσο και για τον υπολογισμό της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας πρέπει να είναι σε κάθε περίπτωση μικρότερη του 20% ενώ υπολογίζεται με βάση την εξίσωση 2:

$$\%RSD = [SDV / M.O._{(Rec)}] * 100 \quad (2)$$

Όπου SDV είναι η απόλυτη τιμή της τυπικής απόκλισης του δείγματος και M.O._(Rec) είναι ο μέσος όρος των ανακτήσεων των 5 διαδοχικών επαναλήψεων.

5.3. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος (ME, matrix effect), ως αναλυτικό χαρακτηριστικό είναι σημαντική για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, του ποσοτικού προσδιορισμού. Μία ή περισσότερες συνεκχυλιζόμενες ενώσεις μπορούν να μειώσουν ή να ενισχύσουν της απόκριση της προσδιοριζόμενης ένωσης. Για τιμές επίδρασης της μήτρας στο εύρος -20% με 20%, θεωρείται ότι το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος. Για τιμές μεταξύ -50% και -20% ή 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια ενώ για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50%, η επίδραση θεωρείται ισχυρή (Nannou C.I. et al., 2018).

Για την αξιολόγηση της επίδρασης της μήτρας (%ME), παρασκευάστηκαν δύο πρότυπες καμπύλες, η μία σε διαλύτη-ακετονιτρίλιο και η δεύτερη στο εκχύλισμα του ελαιολάδου, στο ίδιο εύρος συγκεντρώσεων (5-500 μg/kg). Δημιουργήθηκε επίσης και ένα μη εμβολιασμένο εκχύλισμα σε διαλύτη ακετονιτρίλιο. Η %ME προσδιορίστηκε με βάση την εξίσωση 3:

$$\%ME = \left[\left(\frac{\text{κλίση ευθείας στο εκχύλισμα}}{\text{κλίση ευθείας στο διαλύτη}} \right) - 1 \right] * 100 \quad (3)$$

5.4. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλυτή διακρίνοντας το σήμα του αναλυτή από το σήμα του υποβάθρου/θορύβου εκφράζεται μέσω του υπολογισμού των ορίων ανίχνευσης (limit of detection, LODs) και ορίων ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQs) αντίστοιχα. Ως όρια ανίχνευσης και όρια ποσοτικοποίησης θεωρούνται οι ελάχιστες συγκεντρώσεις των αναλυτών στα δείγματα, που έπειτα από την εκχύλιση QuEChERS, παρέχουν αναλογία σήματος προς θόρυβο $S/N \geq 3$ και ≥ 10 αντίστοιχα. Σύμφωνα με τον κανονισμό SANTE/12682/2019, τα όρια ποσοτικοποίησης πρέπει να είναι μικρότερα ή ίσα με τα ανώτερα επιτρεπτά όρια των υπολειμμάτων των παρασιτοκτόνων (MRL) στην ελιά.

Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) για κάθε παρασιτοκτόνο μπορούν να υπολογιστούν με βάση την απόλυτη τιμή της τυπικής απόκλισης (SDV) και για το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης 30μg/kg. Για τον προσδιορισμό των LODs χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 4 ενώ για τον προσδιορισμό των LOQs χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση 5.

$$\text{LOD} = 3,3 \times \text{SDV} \quad (4)$$

$$\text{LOQ} = 10 \times \text{SDV} \quad (5)$$

5.5. ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ

Η αβεβαιότητα θεωρείται μια παράμετρος που σχετίζεται με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών, γύρω από την πραγματική τιμή μέτρησης. Η εκτιμώμενη αβεβαιότητα, μπορεί να εκφραστεί ως τυπική αβεβαιότητα (standard uncertainty), συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (combined standard uncertainty) και διευρυμένη αβεβαιότητα (expanded uncertainty). Η διευρυμένη αβεβαιότητα εκφράζει το διάστημα μέσα στο οποίο εκτιμάται ότι βρίσκεται η μετρούμενη τιμή, για δεδομένο επίπεδο εμπιστοσύνης (EUROCHEM 2011).

Η τιμή της διευρυμένης αβεβαιότητας προκύπτει από τον πολλαπλασιασμό της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας με ένα παράγοντα κάλυψης (coverage factor, k). Η επιλογή του παράγοντα κάλυψης, βασίζεται στο επιθυμητό επίπεδο εμπιστοσύνης. Για τις

χημικές αναλύσεις, ως επίπεδο εμπιστοσύνης επιλέγεται συνήθως το 95%, συνεπώς ο παράγοντας κάλυψης υπολογίζεται στο 1,96 (συνήθως $k=2$). Το βασικό μοντέλο της μετρούμενης αβεβαιότητας αντιπροσωπεύεται από την διευρυμένη αβεβαιότητα, η οποία υπολογίζεται με βάση τη σχετική τυπική αβεβαιότητα U' και τις εξισώσεις 6, 7 (SANTE 2019).

$$U = k \times U' \quad (6)$$

$$U' = \sqrt{U'(\text{bias})^2 + U'(\text{precision})^2} \quad (7)$$

Όπου U είναι η διευρυμένη αβεβαιότητα, k είναι ο συντελεστής κάλυψης, U' είναι η συνδυασμένη αβεβαιότητα μέτρησης, $U'_{(\text{bias})}$ είναι η αβεβαιότητα του συστηματικού σφάλματος και προκύπτει από πιστοποιημένα υλικά αναφοράς (certified reference materials, CRM) ή εσωτερικά εμβολιασμένα υλικά και το σφάλμα στις πειραματικές ανακτήσεις και διεργαστηριακές μετρήσεις και $U'_{(\text{precision})}$ είναι η αβεβαιότητα που δίνεται από την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα. Για να θεωρείται η μέθοδος αποτελεσματική ως προς την αβεβαιότητα, οι τιμές της διευρυμένης αβεβαιότητας δεν πρέπει να υπερβαίνουν το 50% (SANTE 2019).

Η αβεβαιότητα της μέτρησης μπορεί ακόμα να εκτιμηθεί κάνοντας χρήση της εξίσωσης Horwitz. Με βάση την εξίσωση Horwitz υπολογίζεται η σχετική τυπική απόκλιση ως προς την συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα μέτρησης, και ακολούθως πολλαπλασιάζεται με έναν συντελεστή κάλυψης, $k=2$, για τη λήψη της διευρυμένης σχετικής αβεβαιότητας. Η εξίσωση Horwitz εκφράζεται ως:

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

όπου η συγκέντρωση C εκφράζεται ως κλάσμα μάζας E^{-9} (0,000000001), όταν οι μονάδες συγκέντρωσης αντιστοιχούν σε $\mu\text{g}/\text{Kg}$. Η βασική παρατήρηση ήταν ότι η ακρίβεια, εκφρασμένη ως RSD_R , διπλασιάζεται για κάθε μείωση δύο τάξεων μεγέθους συγκέντρωσης C .

Μια ακόμα παράμετρος αποδοχής της μεθόδου χημικής ανάλυσης σε σχέση με την ακρίβεια μέτρησης είναι ο λόγος Horwitz (HorRat). Ως λόγος Horwitz ορίζεται η αναλογία της παρατηρούμενης σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD_R) που υπολογίζεται από τα δεδομένα της ανάλυσης, προς την αντίστοιχη προβλεπόμενη σχετική τυπική απόκλιση που υπολογίζεται από την εξίσωση Horwitz $PRSD_R$.

$$\text{HorRat} = \text{RSD}_R / \text{PRSD}_R \quad (9)$$

Η προβλεπόμενη σχετική τυπική απόκλιση PRSD_R υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\text{PRSD}_R = 2 \times C^{-0.15} = 2 * C ^ (-0.15) \quad (10)$$

Όταν ο λόγος Horwitz (HorRat) ισούται με 1 υπάρχει ακριβής αντιστοιχία, όταν η αναλογία είναι μικρότερη του 1, η ακρίβεια είναι καλύτερη από την αναμενόμενη και όταν είναι μεγαλύτερη του 1, η ακρίβεια είναι φτωχότερη από την προβλεπόμενη (Horwitz W., et al., 2006).

6. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.1. ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ

Στον Πίνακα 11. παρουσιάζεται η επικύρωση της γραμμικότητας για την περίπτωση του Z-Sep⁺ και του EMR-lipid αντίστοιχα. Και στις δυο περιπτώσεις, οι τιμές του r^2 υπερέβαιναν το 0,99, με ακρίβεια 4^ο δεκαδικού ψηφίου, γεγονός που υποδεικνύει ότι η γραμμικότητα είναι ικανοποιητική και για τα δύο πρωτόκολλα που μελετώνται.

6.2. ΑΝΑΚΤΗΣΕΙΣ

Στον Πίνακα 12. παρουσιάζονται οι % μέσες ανακτήσεις και % σχετικές τυπικές αποκλίσεις για κάθε παρασιτοκτόνο και για τις δύο σειρές πειραμάτων (intra-, inter-day) για την περίπτωση του EMR-lipid ενώ στον Πίνακα 13. παρουσιάζονται τα αντίστοιχα δεδομένα για το πρωτόκολλο εκχύλισης που κάνει χρήση του Z-Sep⁺ ως προσροφητικό υλικό.

Στην περίπτωση που το EMR-lipid χρησιμοποιήθηκε ως προσροφητικό υλικό, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν στο εύρος 70-113% για το 95% των αναλυτών με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) μικρότερες του 16%. Τα δύο εντομοκτόνα που παρουσίασαν ανακτήσεις μικρότερες του 70%, στο επίπεδο 30μg/kg, είναι το pyriproxyfen (με ανάκτηση 49,9%) και το λ-cyhalothrin (με ανάκτηση 68,4%). Όσον αφορά τη μεθοδολογία με χρήση του Z-Sep⁺, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν στο εύρος 72-107% για το 92% των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) χαμηλότερες του 20% για το 92% των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόκων. Πιο συγκεκριμένα πέντε παρασιτοκτόνα εμφάνισαν ανακτήσεις μικρότερες του 70%. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα εντομοκτόνα pyriproxyfen και spinetoram, με ανακτήσεις 40,5% και 19,3%, στα 30μg/kg, αντίστοιχα, τα ζιζανιοκτόνα quizalofop-p-ethyl (με ανάκτηση 63,5%) και iodosulfuron-methyl (με ανάκτηση 23,5%) καθώς και το μυκητοκτόνο imazalil με ανάκτηση 40,2% στο επίπεδο συγκέντρωσης 30μg/kg.

Η επαναληψιμότητα εντός της ημέρας (RSD_I) κυμάνθηκε για την περίπτωση του EMR-lipid από 1,5% για το thiabendazole έως 13,9% για το fluquinconazole. Αντίστοιχα για την περίπτωση του Z-Sep⁺, τα RSD_I κυμάνθηκαν από 1,4% για το thiabendazole έως 17,2% για το imazalil. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) προσδιορίστηκε στο εύρος 2,0% (pyraclostrobin) έως 16,1% (fluquinconazole) για την περίπτωση του

EMR-lipid, ενώ για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του Z-Sep⁺ οι αντίστοιχες τιμές κυμάνθηκαν από 0,9% (thiabendazole) έως 23,1% (difenoconazole).

