



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ»

ΘΕΜΑ

Προσδιορισμός παρασιτοκτόνων σε επιλεγμένα αρωματικά
φυτά (λεβάντα) και
μελέτη της μεταφοράς τους στο αιθέριο έλαιο

ΠΕΤΡΟΥΤΣΑΚΟΥ ΣΟΦΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2024

Πρόλογος

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών σπουδών «Περιβάλλον και Αγροδιατροφή» και στόχος της ήταν ο προσδιορισμός παρασιτοκτόνων σε αποξηραμένη λεβάντα και η μελέτη της μεταφοράς τους στο αιθέριο έλαιο.

Για την πραγματοποίησή της, οφείλω αρχικά να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα κ. Κωσταντίνου Ιωάννη, καθηγητή του τομέα Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, ο οποίος μου ανέθεσε αυτή τη μελέτη, με καθοδήγησε, μου συμπαραστάθηκε και προσέφερε τις γνώσεις και την εμπειρία του σε όλα τα στάδια, από τον αρχικό σχεδιασμό μέχρι τη συγγραφή της.

Ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας που με καλοδέχτηκαν και με βοήθησαν και ιδιαίτερα την κα Κολόκα Ουρανία, που αφιέρωσε πολύ από το χρόνο της, για να μου διευκρινίσει κάθε ερώτηση που παρουσιαζόταν πάνω στις τεχνικές και το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκαν και να με διευκολύνει σε όλα όσα χρειάστηκα.

Ευχαριστώ επίσης την μονάδα Περιβαλλοντικής, Οργανικής και Βιοχημικής Ανάλυσης υψηλής ευκρίνειας Orbitrap – LC – MS για την πρόσβαση στις υπηρεσίες της, χωρίς τις οποίες θα ήταν αδύνατη η πραγματοποίηση της παρούσας εργασίας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την κα Λέκκα Μαρία-Ελένη, καθηγήτρια του τομέα Οργανικής Χημείας και Βιοχημείας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την παραχώρηση του εργαστηρίου, και την υποψήφια διδάκτορα κα Λαζάρου Πολυξένη για την βοήθειά της ώστε να παραχθεί το αιθέριο έλαιο λεβάντας με τη διαδικασία της υδραπόσταξης.

Περίληψη

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε ο προσδιορισμός διάφορων φυτοπροστατευτικών ουσιών στην αποξηραμένη λεβάντα και στο αιθέριο έλαιο που προκύπτει από αυτή .

Για την απομόνωση των παρασιτοκτόνων από τη λεβάντα χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση QuEChERS. Για τον ποιοτικό και ποσοτικό τους προσδιορισμό, τόσο στο εκχύλισμα όσο και στο αιθέριο έλαιο λεβάντας, χρησιμοποιήθηκε υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής αποδόσεως (UHPLC) σε σύζευξη με σύστημα φασματομετρίας μάζας με θετικό ιονισμό, που αποτελούνταν από γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) και αναλυτή τροχιακής παγίδας Orbitrap και συνυπολογίσθηκαν ο χρόνος κατακράτησης (R_t), η ακριβής μάζα των ψευδομοριακών ιόντων και οι ακριβείς μάζες των θυγατρικών ιόντων MS^2 .

Για την αποξηραμένη λεβάντα ελέγχθηκε η γραμμικότητα της μεθόδου και βρέθηκε $r^2 > 0,99$ σε κάθε περίπτωση. Ελέγχθηκε επίσης η ανάκτηση σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και βρέθηκε από 51,2% ως 106,6%. Η ακρίβεια της μεθόδου, ελέγχθηκε ως προς την επαναληψιμότητα (% RSD_r) που βρέθηκε $\leq 19,6$ σε κάθε περίπτωση, και την αναπαραγωγιμότητα (% RSD_R) που βρέθηκε $\leq 18,4$ σε κάθε περίπτωση, ομοίως. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βρέθηκαν μεταξύ 2,6 - 4,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και 7,9 -16,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ αντίστοιχα. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του υποστρώματος στην απόκριση των φυτοπροστατευτικών ουσιών, και βρέθηκε χαμηλή για το 30% των παρασιτοκτόνων, και μέση για το υπόλοιπο 70%.

Στο αιθέριο έλαιο, για τη γραμμικότητα της μεθόδου βρέθηκε $r^2 > 0,99$ σε κάθε περίπτωση και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεταξύ 1,4-6,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και 4,3-19,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ αντίστοιχα. Η επίδραση του υποστρώματος ήταν χαμηλή στην απόκριση του 40% των φυτοπροστατευτικών ουσιών, μέση στο 50% και υψηλή στο 10%.

Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των προς μελέτη φυτοπροστατευτικών ουσιών σε δέκα δείγματα αποξηραμένης λεβάντας που προμηθευτήκαμε από το εμπόριο. Δεν ανιχνεύθηκε κανένα από τα συγκεκριμένα παρασιτοκτόνα.

Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της υδραπόσταξης τρία δείγματα αιθέριου ελαίου από ισάριθμα δείγματα αποξηραμένης λεβάντας που είχαν εμβολιαστεί με παρασιτοκτόνα σε συγκεντρώσεις 10, 50 και 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ αντίστοιχα και μελετήθηκε η μεταφορά των παρασιτοκτόνων από τη λεβάντα στο αιθέριο έλαιο και στο υδρόλυμα. Στο

αιθέριο έλαιο ανιχνεύθηκε ένα από τα είκοσι παρασιτοκτόνα που μελετήθηκαν και η μεταφορά υπολογίστηκε σε ποσοστό μεταξύ 20,4% και 22,9%, ενώ κανένα δεν ανιχνεύθηκε στο υδρόλυμα.

Abstract

In this study, the determination of various plant protection substances in dried lavender and in the essential oil obtained from it was carried out.

QuEChERS extraction was used to isolate the pesticides from lavender. Both the lavender extract and the essential oil were submitted to ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) combined with a positive ionization mass spectrometry system, consisting of a linear ion trap (LTQ) and an Orbitrap orbital trap analyzer for the qualitative and quantitative determination, of the pesticides. Results were obtained considering the retention time (Rt), and the exact masses of the precursor and the product ions.

For dried lavender the linearity of the method was calculated, and the coefficient of determination (r^2) was found higher than 0.99 in every case. Two spiking concentration levels, 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ were used to check the recovery which varied from 51.2% to 106.6% in all cases. The precision of the method was checked for repeatability (%RSD_r) which was less than 19.6% in every case, and reproducibility (%RSD_R) that was less than 18.4 in every case. Limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) varied among 2.6 - 4.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 7.9 -16.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively. The matrix effect was also studied and was found to be low for 30% of pesticides, and medium for the rest 70%.

Regarding the essential oil, the coefficient of determination (r^2) was found higher than 0.99 in every case too, and the limits of detection and quantification were between 1.4-6.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ and 4.3-19.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. The matrix effect was low for 40% of the pesticides, medium for 50% and high for the rest 10%.

The method was used for the detection and determination of pesticides in ten samples of dried lavender obtained from the trade. None of the pesticides we were studying was detected.