Οι τιμές των ανακτήσεων και των σχετικών τυπικών αποκλίσεων που λήφθηκαν μέσω της εφαρμογής των δύο προαναφερθέντων πρωτοκόλλων, είναι συγκρίσιμες με αυτές που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία. Για παράδειγμα η μελέτη των He Z. et al. (2016), που στόχευε στον πολυ-υπολειμματικό προσδιορισμό 162 παρασιτοκτόνων, με χρήση της original QuEChERS και του προσροφητικού EMR-lipid, παρουσίασε αποτελέσματα μέσω ανακτήσεων στο εύρος 71-119% και σχετικές τυπικές αποκλίσεις μικρότερες του 20%.

Πίνακας 11. Εύρος γραμμικότητας, καμπύλες βαθμονόμησης και συντελεστές προσδιορισμού για τις μεθόδους QuEChERS με χρήση Z-Sep⁺ και EMR-lipid.

	EMR-lipid			Z-Sep ⁺		
	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (µg/kg)	ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	r ²	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (µg/kg)	ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	r ²
Alachlor	5-500	y = 124560x + 804357	0.9906	5-500	y = 135004x + 668460	0.9968
Azoxystrobin	5-500	y = 603222x - 1537979	0.9993	5-500	y = 562263x + 2701010	0.9973
Benalaxyl	5-500	y = 737851x + 5232620	0.9980	5-500	y = 757938x + 5635450	0.9959
Boscalid	5-500	y = 88184.9x + 417036	0.9936	5-500	y = 93402.1x + 336783	0.9969
Chlorfenviphos	5-500	y = 221608x + 1600880	0.9967	5-500	y = 235514x + 1731910	0.9932
Chlorpyrifos	5-500	y = 69066.9x + 17848	0.9956	5-500	y = 65190.9x - 325777	0.9979
Diazinon	5-500	y = 484532x + 3880110	0.9989	5-500	y = 493036x + 4450710	0.9967
Difenoconazole	5-500	y = 159341x + 414814	0.9943	5-500	y = 160944x + 333097	0.9989
Dimethoate	5-500	y = 377218x - 753254	0.9986	5-500	y = 409475x + 1662440	0.9989
Diuron	5-500	y = 179021x - 309348	0.9994	5-500	y = 169614x + 1821490	0.9922
Deltamethin	5-500	y = 68930.1x - 505005	0.9942	5-500	y = 72635x - 432389	0.9985
Fenbuconazole	5-500	y = 135721x + 938941	0.9908	5-500	y = 140389x + 744523	0.9969
Fenoxycarb	5-500	y = 293789x + 205782	0.9998	5-500	y = 247900x + 3255170	0.9916
Florasulam	5-500	y = 58991.6x - 591385	0.9968	5-500	y = 77664.1x - 549336	0.9996
Fluquinconazole	5-500	y = 16466.9x - 20846	0.9919	5-500	y = 17970.3x - 111375	0.9994
Iodosulfuron methyl	5-500	y = 6752.52x + 9302.52	0.9988	5-500	y = 8179.83x + 54011.2	0.9918
Imazalil	5-500	y = 400326x - 1346460	0.9989	5-500	y = 375994x + 4153590	0.9936
Isoproturon	5-500	y = 546296x + 579244	0.9996	5-500	y = 505525x + 7375950	0.9924
Kresoxim-methyl	5-500	y = 357156x + 920650	0.9995	5-500	y = 304773x + 4523270	0.9917
Metalaxyl	5-500	y = 596400x + 664695	0.9995	5-500	y = 546209x + 7461990	0.9944
Myclobutanil	5-500	y = 146017x + 914948	0.9916	5-500	y = 152531x + 468150	0.9981
Mefenpyr-diethyl	5-500	y = 291451x + 3000970	0.9938	5-500	y = 307398x + 3081860	0.9904
Nicosulfuron	5-500	y = 94620.3x - 622363	0.9964	5-500	y = 121555x - 410348	0.9996
Pirimicarb	5-500	y = 447556x - 1670240	0.9990	5-500	y = 548036x + 5141760	0.9970
Penoxsulam	5-500	y = 146087x - 644206	0.9958	5-500	y = 172535x - 562109	0.9992
Phosmet	5-500	y = 186207x - 592556	0.9995	5-500	y = 171776x + 894584	0.9955
Pyriproxyfen	5-500	y = 647790x - 582780	0.9992	5-500	y = 518602x + 3446090	0.9961
Pyraclostrobin	5-500	y = 413832x + 1754580	0.9989	5-500	y = 431273x + 1939070	0.9974
Quizalofop-p-ethyl	5-500	y = 415488x - 619015	0.9997	5-500	y = 366045x + 3167820	0.9938

Πίνακας 11. (συνέχεια) Εύρος γραμμικότητας, καμπύλες βαθμονόμησης και συντελεστές προσδιορισμού για τις μεθόδους QuEChERS με χρήση Z-Sep⁺ και EMR-lipid.

	EMR-lipid			Z-Sep ⁺		
	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (µg/kg)	ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	r ²	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ (µg/kg)	ΕΞΙΣΩΣΗ ΚΑΜΠΥΛΗΣ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	r ²
Spinetoram	5-500	$y = 283223x + 1615790$	0.9907	5-500	$y = 285220x + 1947550$	0.9962
Spirotetramat	5-500	$y = 349358x + 2919690$	0.9911	5-500	$y = 360465x + 1654900$	0.9981
Terbuthylazine	5-500	$y = 351632x - 67717.7$	0.9994	5-500	$y = 306786x + 3201460$	0.9954
Trifloxystrobin	5-500	$y = 687383x + 1591120$	0.9996	5-500	$y = 587443x + 8106970$	0.9918
Thiabendazole	5-500	$y = 462727x + 297572$	0.9952	5-500	$y = 549922x + 609410$	0.9990
Thiamethoxam	5-500	$y = 143301x - 1283700$	0.9955	5-500	$y = 145286x - 734395$	0.9994
Tebuconazole	5-500	$y = 114033x + 1358240$	0.9967	5-500	$y = 118655x + 1558350$	0.9922
Thiacloprid	5-500	$y = 205644x - 1677590$	0.9966	5-500	$y = 309387x + 1090420$	0.9975
Tribenuron-methyl	5-500	$y = 221921x - 1219980$	0.9978	5-500	$y = 238735x + 1409400$	0.9941
λ-cyhalothrin	5-500	$y = 53377.4x - 379668$	0.9974	5-500	$y = 41603.3x + 51985$	0.9973

Πίνακας 12. Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ως %RSD) των παρασιτοκτόνων με χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικό.

	ΕΝΔΟ-ΗΜΕΡΗΣΙΑ						ΔΙΑ-ΗΜΕΡΗΣΙΑ					
	30 µg/kg		100 µg/kg		300 µg/kg		30 µg/kg		100 µg/kg		300 µg/kg	
	% Rec	RSD _r	%Rec	RSD _r	%Rec	RSD _r	%Rec	RSD _R	%Rec	RSD _R	%Rec	RSD _R
Alachlor	104.51	3.38	90.34	2.71	92.81	1.88	99.11	4.36	88.81	7.83	88.58	7.17
Azoxystrobin	97.43	2.72	107.69	3.74	105.28	2.68	98.92	3.92	105.78	7.82	103.42	4.52
Benalaxyl	74.00	3.49	77.98	4.43	97.29	3.63	74.26	5.15	77.61	6.01	95.74	4.24
Boscalid	111.61	2.78	90.02	3.06	94.16	2.46	109.57	5.00	92.49	6.52	90.07	4.24
Chlorfenviphos	81.23	5.56	112.66	5.00	103.93	3.78	79.59	3.37	109.97	5.81	103.63	2.93
Chlorpyrifos	83.76	4.43	65.65	4.46	69.05	3.61	81.13	7.24	62.37	8.26	69.37	6.04
Diazinon	111.00	2.20	121.36	2.87	112.24	4.72	109.34	2.92	121.48	5.48	111.80	3.10
Difenoconazole	81.32	5.57	86.74	5.03	98.78	3.69	79.82	6.71	83.16	5.06	95.13	5.70
Dimethoate	113.33	3.61	86.55	2.66	108.36	2.04	114.95	3.05	84.70	5.63	104.82	6.11
Diuron	92.50	3.95	94.03	3.92	98.66	3.05	89.66	9.06	95.48	6.49	96.70	5.16
Fenbuconazole	109.39	2.92	99.23	6.03	99.43	3.15	102.96	6.34	99.92	6.59	95.30	5.30
Fenoxycarb	77.40	5.05	97.15	4.95	94.10	3.31	77.08	4.39	94.05	6.04	90.84	5.43
Florasulam	99.41	7.49	96.36	11.51	106.93	3.03	105.11	4.41	97.91	8.49	105.60	5.14
Fluquinconazole	102.39	13.93	86.26	8.26	89.72	3.60	91.62	16.12	88.58	7.86	85.48	5.51
Iodosulfuron methyl	81.15	9.06	112.43	5.97	106.61	6.18	76.96	9.89	119.75	3.51	101.11	1.62
Imazalil	103.04	2.44	104.00	4.13	104.95	1.59	101.98	2.29	101.33	4.81	103.56	4.20

Πίνακας 12. (συνέχεια) Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ως %RSD) των παρασιτοκτόνων με χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικό.