Three samples of essential oil were prepared by hydrodistilling three samples of dried lavender that had been spiked with pesticides at concentrations of 10, 50 and 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectively, to study the transfer of the pesticides from the lavender to the essential oil and the hydrosol. Only one, out of the twenty studied pesticides, was detected in the essential oil and the transfer was estimated to be between 20.4% and 22.9%, while none was detected in the hydrosol.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή : Αρωματικά φυτά.....	10
1. Λεβάντα	11
1.1. Γενικά	11
1.2. Χημική σύσταση.....	12
1.3. Χρήσεις.....	15
2. Αιθέρια έλαια	18
2.1. Γενικά	18
2.2. Μέθοδοι Παραλαβής αιθέριων ελαίων-Απόσταξη	20
2.2.1. Υδροαπόσταξη.....	20
2.2.2. Απόσταξη με υδρατμούς.....	21
2.3. Μέθοδοι παραλαβής αιθέριων ελαίων – εκχύλιση	24
2.3.1. Εκχύλιση με νερό.....	24
2.3.2. Εκχύλιση με ψυχρό λίπος.....	24
2.3.3. Εκχύλιση με θερμό λίπος	25
2.3.4. Εκχύλιση με διαλύτες.....	25
2.3.5. Υδατική Εκχύλιση με ζύμωση.....	26
2.3.6. Εκχύλιση Soxhlet	27
2.3.7. Εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (SPE)	28
2.4. Μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων – Μηχανική παραλαβή.....	29
2.5. Τεχνολογίες εντατικοποίησης των διαδικασιών παραλαβής αιθέριων ελαίων	30
2.5.1. Εκχύλιση με ρευστά υπό πίεση.....	30
2.5.2. Εκχύλιση με υπερήχους	30
2.5.3. Εκχύλιση με μικροκύματα.....	32
2.5.4. Εκχύλιση κατ’ αντιρροή.....	33
2.5.5. Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία	33
3. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα	35
3.1. Γενικά	35
3.2. Υπολείμματα φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον.....	39
3.3. Μέγιστα όρια υπολειμμάτων (MRL).....	40
3.4. Προστασία της καλλιέργειας λεβάντας	43
4. Μέθοδοι προσδιορισμού φυτοφαρμάκων.....	45
4.1. Απομόνωση φυτοφαρμαμάκων από το υπόστρωμα	45
4.1.1. Εκχύλιση υγρού - υγρού.....	45
4.1.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης (υγρού-στερεού)	47
4.1.3. Εκχύλιση με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση.....	48

4.1.4.	Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης	50
4.1.5.	Εκχύλιση QuEChERS	52
4.2.	Χρωματογραφία.....	58
4.2.1.	Αέρια Χρωματογραφία.....	60
4.2.2.	Υγρή χρωματογραφία.....	62
4.2.3.	Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (ή Απόδοσης - HPLC)	64
4.2.4.	Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC)	65
4.3.	Φασματογραφία μάζας	66
4.3.1.	Φασματογράφος μάζας	67
4.3.2.	Πηγές ιοντισμού	68
4.3.3.	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)	70
4.3.4.	Αναλυτές μαζών	71
4.3.5.	Υβριδικός αναλυτής μαζών γραμμικής-τροχιακής παγίδας ιόντων (LTQ-Orbitrap)	73
4.4.	Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (UHPLC-hybrid LTQ/Orbitrap).....	76
4.5.	Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)	77
5.	Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε αποξηραμένη λεβάντα.....	78
5.1.	Πρότυπες ουσίες - διαλύτες - αντιδραστήρια - υλικά - όργανα – συσκευές	78
5.1.1.	Πρότυπες ενώσεις παρασιτοκτόνων.....	78
5.1.2.	Διαλύτες	78
5.1.3.	Αντιδραστήρια.....	78
5.1.4.	Υλικά	78
5.1.5.	Όργανα – συσκευές.....	79
5.2.	Προετοιμασία υποστρώματος λεβάντας.....	79
5.3.	Εκχύλιση φυτοφαρμάκων από αποξηραμένη λεβάντα με τη μέθοδο QuEChERS.....	80
5.4.	Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης UHPLC (LTQ) Orbitrap.....	82
5.5.	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε αποξηραμένη λεβάντα.....	84
5.6.	Επίδραση υποστρώματος αποξηραμένης λεβάντας	84
5.7.	Στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου	86
5.7.1.	Γραμμικότητα	86
5.7.2.	Ορθότητα -Πιστότητα.....	87
5.7.3.	Προσδιορισμός ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης	88
5.8.	Μελέτη προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε δείγματα αποξηραμένης λεβάντας του εμπορίου	90

6. Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε αιθέριο έλαιο λεβάντας	91
6.1. Πρότυπες ουσίες - διαλύτες - αντιδραστήρια - υλικά - όργανα – συσκευές	91
6.1.1. Πρότυπες ενώσεις παρασιτοκτόνων.....	91
6.1.2. Διαλύτες	91
6.1.3. Αντιδραστήρια.....	91
6.1.4. Υλικά	91
6.2. Προετοιμασία για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε δείγματα αιθέριου ελαίου λεβάντας	92
6.3. Επίδραση υποστρώματος αιθέριου ελαίου λεβάντας	94
6.4. Στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου	96
6.4.1. Γραμμικότητα - μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση	96
6.4.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LOD-LOQ).....	96
6.5. Παρασκευή δειγμάτων αιθέριου ελαίου λεβάντας από φυτικό υλικό	98
6.6. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα δείγματα αιθέριου ελαίου που παρασκευάστηκαν με υδραπόσταξη	99
6.7. Ποιοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα δείγματα υδρολύματος που παρασκευάστηκαν με υδραπόσταξη	102
Συμπεράσματα	104
Αναφορές	106

Πίνακας 1: Ενδεικτικός πίνακας συστατικών του αιθέριου ελαίου της λεβάντας και ορισμένων δράσεών τους.....	17
Πίνακας 2: Προστασία της καλλιέργειας της λεβάντας.....	44
Πίνακας 3: Οι οδηγίες σύμφωνα με τη μέθοδο CEN για την προσθήκη νερού σε εμπορεύματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό	58
Πίνακας 4: Διαφορές μεταξύ HPLC και UHPLC	65
Πίνακας 5: Κύριες τεχνικές ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας	69
Πίνακας 6: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των κυριότερων τεχνικών ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας	70
Πίνακας 7: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διαφόρων ειδών φασματογράφων μάζας.....	75
Πίνακας 8: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης του συστήματος UHPLC/LTQ-ORBITRAP.....	82
Πίνακας 9 : Οι συνθήκες των παραμέτρων των συστημάτων ESI και LTQ-ORBITRAP XL.....	83
Πίνακας 10: Επίδραση υποστρώματος εκχυλίσματος αποξηραμένης λεβάντας.....	85
Πίνακας 11:Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου: Γραμμικότητα (Linearity r^2) Όρια ανίχνευσης (LODs), όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), μέσες ανακτήσεις (REC) (%) και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) (%) δύο διαφορετικών επιπέδων ($n = 6$), για υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε αποξηραμένη λεβάντα.	89
Πίνακας 12 : Χρόνοι κατακράτησης (R_t), θεωρητικές και πειραματικές μάζες και σχετικό σφάλμα μαζών (Mass Accuracy) των ψευδο-μοριακών ιόντων και θυγατρικά ιόντα (Frangmentation ions) κατά τον θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων στο σύστημα UHPLC/LTQ-ORBITRAP	93
Πίνακας 13: Επίδραση υποστρώματος αιθέριου ελαίου λεβάντας	94
Πίνακας 14: Εξίσωση ευθείας βαθμονόμησης φυτοφαρμάκου σε υπόστρωμα αιθέριο έλαιο λεβάντας, γραμμικότητα (Linearity r^2) , όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης και μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση	97
Πίνακας 15 :Διαλυτότητα, τάση ατμών και $\log K_{ow}$ των παρασιτοκτόνων	103