	ΕΝΑΟ-ΗΜΕΡΗΣΙΑ						ΔΙΑ-ΗΜΕΡΗΣΙΑ					
	30 µg/kg		100 µg/kg		300 µg/kg		30 µg/kg		100 µg/kg		300 µg/kg	
	% Rec	RSD _r	%Rec	RSD _r	%Rec	RSD _r	%Rec	RSD _R	%Rec	RSD _R	%Rec	RSD _R
Deltamethin	70.58	8.73	69.75	1.26	67.12	9.23	71.41	10.79	70.16	6.07	66.94	18.55
Trifloxystrobin	96.37	2.66	109.33	4.18	95.16	3.98	93.84	4.35	106.72	5.80	93.84	1.44
Isoprotruron	97.77	4.27	104.54	4.21	102.66	3.14	95.53	5.96	103.73	5.32	101.82	3.14
Kresoxim-methyl	96.94	4.65	100.82	5.61	95.47	2.41	100.03	3.92	100.02	4.68	92.02	3.57
Metalaxyl	99.19	2.27	104.92	4.20	103.66	3.87	99.77	4.40	104.72	5.70	104.03	3.12
Myclobutanil	101.55	2.12	98.71	4.58	99.49	3.42	99.17	3.34	99.23	6.65	95.49	3.95
Mefenpyr-diethyl	75.22	4.13	75.11	4.38	93.11	3.46	73.88	4.66	74.90	5.07	93.22	2.96
Nicosulfuron	107.44	3.90	101.05	6.68	106.50	2.61	96.40	5.03	97.13	14.16	103.76	6.56
Pirimicarb	93.84	3.92	92.61	4.34	98.65	4.45	93.38	3.23	89.02	4.55	98.79	5.81
Penoxsulam	104.20	3.82	83.95	5.00	90.73	2.37	102.18	6.72	83.51	5.47	88.56	5.55
Phosmet	112.37	2.32	92.74	1.78	99.66	1.54	110.68	4.01	93.05	4.13	97.04	5.05
Pyriproxyfen	49.90	6.29	60.66	4.12	58.69	2.32	48.01	4.86	59.61	8.30	58.24	3.11
Pyraclostrobin	75.95	4.30	81.66	3.25	96.44	4.31	74.34	2.04	80.38	6.91	94.67	3.48
Quizalofop-p-ethyl	70.88	6.50	79.90	5.52	80.55	6.42	74.03	6.66	79.36	7.41	75.43	4.67
Spinetoram	100.45	2.60	92.00	7.25	101.09	2.91	100.11	5.42	92.54	8.25	96.91	2.95
Spirotetramat	95.26	6.15	104.02	3.96	103.72	3.81	86.37	4.70	104.39	7.79	103.52	4.19
Terbutylazine	93.89	4.32	88.09	3.82	86.30	2.79	91.50	3.58	88.93	6.27	83.60	4.29
Thiabendazole	108,68	1.55	82.92	5.28	92.18	2.90	106.87	2.28	79.41	5.79	89.49	4.41
Thiamethoxam	103.35	6.66	108.93	2.23	101.83	2.06	100.15	7.22	105.40	3.47	98.02	3.90
Tebuconazole	97.86	1.94	103.34	6.84	98.53	3.81	95.55	4.77	103.44	6.42	96.85	3.59
Thiacloprid	107.01	3.54	94.54	5.00	99.79	1.93	105.42	4.32	93.79	5.02	97.29	6.37
Tribenuron-methyl	106.97	4.75	89.18	4.21	96.01	2.59	106.44	5.00	88.72	5.22	92.95	3.76
λ-cyhalothrin	68.42	2.03	71.77	8.86	80.13	11.76	71.09	7.52	79.20	3.82	78.45	23.19

Πίνακας 13. Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ως %RSD) των παρασιτοκτόνων με χρήση του Z-Sep⁺ ως προσροφητικό.

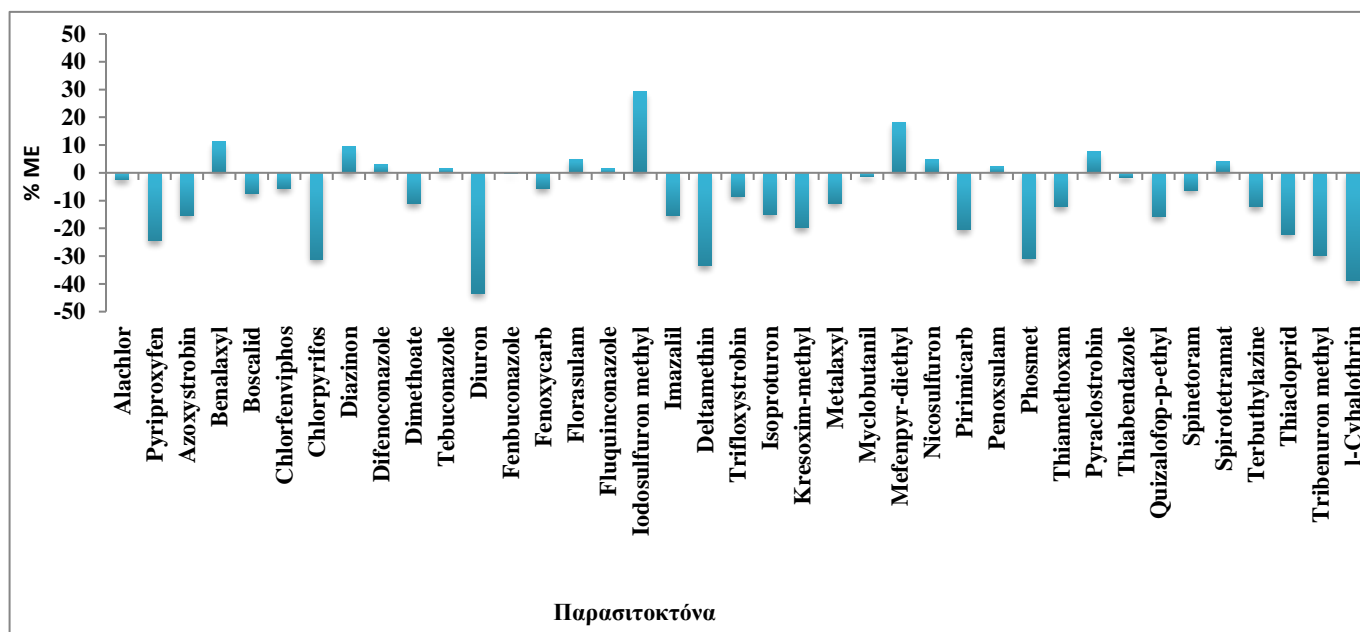
	ΕΝΔΟ-ΗΜΕΡΗΣΙΑ						ΔΙΑ-ΗΜΕΡΗΣΙΑ					
	30 µg/kg		100 µg/kg		300 µg/kg		30 µg/kg		100 µg/kg		300 µg/kg	
	% Rec	RSD _r	%Rec	RSD _r	%Rec	RSD _r	%Rec	RSD _R	%Rec	RSD _R	%Rec	RSD _R
Alachlor	83.11	8.01	83.88	3.53	92.41	5.11	70.46	14.02	70.72	6.15	89.61	5.01
Azoxystrobin	90.51	3.71	98.87	2.47	101.70	3.59	77.44	16.54	80.59	11.61	105.45	4.10
Benalaxyl	72.14	4.86	92.03	2.00	99.86	4.73	72.12	2.91	75.76	13.52	103.66	3.70
Boscalid	79.09	6.53	83.56	1.83	91.47	2.82	72.07	1.61	73.10	9.93	94.28	3.32
Chlorfenviphos	101.49	5.50	109.13	2.22	107.11	5.61	84.29	17.53	91.39	12.38	110.95	5.21
Chlorpyrifos	79.81	3.68	58.99	2.82	73.72	5.72	74.60	10.05	53.33	10.90	73.81	8.16
Diazinon	107.22	5.15	122.74	1.27	115.75	5.30	99.80	16.66	102.70	10.95	119.16	4.26
Difenoconazole	75.56	4.89	70.31	2.35	81.07	5.65	89.59	23.10	70.08	11.97	83.13	3.71
Dimethoate	92.68	2.42	99.24	2.04	105.62	3.07	81.98	14.48	80.44	12.41	108.71	4.25
Diuron	77.83	3.50	78.29	2.62	89.63	2.91	73.13	6.30	74.73	11.39	73.13	6.30
Fenbuconazole	78.53	9.16	84.21	2.20	95.50	3.93	72.42	10.83	72.24	12.86	95.06	4.89
Fenoxycarb	74.56	7.35	82.59	2.19	97.50	4.50	70.32	4.81	70.36	9.07	98.00	4.46
Florasulam	102.99	5.35	75.58	7.80	83.52	4.99	88.73	10.32	72.27	14.10	90.68	6.67
Fluquinconazole	86.11	8.68	81.76	1.65	86.42	3.11	75.79	14.79	76.05	12.96	88.16	7.05
Iodosulfuron methyl	23.50	4.87	23.08	7.47	71.15	6.71	22.64	21.11	22.80	8.98	85.10	5.83
Imazalil	40.25	17.17	54.07	8.88	65.27	4.86	43.94	20.45	45.54	7.46	68.32	3.33
Deltamethin	82.34	13.39	58.17	8.20	80.60	1.67	70.20	11.25	42.65	13.06	86.59	12.16
Trifloxystrobin	92.46	5.85	99.41	0.70	99.80	5.04	77.77	17.34	82.56	11.95	103.65	5.00
Isoproturon	83.99	6.29	85.13	2.93	91.55	2.30	73.00	11.53	72.65	13.33	94.00	4.20
Kresoxim-methyl	81.50	6.54	90.77	1.56	99.14	5.26	75.73	5.95	73.51	11.58	102.82	5.03
Metalaxyl	93.55	1.82	99.28	2.67	102.51	3.75	84.77	18.61	83.72	10.72	107.54	4.02
Myclobutanil	80.94	8.73	86.44	1.27	92.84	5.02	79.95	7.92	70.60	13.20	97.68	3.52
Mefenpyr-diethyl	104.08	4.13	109.31	1.86	101.72	4.49	88.23	17.98	91.86	11.57	105.36	3.76
Nicosulfuron	92.33	6.93	42.92	21.98	52.64	3.59	83.85	11.86	49.82	10.88	58.28	8.38
Pirimicarb	80.08	3.80	86.98	3.89	99.70	3.22	77.05	4.54	71.63	11.24	101.40	3.07
Penoxsulam	82.03	5.15	74.18	7.00	83.77	4.21	72.49	12.44	68.09	12.12	87.77	5.91
Phosmet	89.77	2.62	90.14	1.67	98.17	3.49	80.41	9.10	72.53	12.90	100.71	3.07
Pyriproxyfen	40.47	3.63	52.68	3.81	59.63	2.21	34.35	19.46	42.41	15.79	58.20	3.33
Pyraclostrobin	89.51	5.99	96.90	1.17	95.73	4.99	75.75	18.85	81.36	11.77	101.58	3.60
Quizalofop-p-ethyl	63.46	4.06	72.32	2.29	82.18	5.68	56.49	1.17	72.38	12.54	84.75	5.39
Spinetoram	19.35	7.16	14.16	19.94	18.47	16.88	20.64	4.14	14.62	11.24	20.96	18.53
Spirotetramat	88.85	7.48	91.18	2.60	97.84	4.76	72.52	21.39	76.87	14.63	101.57	5.05
Terbutylazine	73.56	2.15	78.16	2.12	85.14	3.71	73.12	2.49	74.37	11.21	87.95	2.65
Thiabendazole	80.10	1.44	60.76	7.03	73.73	9.13	62.17	0.86	62.74	10.29	80.22	4.97
Thiamethoxam	103.25	2.34	89.52	2.56	96.72	3.51	94.31	10.37	71.73	13.37	100.01	4.26

Πίνακας 13. (συνέχεια) Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (ως %RSD) των παρασιτοκτόνων με χρήση του Z-Sep⁺ ως προσροφητικό.