Εικόνα 1: Εξάπλωση του γένους Lavandula	12
Εικόνα 2: Ισοπρένιο	13
Εικόνα 3: Χαρακτηριστικά συστατικά του αιθέριου ελαίου λεβάντας	14
Εικόνα 4: Συσκευή Clevenger	20
Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση απόσταξης με υδρατμούς -Διάταξη Α	22
Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση απόσταξης με υδρατμούς Διάταξη Β.....	23
Εικόνα 7: Εκχύλιση με ψυχρό λίπος.....	25
Εικόνα 8: Κριτήρια που επηρεάζουν την επιλογή διαλύτη	26
Εικόνα 9: Συσκευή Soxhlet	27
Εικόνα 10: Διάγραμμα φάσεων CO ₂	28
Εικόνα 11: Μηχανήματα μηχανικής παραλαβής αιθέριων ελαίων.....	29
Εικόνα 12: Αρχή της εκχύλισης με υπερήχους.....	31
Εικόνα 13: Μηχανισμός εκχύλισης με μικροκύματα	32
Εικόνα 14 : Εκχύλιση υγρού-υγρού.....	45
Εικόνα 15: Εκχύλιση στερεάς φάσης	47
Εικόνα 16: Σχηματική παρουσίαση μιας τυπικής εκχύλισης MSPD	49
Εικόνα 17: Σχηματική παρουσίαση εκχύλισης SPME	51
Εικόνα 18: Είδη τριχοειδούς στήλης αέριας χρωματογραφίας.....	61
Εικόνα 19: Διαχωρισμός της οργανικής φάσης, που περιέχει τις φυτοπροστατευτικές ουσίες, από την υδατική.....	80
Εικόνα 20: Καθαρισμός της οργανικής φάσης από τα πολικά συστατικά του υποστρώματος	80
Εικόνα 21: Πειραματική διάταξη υδραπόσταξης λεβάντας	98
Εικόνα 22 :Ανίχνευση του ψευδομορικού ιόντος C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS ⁺ που αντιστοιχεί στο Diazinon	101
Εικόνα 23: Ανίχνευση των θυγατρικών ιόντων που προκύπτουν από τη διάσπαση του Diazinon ..	101

Σχήμα 1:Σχηματική αναπαράσταση των τριών σημαντικότερων παραλλαγών της μεθόδου QuEChERS (Original QuEChERS Method, AOAC 2007.01 Official Method, EN 15662 The European Official Method) και των σταδίων εκχύλισης, καθαρισμός και ανάλυσης	57
Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση συστήματος αέριας χρωματογραφίας	60
Σχήμα 3: Τμήματα φασματογράφου μαζών με τις κυριότερες τεχνικές κάθε σταδίου	68
Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση του υβριδικού φασματογράφου μάζας LTQ-Orbitrap.....	73
Σχήμα 5: Διαδικασία εκχύλισης φυτοφαρμάκων από δείγματα αποξηραμένης λεβάντας με την μέθοδο QuEChERS.....	81
Σχήμα 6: Επίδραση υποστρώματος εκχυλίσματος αποξηραμένης λεβάντας	86
Σχήμα 7: Παράδειγμα επίδρασης υποστρώματος εκχυλίσματος σε MeCN αποξηραμένης λεβάντας στο diazinon	86
Σχήμα 8: Επίδραση υποστρώματος αιθέριου ελαίου λεβάντας.....	95
Σχήμα 9 : Παράδειγμα επίδρασης υποστρώματος αιθέριου ελαίου λεβάντας αραιωμένο με διαλύτη CH ₃ OH που περιείχε CH ₃ COOH 1% σε αναλογία έλαιο : διαλύτης = 1:9, στο diazinon	95
Σχήμα 10: Φυτοπροστατευτικές ουσίες σε σχέση με τη διαλυτότητα και την τάση ατμών	103

Εισαγωγή : Αρωματικά φυτά

Ο ελλαδικός χώρος χαρακτηρίζεται από ιδιαίτερη ποικιλομορφία όσον αφορά τα τοπία και τα διάφορα οικοσυστήματα που αναπτύσσονται σε αυτά. Στο ιδιαίτερα πλούσιο φυσικό περιβάλλον έχουν καταγραφεί πάνω από 7800 είδη και υποείδη φυτών, με σχεδόν το 20% να είναι ενδημικά σύμφωνα με την καταγραφή του 2018 [1].

Η σύνδεση των ανθρώπων με τα φυτά στην καθημερινότητα είναι τεράστια, καθώς, πέρα από τα εδώδιμα είδη, χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές, ως καλλωπιστικά, για τη δημιουργία διαφόρων κατασκευών, για την παρασκευή βαφών, ενώ κάποια από αυτά είναι στενά συνδεδεμένα με την παράδοση και κάποιες τελετουργίες.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα αρωματικά φυτά. Πάνω από 1500 είδη ανήκουν σε αυτή την κατηγορία, η οποία περιλαμβάνει τα φυτά που σε κάποιους ιστούς τους παράγουν αιθέρια έλαια τα οποία τους προσδίδουν χαρακτηριστικό άρωμα. Το σύνολο των αρωματικών φυτών έχει και φαρμακευτικές ιδιότητες (ενώ υπάρχουν φαρμακευτικά φυτά που δεν ανήκουν στην κατηγορία των αρωματικών), αυτή δε η χρήση τους είναι γνωστή ήδη από την εποχή του Ιπποκράτη [2].

Σήμερα, η καλλιέργεια των αρωματικών φυτών αυξάνει, καθώς αυξάνει το ενδιαφέρον για τις διάφορες εφαρμογές τους. Οι καλλιέργειες αυτές μπορούν να συμβάλλουν στην οικονομική ανάπτυξη αγροτικών περιοχών, κυρίως άγονων και με φτωχό υδροφόρο ορίζοντα, καθώς έχουν μικρές απαιτήσεις σε σχέση με άλλα φυτά σε νερό, λίπανση, φυτοπροστασία και κατεργασία του εδάφους. Ως εκ τούτου, οι αποδόσεις τους να είναι πιο κερδοφόρες.

Επίσης, οι καλλιέργειες των αρωματικών φυτών βοηθά στον περιορισμό της παράνομης συλλογής και, κατά συνέπεια, συμβάλλει στην προστασία της χλωρίδας, κυρίως των ειδών που οι πληθυσμοί τους είναι μικροί και κινδυνεύουν περισσότερο [2].

Οι παραπάνω λόγοι οδήγησαν στη σύσταση ενός εθνικού σχεδίου ανάπτυξης για την καλλιέργεια, επεξεργασία και εμπορία των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών, από το 2017.

Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και τροφίμων, για το έτος 2021, οι δέκα μεγαλύτερες σε έκταση καλλιέργειες αρωματικών φυτών στην Ελλάδα ήταν κατά φθίνουσα σειρά αυτές της ρίγανης, της λεβάντας, των μαστιχόδεντρων, του ιπποφαούς, του τσαγιού, του κρόκου, του μάραθου, της αρώνιας, του γλυκάνισου, και του θυμαριού.

1. Λεβάντα

1.1. Γενικά

Στο γένος *Lavandula* (οικ. *Lamiaceae* -Χειλανθή) σήμερα αναγνωρίζονται τριάντα εννέα είδη που βρίσκονται διασπαρμένα σε ολόκληρο τον κόσμο ενώ δημιουργούνται υβρίδια και επιχειρείται η αύξηση της απόδοσης και της ποιότητας των ελαίων σε αυτά τα φυτά μέσω της γενετικής μηχανικής [3]. Προερχόμενα από τις χώρες της Μεσογείου, εξαπλώθηκαν από τα Κανάρια Νησιά στα νησιά του Πράσινου Ακρωτηρίου και στη Μαδέιρα, τη Νοτιοανατολική Ασία, την Αραβική Χερσόνησο και την τροπική Βορειοανατολική Αφρική (Εικ. 1) [4]. Σήμερα, λόγω του οικονομικού τους ενδιαφέροντος, καλλιεργούνται επίσης στη Βουλγαρία, το Ηνωμένο Βασίλειο, την Κίνα, την Αυστραλία και τις Ηνωμένες Πολιτείες [3].