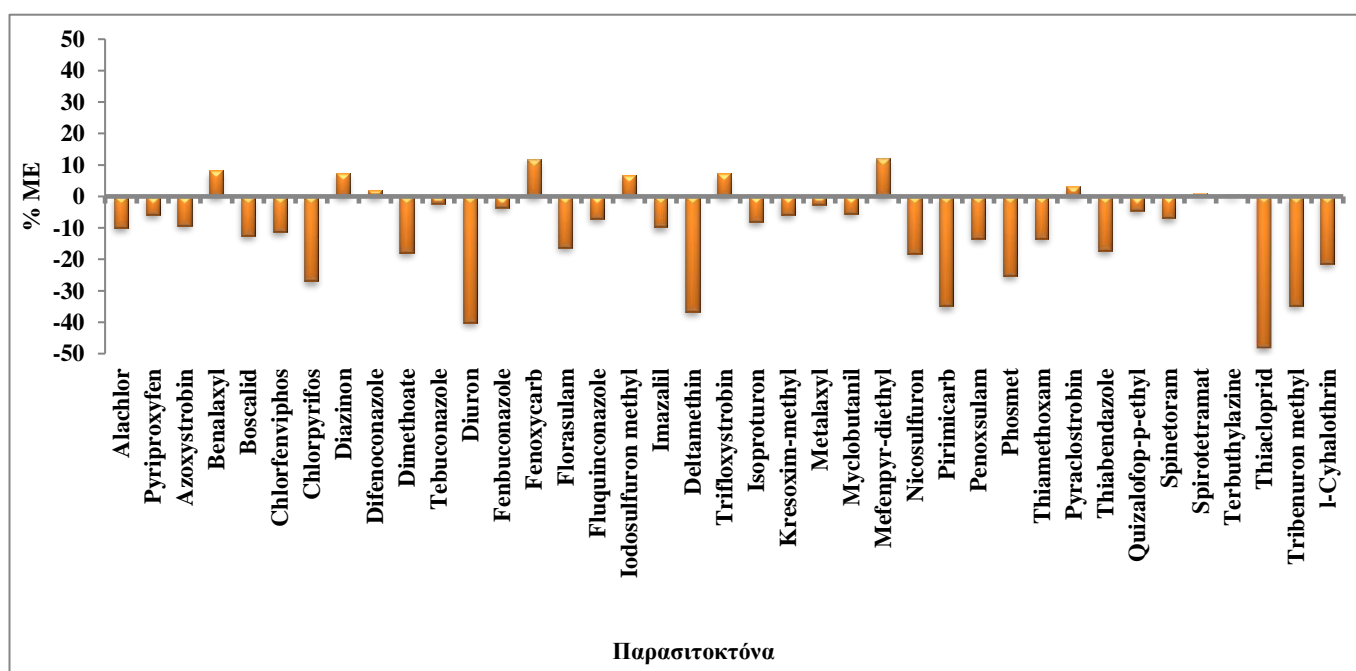
	ΕΝΔΟ-ΗΜΕΡΗΣΙΑ						ΔΙΑ-ΗΜΕΡΗΣΙΑ					
	30 µg/kg		100 µg/kg		300 µg/kg		30 µg/kg		100 µg/kg		300 µg/kg	
	% Rec	RSD _r	%Rec	RSD _r	%Rec	RSD _r	%Rec	RSD _R	%Rec	RSD _R	%Rec	RSD _R
Tebuconazole	80.44	3.16	68.65	5.55	83.46	4.51	63.68	1.33	66.05	12.68	84.62	4.90
Thiacloprid	94.78	4.64	98.27	5.67	101.49	2.81	80.59	12.54	77.97	11.19	101.67	3.90
Tribenuron-methyl	82.34	3.33	85.60	1.36	95.70	2.67	71.62	14.99	71.03	15.47	96.47	2.86
λ-cyhalothrin	101.33	4.07	76.11	8.45	95.92	17.41	84.10	10.57	64.29	5.35	102.69	15.97

6.3.ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΜΗΤΡΑΣ

Στο διάγραμμα 6 παρουσιάζεται η επίδραση του υποστρώματος, για κάθε προσδιοριζόμενο παρασιτοκτόνο για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του προσροφητικού Z-Sep⁺, ενώ στο διάγραμμα 7 παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα, για την περίπτωση του EMR-lipid.



Διάγραμμα 6. Επίδραση του υποστρώματος, για κάθε προσδιοριζόμενο παρασιτοκτόνο για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του προσροφητικού Z-Sep⁺.



Διάγραμμα 7. Επίδραση του υποστρώματος, για κάθε προσδιοριζόμενο παρασιτοκτόνο για την περίπτωση του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid.

Οι τιμές % ME για την περίπτωση του Z-Sep⁺ υποδηλώνουν χαμηλή επίδραση της μήτρας για τους περισσότερους αναλυτές, μεταξύ -19,7% (για την περίπτωση του *kresoxsim-methyl*) έως 18,3% (για την περίπτωση του *mefenpyr-diethyl*). Εξαίρεση αποτελούν οι περιπτώσεις των παρασιτοκτόνων *chlorpyrifos* (-31,1%), *diuron* (-43,4%), *iodosulfuron methyl* (29,4%), *deltametrin* (-33,3%), *pyriproxifen* (-24,5%), *phosmet* (-31,0%), *thiacloprid* (-22,1%), *tribenuron-methyl* (-29,9%) και *λ-cyhalothrin* (-38,7%) τα οποία παρουσιάζουν μέτρια επίδραση της μήτρας. Όπως φαίνεται και στο Διάγραμμα 5., στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζεται καταστολή του χρωματογραφικού σήματος.

Αντίστοιχα, οι τιμές % ME για την περίπτωση του EMR-lipid υποδηλώνουν χαμηλή επίδραση της μήτρας για την πλεονότητα των αναλυτών, με εύρος μεταξύ -18,4% (για την περίπτωση του *nicosulfuron*) έως 12,2% (για την περίπτωση του *mefenpyr-diethyl*). Εξαίρεση αποτελούν οι περιπτώσεις των παρασιτοκτόνων *chlorpyrifos* (-27,0%), *diuron* (-40,3%), *deltametrin* (-36,7%), *pirimicarb* (-34,7%), *phosmet* (-25,2%) και *thiacloprid* (-48,2%), τα οποία παρουσιάζουν μέτρια επίδραση της μήτρας. Και σε αυτή τη περίπτωση η καταστολή του χρωματογραφικού σήματος υπερτερεί.

Τα αποτελέσματα που λήφθηκαν για την επίδραση της μήτρας, και για τα δύο πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν, είναι συγκρίσιμα με αυτά της βιβλιογραφίας που εμφανίζεται στο Πίνακα 4., καθώς σε όλες τις περιπτώσεις που αναφέρονται στο συγκεκριμένο πίνακα, οι επιδράσεις της μήτρας χαρακτηρίζονταν από χαμηλές έως μέτριας ισχύος.

6.4. ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΟΡΙΑ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Τα υπολογισμένα LODs και LOQs τόσο για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid, όσο και για αυτό που κάνει χρήση του Z-Sep⁺ παρουσιάζονται στον Πίνακα 13. Τα LOQ για την περίπτωση του EMR-lipid, κυμάνθηκαν από 1,3 μg/kg για την περίπτωση του *thiabendazole* έως 7,8 μg/kg για την περίπτωση του *fluquinconazole*. Τα LOQs ήταν σε όλες τις περιπτώσεις μικρότερα των αντίστοιχων MRLs των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων. Αντίστοιχα τα LODs κυμάνθηκαν από 0,4 μg/kg για την περίπτωση του *thiabendazole* έως 2,6 μg/kg για την περίπτωση του *fluquinconazole*.

Όσον αφορά το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του Z-Sep⁺, και σε αυτή τη περίπτωση τα LOQs δεν ξεπέρασαν τα αντίστοιχα MRLs των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων. Πιο συγκεκριμένα, η χαμηλότερη τιμή LOQ υπολογίστηκε για το μυκητοκτόνο thiabendazole (1,0 μg/kg) ενώ η υψηλότερη για το εντομοκτόνο deltamethrin (9,9 μg/kg). Αντίστοιχα τα LODs κυμάνθηκαν στο εύρος από 0,3 μg/kg για το thiabendazole έως 3,3 μg/kg για το deltamethrin. Ακόμα οι τιμές των ορίων ποσοτικοποίησης που λήφθηκαν από τις δύο μεθόδους που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία, ήταν παρόμοιες ή μικρότερες με τις αντίστοιχες της βιβλιογραφίας.

Πίνακας 14. Όρια ανίχνευσης (LODs) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQs) για τα δύο εξεταζόμενα πρωτόκολλα και το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης 30μg/kg.

	EMR-lipid		Z-Sep ⁺	
	LOQ (μg/kg)	LOD (μg/kg)	LOQ (μg/kg)	LOD (μg/kg)
Alachlor	3.17	1.05	5.99	1.98
Azoxystrobin	2.38	0.79	3.02	1.00
Benalaxyl	2.33	0.77	3.16	1.04
Boscalid	2.79	0.92	4.65	1.53
Chlorfenviphos	4.06	1.34	5.02	1.66
Chlorpyrifos	3.34	1.10	2.64	0.87
Diazinon	2.20	0.72	4.97	1.64
Difenoconazole	4.08	1.35	3.33	1.10
Dimethoate	3.68	1.21	2.02	0.66
Diuron	3.29	1.08	2.45	0.81
Fenbuconazole	2.87	0.95	6.47	2.13
Fenoxycarb	3.52	1.16	4.93	1.63
Florasulam	6.71	2.21	4.96	1.63
Fluquinconazole	7.83	2.58	6.73	2.22
Iodosulfuron methyl	6.61	2.18	3.97	1.31
Imazalil	2.26	0.75	6.22	2.05
Deltamethin	5.55	1.83	9.92	3.27
Trifloxystrobin	2.31	0.76	4.87	1.61
Isoproturon	3.76	1.24	4.75	1.57
Kresoxim-methyl	4.05	1.34	4.80	1.58
Metalaxyl	2.03	0.67	1.53	0.50
Myclobutanil	1.94	0.64	6.36	2.10
Mefenpyr-diethyl	2.79	0.92	3.87	1.28
Nicosulfuron	3.77	1.24	5.76	1.90
Pirimicarb	3.31	1.09	2.74	0.90
Penoxsulam	3.58	1.18	3.80	1.25
Phosmet	2.35	0.77	2.12	0.70
Pyriproxyfen	2.83	0.93	1.32	0.44
Pyraclostrobin	2.94	0.97	4.83	1.59
Quizalofop-p-ethyl	3.99	1.31	3.50	1.16
Spinetoram	2.35	0.77	1.25	0.41
Spirotetramat	5.27	1.74	6.00	1.97
Terbuthylazine	3.65	1.20	1.42	0.47
Thiabendazole	1.32	0.44	0.98	0.32
Thiamethoxam	6.20	2.04	2.17	0.72
Tebuconazole	1.71	0.56	1.44	0.48
Thiacloprid	3.41	1.12	3.96	1.31
Tribenuron-methyl	4.57	1.51	2.47	0.81
λ-cyhalothrin	2.82	0.93	3.67	1.21

6.5. ΔΙΕΥΡΥΜΕΝΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ

Η διευρυμένη αβεβαιότητα υπολογίστηκε και για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) και για τα δύο εξεταζόμενα πρωτόκολλα. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους Πίνακες 15 και 16 και στα διαγράμματα 8 και 9. Ακόμα στους Πίνακες 15, 16 παρουσιάζονται και οι τιμές του λόγου Horwitz (HorRat) για το μικρότερο επίπεδο συγκέντρωσης 30 µg/kg.

Από τον Πίνακα 15, είναι ορατό ότι η διευρυμένη αβεβαιότητα για την περίπτωση του EMR-lipid κυμάνθηκε, στα 30 µg/kg, από 3,09% ($\pm 1,00$) για το thiabendazole έως 20,32% ($\pm 4,95$) για το iodosulfuron-methyl, στα 100 µg/kg από 4,19% ($\pm 3,89$) για το phosmet έως 17,18% ($\pm 5,27$) για το florasulam και στα 300 µg/kg από 1,84% ($\pm 5,88$) για το metalaxyl έως 8,50% ($\pm 11,86$) για το fluquinconazole. Αντίστοιχα από τον Πίνακα 16, για την περίπτωση του Z-Sep⁺, η διευρυμένη αβεβαιότητα κυμάνθηκε, για τα 30 µg/kg από 4,11% ($\pm 1,15$) για το metalaxyl έως 20,51% ($\pm 4,83$) για το fenbuconazole, στα 100 µg/kg από 3,40% ($\pm 2,91$) για το tribenuron-methyl έως 26,38% ($\pm 3,22$) για το spinetoram και στα 300 µg/kg από 2,51% ($\pm 6,73$) για το quizalofop-p-ethyl έως 23,59% ($\pm 14,00$) για το spinetoram.

Σε όλες τις περιπτώσεις η διευρυμένη αβεβαιότητα συμφωνεί με την απαίτηση της νομοθεσίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στην Κοινοτική Απόφαση SANTE/12682/2019 και SANTE/11312/2021, η οποία ορίζει ότι πρέπει να είναι μικρότερη του 50%. Ωστόσο οι υψηλότερες τιμές διευρυμένης αβεβαιότητας που παρουσιάζονται σε ορισμένα παρασιτοκτόνα, χωρίς να ξεφεύγουν από το όριο του 50%, πιθανώς να οφείλονται σε χαμηλή ανάκτηση ή/και κακή επαναληψιμότητα. Πιο συγκεκριμένα οι μέσες ανακτήσεις των παρασιτοκτόνων spinetoram και quizalofop-p-ethyl, κατά την εφαρμογή του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του Z-Sep⁺, έχουν προσδιοριστεί στο 19,35% και 63,46% αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους, η διευρυμένη αβεβαιότητα είναι, στην πλειονότητα των περιπτώσεων, μεγαλύτερη για την μεθοδολογία που έκανε χρήση του προσροφητικού Z-Sep⁺.

Πίνακας 15. Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid.

ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ	ΕΠΗΠΕΛΟ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ						
	30 µg/kg			100 µg/kg		300 µg/kg	
	U(%)	±	HorRat	U(%)	±	U(%)	±
Alachlor	7.69	2.41	0.26	6.29	5.68	2.65	7.44
Azoxystrobin	6.16	1.80	0.19	8.34	8.98	4.20	12.74
Benalaxyl	7.80	1.73	0.19	9.82	7.66	3.02	8.00
Boscalid	6.37	2.13	0.23	6.95	6.26	3.38	9.46
Chlorfenviphos	12.46	3.04	0.33	9.36	10.38	3.14	9.45
Chlorpyrifos	9.96	2.50	0.27	13.00	8.02	5.20	10.61
Diazinon	5.03	1.67	0.18	7.97	9.88	3.00	9.40
Difenoconazole	12.51	3.05	0.33	7.28	6.43	3.40	10.06
Dimethoate	8.27	2.81	0.30	6.31	5.46	4.12	13.29
Diuron	8.92	2.48	0.27	6.13	5.85	3.43	10.13
Fenbuconazole	6.67	2.19	0.23	5.08	5.17	3.46	10.17
Fenoxycarb	11.32	2.63	0.29	7.36	7.29	4.28	10.46
Florasulam	17.01	5.07	0.55	17.18	5.27	4.56	14.64
Fluquinconazole	13.14	4.11	0.44	11.85	10.78	8.50	11.86
Iodosulfuron methyl	20.32	4.95	0.54	11.71	10.41	4.38	13.21
Imazalil	5.55	1.71	0.18	9.91	9.53	3.78	11.91
Deltamethin	19.49	4.13	0.45	5.59	3.86	4.84	8.99
Trifloxystrobin	6.02	1.74	0.19	6.93	7.69	4.93	13.66
Isoproturon	9.68	2.84	0.31	10.05	10.50	4.33	13.61
Kresoxim-methyl	10.53	3.06	0.33	7.25	7.15	3.39	9.36
Metalaxyl	5.16	1.54	0.17	9.29	9.75	1.84	5.88
Myclobutanil	4.82	1.47	0.16	6.67	6.70	3.46	10.49
Mefenpyr-diethyl	9.23	2.08	0.23	9.78	7.35	3.74	10.54
Nicosulfuron	8.90	2.87	0.31	10.43	10.98	3.59	11.50
Pirimicarb	8.86	2.49	0.27	6.16	5.80	4.63	14.08
Penoxsulam	8.69	2.72	0.29	10.41	8.62	4.96	13.60
Phosmet	5.32	1.79	0.19	4.19	3.89	3.71	11.10
Pyriproxyfen	13.91	2.08	0.23	9.03	5.48	5.42	9.54
Pyraclostrobin	9.62	2.19	0.24	7.38	6.02	4.91	12.54

Πίνακας 15. (συνέχεια) Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid.

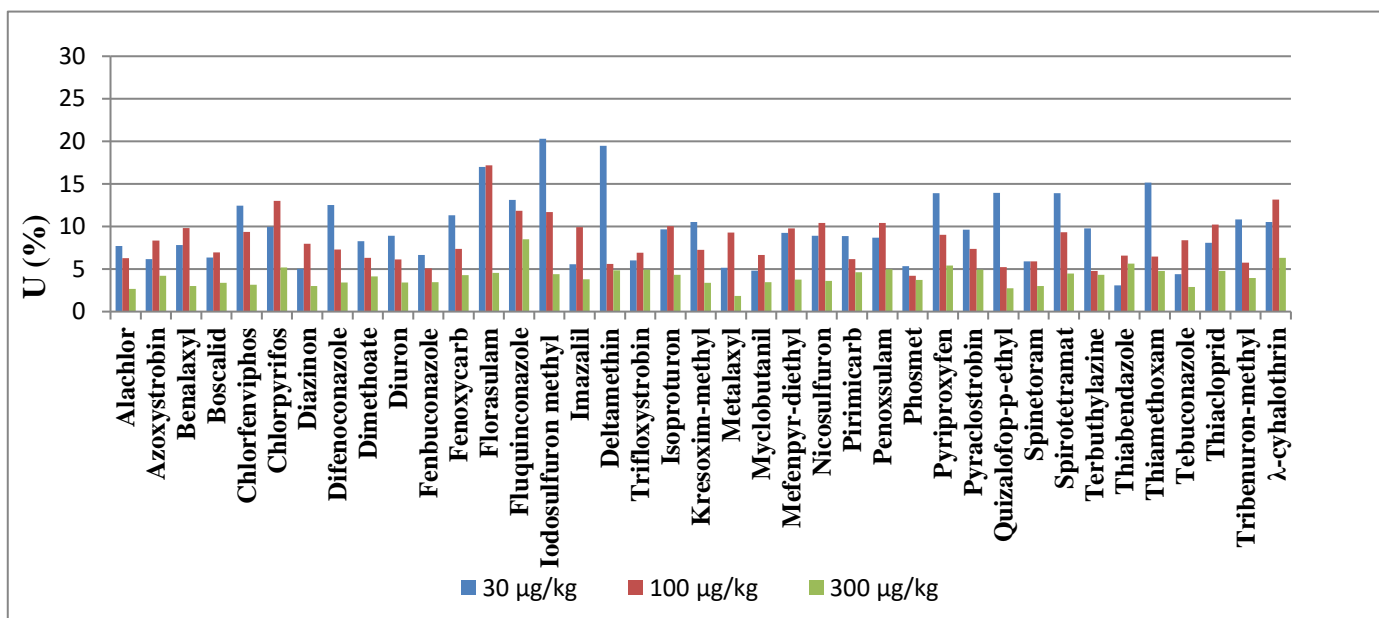
ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ	ΕΠΙΠΕΔΟ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ						
	30 µg/kg			100 µg/kg		300 µg/kg	
	U(%)	±	HorRat	U(%)	±	U(%)	±
Quizalofop-p-ethyl	13.94	2.96	0.33	5.23	4.08	2.76	6.55
Spinetoram	5.90	1.78	0.19	5.90	5.60	3.00	9.01
Spirotetramat	13.92	3.98	0.43	9.34	9.72	4.47	13.94
Terbuthylazine	9.76	2.75	0.30	4.78	4.28	4.33	11.18
Thiabendazole	3.09	1.00	0.11	6.56	6.05	5.63	12.14
Thiamethoxam	15.16	4.70	0.51	6.45	7.02	4.79	14.51
Tebuconazole	4.40	1.29	0.14	8.39	8.79	2.88	8.74
Thiacloprid	8.07	2.59	0.28	10.24	9.82	4.78	14.32
Tribenuron-methyl	10.84	3.48	0.37	5.75	5.21	3.94	11.15
λ-cyhalothrin	10.53	2.10	0.23	13.16	8.74	6.32	13.87

Πίνακας 16. Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του προσροφητικού Z-Sep⁺.