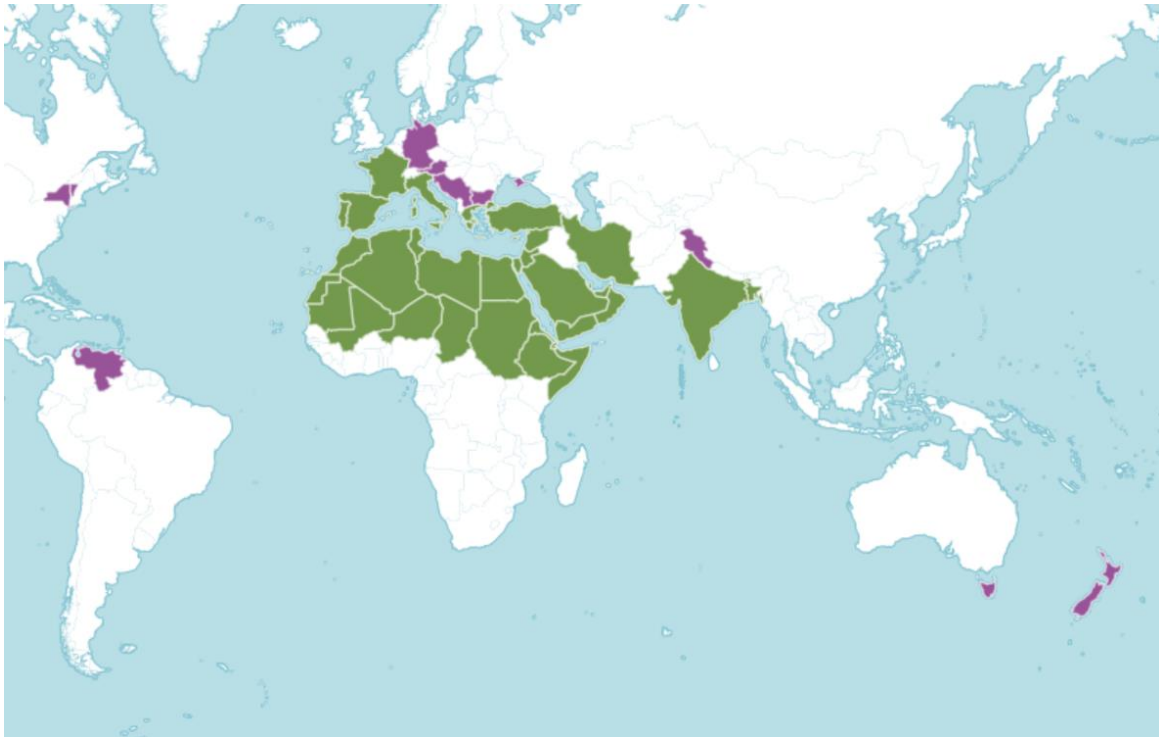
Η λεβάντα είναι γνωστή, από τους αρχαίους χρόνους. Τα πρώτα γραπτά στα οποία αναφέρεται ανήκουν στην Αρχαία Ελληνική Γραμματεία, (Θεόφραστος 370-285 π.Χ.), το δε όνομα προέρχεται από το Λατινικό *Lavare* (πλένομαι), καθώς τα άνθη της χρησιμοποιούνταν για να αρωματίζει το νερό στα δημόσια λουτρά και για την πλύση – απολύμανση των ρούχων του ρωμαϊκού στρατού [5].

Είναι πολυετής θάμνος και αποτελεί μια συνηθισμένη επιλογή για τη διαμόρφωση των εξωτερικών χώρων [6]. Καλλιεργείται όμως κυρίως για τα άνθη του, που χρησιμοποιούνται κυρίως αποξηραμένα, καθώς και για την παραγωγή αιθέριου ελαίου.

Πιο συχνά χρησιμοποιούνται οι *L. angustifolia* (στενόφυλλος), *L. latifolia* (πλατύφυλλος) και το μεταξύ τους υβρίδιο *L. x intermedia* [3] [7], ενώ ερευνάται η δυνατότητα χρησιμοποίησης και άλλων ειδών. Στην Ελλάδα, συναντάται συχνά το είδος *Lavandula stoechas* (Λεβάντα η στοιχάς), της οποίας κάποιες κοινές ονομασίες είναι: αγριολεβάντα, λαβαντή, χαμολίβανο, μυροφόρα, καραμπάσι και αβαγιανός [8]