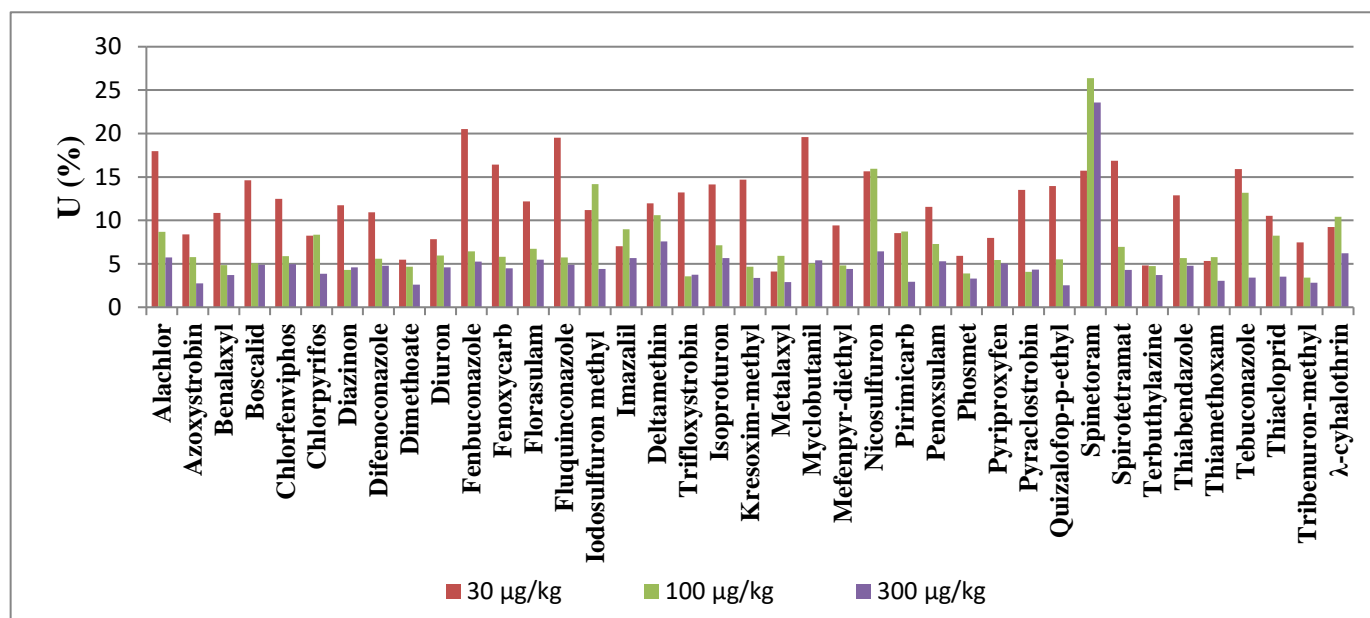
ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ	ΕΠΙΠΕΔΟ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ						
	30 µg/kg			100 µg/kg		300 µg/kg	
	U(%)	±	HorRat	U(%)	±	U(%)	±
Alachlor	17.98	1.44	0.07	8.69	7.29	5.73	13.42
Azoxystrobin	8.38	2.27	0.25	5.78	5.71	2.74	7.38
Benalaxyl	10.85	2.35	0.26	4.85	4.46	3.71	9.15
Boscalid	14.63	3.47	0.38	5.06	4.23	4.90	11.93
Chlorfenviphos	12.50	3.81	0.41	5.88	6.42	4.95	13.78
Chlorpyrifos	8.25	1.97	0.22	8.35	4.86	3.87	8.21
Diazinon	11.74	3.78	0.41	4.29	5.27	4.60	13.35
Difenoconazole	10.95	2.48	0.27	5.60	3.94	4.79	11.76
Dimethoate	5.46	1.52	0.16	4.66	4.62	2.60	6.84
Diuron	7.84	1.83	0.20	5.96	4.66	4.60	12.16
Fenbuconazole	20.51	4.83	0.53	6.44	5.42	5.25	12.26

Πίνακας 16. (συνέχεια) Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του προσροφητικού Z-Sep⁺.

ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΑ	ΕΠΙΠΕΔΟ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ						
	30 µg/kg			100 µg/kg		300 µg/kg	
	U(%)	±	HorRat	U(%)	±	U(%)	±
Fenoxycarb	16.42	3.67	0.40	5.81	4.80	4.49	10.12
Florasulam	12.17	3.76	0.41	6.74	4.82	5.48	13.36
Fluquinconazole	19.54	5.05	0.55	5.73	4.68	4.90	12.75
Iodosulfuron methyl	11.20	0.79	0.08	14.18	3.34	4.40	9.95
Imazalil	7.01	0.78	0.07	8.98	5.15	5.68	10.57
Deltamethin	11.95	3.12	0.29	10.59	5.67	7.59	8.37
Trifloxystrobin	13.21	3.66	0.40	3.56	3.54	3.74	10.51
Isoproturon	14.13	3.56	0.39	7.14	6.08	5.67	13.31
Kresoxim-methyl	14.68	3.59	0.39	4.66	4.23	3.39	9.71
Metalaxyl	4.11	1.15	0.12	5.93	5.89	2.91	9.10
Myclobutanil	19.59	4.76	0.52	5.04	4.36	5.39	12.65
Mefenpyr-diethyl	9.41	2.94	0.32	4.81	5.26	4.39	11.77
Nicosulfuron	15.65	4.33	0.47	15.93	8.15	6.43	10.47
Pirimicarb	8.52	2.05	0.22	8.72	7.58	2.95	8.96
Penoxsulam	11.55	2.84	0.31	7.30	4.97	5.30	11.32
Phosmet	5.92	1.59	0.17	3.91	3.52	3.32	9.92
Pyriproxyfen	8.00	0.97	0.11	5.43	2.82	5.02	8.98
Pyraclostrobin	13.51	3.63	0.39	4.09	3.96	4.34	11.03
Quizalofop-p-ethyl	13.94	2.59	0.29	5.53	3.99	2.51	6.73
Spinetoram	15.71	0.91	0.10	26.38	3.22	23.59	14.00
Spirotetramat	16.87	4.50	0.49	6.94	6.33	4.29	12.96
Terbutylazine	4.81	1.06	0.12	4.73	3.70	3.72	7.97
Thiabendazole	12.88	2.73	0.08	5.66	3.27	4.76	10.95
Thiamethoxam	5.33	1.65	0.18	5.78	5.17	3.04	7.42
Tebuconazole	15.91	3.30	0.12	13.20	8.41	3.40	8.69
Thiacloprid	10.51	2.99	0.32	8.24	8.27	3.52	9.16
Tribenuron-methyl	7.47	1.84	0.20	3.40	2.91	2.83	8.03
λ-cyhalothrin	9.25	2.81	0.30	10.43	7.06	6.22	9.32



Διάγραμμα 8. Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του EMR-lipid.



Διάγραμμα 9. Διευρυμένη αβεβαιότητα για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30 µg/kg, 100 µg/kg και 300 µg/kg) για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του Z-Sep⁺.

7. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΩΝ ΣΥΓΚΡΙΝΟΜΕΝΩΝ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟΥ

Η μεθοδολογία QuEChERS με χρήση του EMR-lipid ως προσροφητικό, που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στη συνέχεια σε 30 πραγματικά δείγματα ελαιολάδου. Όλα τα δείγματα μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και διατηρήθηκαν σε συνθήκες περιβάλλοντος και σε σωλήνα πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 15mL έως ότου πραγματοποιηθεί η ανάλυσή τους.

Τα δείγματα ελαιολάδου, έχουν ληφθεί από διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδος. Σε αυτά συγκαταλέγονται η Πελοπόννησος (Ν. Αχαΐας, Ν. Ηλείας, Ν. Κορινθίας, Ν. Αργολίδας, Ν. Αρκαδίας, Ν. Μεσσηνίας, Ν. Λακωνίας), η Κρήτη (Ν. Χανίων, Ν. Ηρακλείου) καθώς και η Στερεά Ελλάδα (Ν. Φθιώτιδας), οι οποίες συγκαταλέγονται στις περιοχές με την υψηλότερη ελαιοπαραγωγή της χώρας. Ακόμα δείγματα λήφθηκαν και από το Ν. Πιερίας, την Ζάκυνθο και την Αττική. Στον Πίνακα 17. παρουσιάζονται ο αριθμός των δειγμάτων που μελετήθηκαν, το γεωγραφικό διαμέρισμα από το οποίο προέρχονται καθώς και τα υπολείμματα παρασιτοκτόνων που ανιχνεύθηκαν. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν την απουσία παρασιτοκτόνων και στα 30 δείγματα ελαιολάδου που μελετήθηκαν.

Πίνακας 17. Γεωγραφική κατανομή πραγματικών δειγμάτων που επιλέχθηκαν για προσδιορισμό υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων και με την εφαρμογή του πρωτοκόλλου που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid.

ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΟ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ
ΑΡΓΟΛΙΔΑ	1	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΑΡΚΑΔΙΑ	1	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΠΙΕΡΙΑ	2	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΛΑΚΚΩΝΙΑ	4	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΜΕΣΣΗΝΙΑ	5	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ	3	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΖΑΚΥΝΘΟΣ	3	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΧΑΝΙΑ	3	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΑΧΑΙΑ	1	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΗΛΕΙΑ	3	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΦΘΙΩΤΙΔΑ	1	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΑΤΤΙΚΗ	2	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ
ΚΟΡΙΝΘΙΑ	1	ΔΕΝ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΕ

Γ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στη παρούσα μελέτη αναπτύχθηκαν, επικυρώθηκαν και συγκρίθηκαν μεταξύ τους δύο αναλυτικές μέθοδοι, για τον πολύ-υπολειμματικό προσδιορισμό 39 παρασιτοκτόνων που εφαρμόζονται στο ελαιόλαδο. Οι δυο μεθοδολογίες ακολούθησαν την ίδια πορεία εκχύλισης και χρωματογραφικής ανάλυσης (original QuEChERS / UHPLC-Orbitrap-MS) ενώ η ειδοποιός διαφορά τους έγκεινται στην επιλογή των κύριων προσροφητικών υλικών, που επιλέχθηκαν για το στάδιο του καθαρισμού (EMR-lipid, Z-Sep⁺). Οι βέλτιστες ποσότητες των προσροφητικών κρίθηκε ότι ήταν 0,5g EMR-Lipid ανά 5ml υπερκειμένου και 50mg Z-Sep⁺, 50mg PSA, 150mg MgSO₄ ανά 1ml υπερκειμένου για κάθε μεθοδολογία αντίστοιχα.

Οι μέθοδοι επικυρώθηκαν με βάση τις διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου που ορίζει η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στην Κοινοτική Απόφαση SANTE/12682/2019 και SANTE/11312/2021. Η επικύρωση πραγματοποιήθηκε προσδιορίζοντας τους παράγοντες ποιότητας, δηλαδή προσδιορίζοντας τη γραμμικότητα, τη % μέση ανάκτηση του κάθε φυτοφαρμάκου και τις % σχετικές τυπικές τους αποκλίσεις, την επαναληψιμότητα, την αναπαραγωγιμότητα, την ακρίβεια της μεθόδου, την επίδραση της μήτρας (ME), τα όρια ανίχνευσης (LODs) και όρια ποσοτικοποίησης (LOQs) καθώς και η διευρυμένη αβεβαιότητα (%U). Τόσο η % μέση ανάκτηση του κάθε παρασιτοκτόνου, όσο και η διευρυμένη αβεβαιότητα υπολογίστηκαν και για τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (30 μg/kg, 100 μg/kg και 300 μg/kg).

Η γραμμικότητα και στις δύο περιπτώσεις ήταν μεγαλύτερη του 0,99 με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων. Η ορθότητα επικυρώθηκε μέσω των μέσων ανακτήσεων στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (30, 100 και 300 μg/kg) και οι τιμές κυμάνθηκαν στο εύρος 70-113% για το 95% των αναλυτών με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) μικρότερες του 16% για την περίπτωση του EMR-lipid. Τα δύο εντομοκτόνα που παρουσίασαν ανακτήσεις μικρότερες του 70%, στο επίπεδο 30μg/kg, είναι το pyriproxyfen και το λ-cyhalothrin. Για την περίπτωση του Z-Sep⁺, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν στο εύρος 72-107% για το 92% των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (%RSD) χαμηλότερες του 20% για το 92% των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόκων. Πιο συγκεκριμένα πέντε παρασιτοκτόνα εμφάνισαν ανακτήσεις μικρότερες του 70%. Σε αυτά συγκαταλέγονται τα εντομοκτόνα pyriproxyfen και spinetoram, τα ζιζανιοκτόνα quizalofop-p-ethyl και iodosulfuron-methyl καθώς και το

μυκητοκτόνο imazalil. Ωστόσο τα παραπάνω παρασιτοκτόνα εμφάνισαν αποδεκτές τιμές διευρυμένης αβεβαιότητας.

Η ακρίβεια της μεθόδου επικυρώθηκε ως προς την επαναληψιμότητα (RSD_r) και την ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R). Η επαναληψιμότητα για την περίπτωση του EMR-lipid ήταν μικρότερη του 14% για όλα τα προσδιοριζόμενα παρασιτοκτόνα, ενώ για την περίπτωση του Z-Sep⁺ ήταν μικρότερη του 18%. Αντίστοιχα η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ήταν μικρότερη του 17% για την περίπτωση του EMR-lipid, ενώ για το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του Z-Sep⁺ οι αντίστοιχες τιμές κυμάνθηκαν σε εύρος μικρότερο του 24%, και για τα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων.

Όσον αφορά την επίδραση του υποστρώματος (% ME), οι τιμές % ME για την περίπτωση του Z-Sep⁺ υποδηλώνουν χαμηλή επίδραση της μήτρας για όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, με εύρος μεταξύ -19,7 έως 18,3%. Εξαιρέση αποτελούν οι περιπτώσεις των παρασιτοκτόνων chlorpyrifos, diuron, iodosulfuron methyl, deltametrin, pyriproxyfen, phosmet, thiacloprid, tribenuron-methyl και λ-cyhalothrin τα οποία παρουσιάζουν μέτρια επίδραση της μήτρας. Αντίστοιχα, οι τιμές % ME για την περίπτωση του EMR-lipid υποδηλώνουν χαμηλή επίδραση της μήτρας για όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, με εύρος μεταξύ -18,4% έως 12,2%. Εξαιρέση αποτελούν οι περιπτώσεις των παρασιτοκτόνων chlorpyrifos, diuron, deltametrin, pirimicarb, phosmet και thiacloprid, τα οποία παρουσιάζουν μέτρια επίδραση της μήτρας. Και στις δύο μεθοδολογίες υπερτερεί η καταστολή του χρωματογραφικού σήματος.

Τα LOQ για την περίπτωση του EMR-lipid, κυμάνθηκαν από 1,32 μg/kg έως 7,83 μg/kg ενώ τα LODs κυμάνθηκαν από 0,44 μg/kg έως 2,58 μg/kg. Όσον αφορά το πρωτόκολλο που κάνει χρήση του Z-Sep⁺, η χαμηλότερη τιμή LOQ υπολογίστηκε στα 0,98 μg/kg ενώ η υψηλότερη στα 9,92 μg/kg. Αντίστοιχα τα LODs κυμάνθηκαν στο εύρος από 0,32 μg/kg έως 3,27 μg/kg. Τα LOQs ήταν μικρότερα των αντίστοιχων MRLs των προσδιοριζόμενων φυτοφαρμάκων και για τα δύο πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν.

Σε όλες τις περιπτώσεις η διευρυμένη αβεβαιότητα συμφωνεί με την απαίτηση της νομοθεσίας της Ευρωπαϊκής Ένωσης, στην Κοινοτική Απόφαση SANTE/12682/2019 και SANTE/11312/2021, η οποία ορίζει ότι πρέπει να είναι μικρότερη του 50%. Πιο συγκεκριμένα, για την περίπτωση του EMR-lipid κυμάνθηκε, στα 30 μg/kg, από 3,09% ($\pm 1,00$) έως 20,32% ($\pm 4,95$), στα 100 μg/kg από 4,19% ($\pm 3,89$) έως 17,18% ($\pm 5,27$) και στα 300 μg/kg από 1,84% ($\pm 5,88$) έως 8,50% ($\pm 11,86$). Αντίστοιχα για την περίπτωση του Z-Sep⁺, η διευρυμένη αβεβαιότητα κυμάνθηκε, για τα 30 μg/kg από 4,11% ($\pm 1,15$) έως 20,51% ($\pm 4,83$), στα 100 μg/kg από 3,40% ($\pm 2,91$) έως 26,38% ($\pm 3,22$) και στα 300

μg/kg από 2,51% (\pm 6,73) έως 23,59% (\pm 14,00). Η τιμή του λόγου HorRat ήταν μικρότερη από 1 για όλα τα παρασιτοκτόνα που μελετήθηκαν τόσο με την μέθοδο που κάνει χρήση του προσροφητικού EMR-lipid, όσο και για την μέθοδο που κάνει χρήση του προσροφητικού Z-Sep⁺ γεγονός που υποδηλώνει ότι η ακρίβεια της μεθόδου είναι πολύ καλύτερη από την επιτρεπόμενη.

Η βέλτιστη μεθοδολογία εφαρμόστηκε και σε 30 πραγματικά δείγματα ελαιολάδου, τα οποία λήφθηκαν από διάφορα γεωγραφικά διαμερίσματα της Ελλάδος, τα οποία συγκαταλέγονται στις περιοχές με την υψηλότερη ελαιοπαραγωγή της χώρας. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης κατέδειξαν την απουσία των προσδιοριζόμενων παρασιτοκτόνων και στα 30 δείγματα ελαιολάδου που μελετήθηκαν.

Με βάση τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, η μεθοδολογία που κάνει χρήση του EMR-lipid κρίθηκε πιο αποτελεσματική προσέγγιση σε σύγκριση με την αντίστοιχη που χρησιμοποιεί το Z-Sep⁺, για την παρακολούθηση ενός εκτεταμένου φάσματος υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο. Η συνεχής παρακολούθηση των υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων στο ελαιόλαδο, αλλά και στα υπόλοιπα τρόφιμα, καθώς και η ανάπτυξη νέων καινοτόμων μεθοδολογιών που στοχεύουν στο πολύ-υπολειμματικό προσδιορισμό παρασιτοκτόνων κρίνεται σημαντική για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας.

Δ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Abdulrauf L.B., Tan G.H., Review of SBSE Technique for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables, *Chromatographia* 77, pp. 15-24, 2014.
2. Ahmed F.E., Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks, *Trends in analytical chemistry*, vol.20, No.11, pp. 649-661, 2001.
3. Aktar M.W., Sengupta D., Chowdhury A., Impact of pesticide use in agriculture: their benefits and hazards, *Interdisc. Toxicol.*, Vol. 2(1), pp. 1-12, 2009.
4. Amvrazi E.G., Albanis T.A, Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected, *Food Chemistry* 113, pp. 253-261, 2009.
5. Anagnostopoulos C., Miliadis G.E., Development and validation of an easy multiresidue method for the determination of multiclass pesticide residues using GC-MS/MS and LC-MS/MS in olive oil and olives, *Talanta* 112, pp. 1-10, 2013.
6. Anagnostopoulos C., Bourmpopoulou A., Miliadis G., Development and Validation of a Dispersive Solid Phase Extraction Liquid Chromatography Mass Spectrometry Method with Electrospray Ionization for the Determination of Multiclass Pesticides and Metabolites in Meat and Milk. *Analytical Letters*, 46(16) pp. 2526-2541, 2013.
7. Arya S.S., Kaimal A.M., Chib M., Sonawane S.K., Show P.L., Novel, energy efficient and green cloud point extraction: technology and applications in food processing, *Journal Food Science Technology*, 56(2), pp. 524-534, 2019.
8. Barganska Z., Konieczka P., Namiesnik J., Comparison of two methods for the determination of selected pesticides in honey and honeybee samples, *Molecules*, 23(10), 2582, 2018.
9. Caboni P., Carbas P., Acephate and Buprofezin Residues in Olives and Olive oil, in Preedy V., Watson R. (Eds), *Olives and Olive oil in Health and Disease Prevention*, pp. 437-439, 2010.
10. Castillo M., Carbonell E., González C., Miralles-Marco A., Pesticide residue analysis in animal origin food: Procedure Proposal and Evaluation for Lipophilic Pesticides, In R.P. Soundararajan (Eds) *Pesticides-Recent Trends in Pesticide Residue Assay*, pp. 63-92, 2012.
11. Chamkasem N., Harmon T., Analysis of pesticides in olive oil using a modified QuEChERS method with LC-MS/MS and GC-MS/MS, *Journal of Regulatory Science* 01, pp.16-35, 2015.

12. Chemat F., Rombaut N., Sicaire A-G., Meullemiestre A., Fabiano-Tixier A-S., Abert-Vian M., Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review, *Ultrasonics Sonochemistry* 34, pp. 540-560, 2017.
13. Cuncha S.C., Lehotay S., Mastovska K., Fernandes J.O., Oliveira M.B.P.P., Sample Preparation Approaches for the Analysis of Pesticide Residues in Olives and Olive Oils, in Preedy V., Watson R. (Eds), *Olives and Olive oil in Health and Disease*, pp. 653-666, 2010.
14. Damalas C., Eleftherohorinos I.G., Pesticide exposure, safety issues, and risk assessment indicators, *International Journal of Environmental Research and Public Health* Vol. 8, pp. 1402-1419, 2011.
15. Dias J.V., Cutillas V., Lozano A., Pizzutti I.R., Fernández-Alba A.R., Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography- tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up, *Journal of Chromatography A*. 1462, pp.8-18, 2016.
16. Deme P., Azmeera T., Prabhavathi Devi B.L.A., Jonnalagadda P.R., Prasad R.B.N., Vijaya Sarathi U.V.R., An improved dispersive solid-phase extraction clean-up method for the gas chromatography-negative chemical ionisation tandem mass spectrometric determination of multiclass pesticide residues in edible oils, *Food Chemistry*, 142, pp. 144-151, 2014.
17. Eurachem Guide, Terminology in Analytical Measurement – Introduction to VIM 3, 1st edition, 2011.
18. European Commission, Analytical Quality Control and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed SANTE 12682/2019, 2019.
19. European Commission, Analytical Quality Control and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed SANTE/11312/2021, 2021.
20. Fenner K., Canonica S., Wackett L.P., Elsner M., Evaluating pesticide degradation in the environment: blind spots and emerging opportunities, *Science* 341, 752, 2013.
21. García-Reyes J.F., Ferrer C., Gómez-Ramos M.J., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A.R., Determination of pesticide residues in olive oil and olives, *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 26, No. 3, pp. 239-251, 2007.
22. Gilbert-López B., García-Reyes J.F., Fernández-Alba A.R., Molina-Díaz A., Evaluation of two sample treatment methodologies for large-scale pesticide residue

- analysis in olive oil by fast liquid chromatography-electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1217 (24), pp.3736-3747, 2010.
23. Golge O., Hepsag F., Kabak B., Health risk assessment of selected pesticide residues in green pepper and cucumber, *Food and Chemical Toxicology*, 121, pp. 51–64, 2018.
 24. Guardia-Rubio M., Ruin-Medina A., Molina Díaz A., Cañada M.J.A., Influence of Harvesting Method and Washing on the Presence of Pesticide Residues in Olives and Olive oil, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, pp. 8538-8544, 2006.
 25. Guo J., Tong M., Tang J., Bian H., Wan X., He L., Hou R., Analysis of multiple pesticide residues in polyphenol-rich agricultural products by UPLC-MS/MS using a modified QuEChERS extraction and dilution method, *Food Chemistry*, 274, pp. 452–459, 2019.
 26. Hakme E., Lozano A., Ucles S., Gómez-Ramos M.M., Fernández-Alba A.R., High throughput gas chromatography-mass spectrometry analysis of pesticide residues in spices by using the enhanced matrix removal-lipid and the sample dilution approach, *Journal of Chromatography A*, 1573, pp. 28–41, 2018.
 27. He Z., Wang Y., Wang L., Peng Y., Wang W., Liu X., Determination of 255 pesticides in edible vegetable oils using QuEChERS method and gas chromatography tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2016.
 28. Hernando M.D., Ferrer C., Ulaszewska M., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A., Fernández-Alba A.R., Application of high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry with a quadrupole/linear ion trap instrument for the analysis of pesticide residues in olive oil, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (6), pp.1815-1931, 2007.
 29. Hoff R.B., Pizzolato T.M., Combining extraction and purification steps in sample preparation for environment matrices: A review of matrix solid phase dispersion (MSPD) and pressurized liquid extraction (PLE) applications, *Trends in Analytical Chemistry* 109, pp. 83-96, 2018.
 30. Hoddmann d.E., Stroobant V., Mass Analysers in Mass Spectrometry Principles and applications, pp. 85-174, 2007.
 31. Horwitz W., Albert R., The Horwitz Ratio (HorRat): A Useful Index of Method Performance with Respect to Precision, *Journal of AOAC international*, pp. 1095-1109, 2006.

32. Koesukwiwat U., Vaclavik L., Mastovska K., Method development and validation for total haloxyfop analysis in infant formulas and related ingredient matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, pp. 5521-5528, 2018.
33. Kori S., Cloud point extraction coupled with back extraction: a green methodology in analytical chemistry, *Forensic Sciences Research*, pp. 1-15, 2019.
34. Lambropoulou D.A., Albanis T.A., Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based techniques: a review, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 389, pp. 1663-1683, 2007.
35. Lehotay S.J., QuEChERS sample preparation approach for mass spectrometric analysis of pesticide residues in foods, In Zweigenbaum J. (Eds) *Mass Spectrometry in Food Safety: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 747, pp. 65-91, 2011.
36. Lehotay S.J., Han L., Sapozhnikova Y., Use of a quality control approach to assess measurement uncertainty in the comparison of sample processing techniques in the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 410, pp. 5465–5479, 2018.
37. Li J., Sun M., Chang Q., Hu X., Kang J., Fan C., Determination of pesticide residues in teas via QuEChERS combined with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Chromatographia*, 80, pp. 1447-1458, 2017.
38. Li L., Xu Y., Pan C., Zhou Z., Jiang S., Liu F., Simplified pesticide multiresidue analysis of soybean oil by low-temperature cleanup and dispersive solid-phase extraction coupled with gas chromatography/mass spectrometry, *Journal of AOAC International*, 90(5) pp. 1387-1394, 2007.
39. Likudis Z., Costarelli V., Vitoratos A., Apostolopoulos C., Determination of pesticide residues in olive oils with protected geographical indication or designation of origin, *International Journal of Food Science and Technology*, 49, pp. 484-492, 2014.
40. López-Blanco R., Nortes-Méndez R., Robles-Molina J., Moreno-González D., Gilbert-López B., García-Reyes J.F., Molina-Díaz A., Evaluation of different clean-up sorbents for multiresidue pesticide analysis in fatty vegetable matrices by liquid

- chromatography tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1456, pp.89-104, 2016.
41. Moreno-González D., Alcántara-Durán J., Adonna S.M., Beneito-Cambra M., Multi-residue pesticide analysis in virgin olive oil by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* 1562, pp. 27-35, 2018.
 42. Moreno-González D., Huertas-Pérez J.F., García-Campaña A.M., Gámiz-Gracia L., Determination of carbamates in edible vegetable oils by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry using a new clean up based on zirconia for QuEChERS methodology, *Talanta* 128, pp.299-304, 2014.
 43. Moreno-González D., Pérez-Ortega P., Gilbert-López B., Molina-Díaz A., García-Reyes J.F., Fernández-Alba A.R., Evaluation of nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in food. *Journal of Chromatography A*, 1512, pp. 78-87, 2017.
 44. Musarurwa H., Chimuka L., Pakade V.E., Tavengwa N.T., Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis, *Journal of Food Composition and Analysis*, 84, pp. 103-314, 2019.
 45. Nguyen T.D., Lee M.H., Lee G.H., Rapid determination of 95 pesticides in soybean oil using liquid-liquid extraction followed by centrifugation, freezing and dispersive solid phase extraction as cleanup steps and gas chromatography with mass spectrometric detection. *Microchemical Journal*, 95(1), pp. 113-119, 2010.
 46. Ortiz-Hernandez M.L., Sanchez-salinas E., Daltan-Gonzalez E., Castrejon-Godinez M.L., Pesticide biodegradation: Mechanisms, Genetics and strategies to enhance the process, in Chamy R., Rosenkranz F. (Eds), *Biodegradation*, pp. 251-287, 2013.
 47. Ozkara A., Akyil D., Konuk M., Pesticides, Environmental Pollution and Health, in Larramendy M.L., Soloneski S. (Eds), *Environmental Health Risk-Hazardous Factors to Living Species*, pp. 3-27, 2016.
 48. Parrilla Vázquez P., Hakme E., Uclés S., Cutillas V., Martínez Galera M., Mughari A.R., Fernández-Alba A.R., Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1463, pp.20-31, 2016.

49. Pavkovich A.M., Bell D.S., Extraction | QuEChERS, Encyclopedia of Analytical Science (3rd Edition), pp. 84-88, 2019.
50. Perestrelo R., Silva P., Porto-Figueira P., Pereira J.A.M., Silva C., Medina S., Câmara J.S., QuEChERS- Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends, *Analytica Chimica Acta*, 1070, pp. 1-28, 2019.
51. Polgár L., Kmellár B., García-Reyes J.F., Fodor P., Comprehensive evaluation of the clean-up step in QuEChERS procedure for the multi-residue determination of pesticides in different vegetable oils using LC-MS/MS, *Anal. Methods* 4 (4), pp.1142-1148, 2012.
52. Prieto A., Basauri O., Rodil R., Usobiaga A., Fernandez L.A., Etxebarria N., Zuloaga O., Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *Journal of Chromatography A*, 1217, pp. 2642-2666, 2010.
53. Prodhan M.D.H., Alam S.N., Uddin M.J., Analytical Methods in Measuring Pesticides in Foods, In Khan M.S., Rahman M.S. (Eds) *Pesticide Residue in Foods*, pp. 135-145, 2017.
54. Razzaghi N., Ziarati P., Rastegar H., Shoeibi S., Amirahmadi M., Conti G.O., Ferrante M., Fakhri Y., Khaneghah A.M., The concentration and probabilistic health risk assessment of pesticide residues in commercially available olive oils in Iran, *Food and Chemical Toxicology* 120, pp. 32-40, 2018.
55. Rejczak T., Tuzimski T., A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach, *Open Chemistry*, 13, pp. 980-1010, 2015.
56. Salamzadeh J., Shakoori A., Moradi V., Occurrence of multiclass pesticide residues in tomato samples collected from different markets of Iran, *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 16, pp. 55-63, 2018.
57. Santana-Mayor A., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A.V., Rodríguez-Delgado M.A., Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis, *Trends in Analytical Chemistry*, 116, pp. 214-235, 2019.
58. Song S., Zhu K., Han L., Sapozhnikova Y., Zhang Z., Yao W., Residue analysis of 60 pesticides in red swamp crayfish using QuEChERS with high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(20), pp. 5031–5038, 2018.

59. Sobhanzadeh E., Barak N.K.A., Abas M.R., Nemati K., Sample Preparation Methods for Pesticides Analysis in Food Matrices and Environmental Samples by Chromatography-Based Techniques: A review, *Journal of Fundamental Sciences*, Vol.5, No 2, pp. 106-128, 2009.
60. Sparling D.W., Current Use Pesticides in Sparling D.W. (Eds), *Ecotoxicity Essentials: Environmental Contaminants and their biological effects on animals and plants*, pp. 109-152, 2016.
61. Su R., Xu X., Wang X., Li D., Li X., Zhang H., Yu A., Determination of organophosphorus pesticides in peanut oil by dispersive solid phase extraction gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 879(30), pp. 3423-3428, 2011.
62. Tadeo J.L., Sánchez-Brunete C., Albero B., García-Valcárcel A.I., Application of ultrasound-assisted extraction to the determination of contaminants in food and soil samples, *Journal of Chromatography A*, 1217, pp. 2415-2440, 2010.
63. Tiwari B.K., Ultrasound: A clean, green extraction technology, *Trends in Analytical Chemistry* 71, pp. 100-109, 2015.
64. Tsoutsis C., Konstantinou I., Hela D., Organophosphorus pesticide residues in Greek virgin olive oil: levels, dietary intake and risk assessment, *Food Additives and Contaminants*, 25 (10), pp. 1225-1236, 2008.
65. Varela-Martínez D.A., González-Sálamo J., González-Curbelo M.A., Hernández-Borges J., Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Extraction, In C.F. Poole (Eds) *Liquid-Phase Extraction*, pp. 399-437, 2020.
66. Zanella R., Prestes O.D., Friggi C.A., Martins M.L., Adaime M.B., An overview about recent advances in sample preparation techniques for pesticide residues analysis in cereals and feedstuffs, In R.P. Soundararajan (Eds) *Pesticides-Recent Trends in Pesticide Residue Assay*, pp.149-170, 2012.
67. Zhang Z., Dong M., Hao X., Han L., Song S., Yao W., Evaluation of cleanup procedures in pesticide multi-residue analysis with QuEChERS in cinnamon bark, *Food Chemistry*, 276, pp. 140–146, 2019.
68. Zhang Z., Feng M., Zhu K., Han L., Sapozhnikova Y., Lehotay S.J. Multiresidue analysis of pesticides in straw roughage by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 64(31), pp.6091–6099, 2016.

69. Zhang L., Liu S., Cui X., Pan C., Zhang A., Chen F., A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in food, Central European Journal of Chemistry, 10(3), pp. 900-925, 2012.
70. Νάννου Χ.Ι., Σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε φυσικά νερά και ιζήματα, 2018 (διδακτορική διατριβή).
71. www.minagric.gr
72. www.pubchem.gr