Οι περισσότερες ποικιλίες *L. x intermedia* (π.χ. *Grosso*) παράγουν μεγάλη βιομάζα με υψηλές αποδόσεις λουλουδιών και ελαίων και συνήθως προτιμώνται για μεγιστοποίηση της παραγωγής. Οι ποικιλίες *L. angustifolia* (π.χ. *Hidcote*) δίνουν χαμηλότερες αποδόσεις λουλουδιών και ελαίων, με υψηλότερη ποιότητα των ελαίων [3]. Τα φαινοτυπικά χαρακτηριστικά όπως και η παραγωγή και η σύνθεση αιθέριων ελαίων τόσο των καλλιεργούμενων ποικιλιών, όσο και των άγριων πληθυσμών, ακόμη και αν ανήκουν στο ίδιο είδος, παρουσιάζουν διακυμάνσεις. Αυτό οφείλεται στο ότι επηρεάζονται από διάφορα περιβαλλοντικά στοιχεία, όπως ο τύπος του εδάφους, η θερμοκρασία, το φως, η υγρασία, το

υψόμετρο, τα λιπάσματα, η εποχή του χρόνου κλπ. [3] [4]. Η σύσταση του αιθέριου ελαίου εξαρτάται, πέρα από τα παραπάνω, και από τη μέθοδο παραλαβής [9].



Εικόνα 1: Εξάπλωση του γένους *Lavandula*

■ Ενδημικό [7]
■ Εισαγόμενο

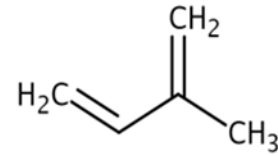
1.2. Χημική σύσταση

Τα φύλλα και τα άνθη, παρά τις διαφορές από είδος σε είδος, περιέχουν τριτερπενικά παράγωγα, κουμαρίνες (κουμαρίνη, ομπελλιφερόνη, ερνιαρίνη), φαινολοξέα (ροσμαρινικό οξύ). Τα άνθη είναι πλούσια σε ταννίνες, σε ανθοκυάνες και σε αιθέριο έλαιο [10]. Έχουν βρεθεί πάνω από 150 πτητικά συστατικά στη *L. angustifolia*, στη *L. latifolia* και στο υβρίδιό τους, πολλά από τα οποία σε ελάχιστη ποσότητα [11]. Τα κύρια συστατικά του αιθέριου ελαίου είναι τερπενικοί υδρογονάνθρακες (ωκυμένιο, καμπφένιο, καρυοφυλλένιο), μονοτερπενικές αλκοόλες (λιναλοόλη, γερανιόλη, βορνεόλη, 1,8-κινεόλη) κ.λπ. [10].

Τα τερπένια είναι σχετικά μικρές οργανικές ενώσεις της κατηγορίας των λιπιδίων. Εμφανίζουν ποικιλομορφία δομής και θεωρούνται ως «πολυμερή του ισοπρενίου». Η

ταξινόμηση των τερπενίων πραγματοποιείται με βάση τον αριθμό των ισοπρενικών μονάδων σε

- α) Ημιτερπένια (1 μονάδες ισοπρενίου, 5 άτομα άνθρακα)
- β) Μονοτερπένια (2 μονάδες ισοπρενίου, 10 άτομα άνθρακα)
- γ) Σεσκιτερπένια (3 μονάδες ισοπρενίου, 15 άτομα άνθρακα)
- δ) Διτερπένια (4 μονάδες ισοπρενίου, 20 άτομα άνθρακα)
- ε) Σεστερτερπένια (5 μονάδες ισοπρενίου, 25 άτομα άνθρακα)
- στ) Τριτερπένια (6 μονάδες ισοπρενίου, 30 άτομα άνθρακα)



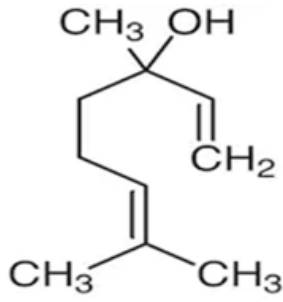
Εικόνα 2: Ισοπρένιο

Τα χημικώς τροποποιημένα τερπένια ονομάζονται τερπενοειδή. Η αναδιαμόρφωση της δομής των τερπενίων μπορεί να προκύψει με οξείδωση, αναδιάταξη του ανθρακικού σκελετού κ.λπ. [12] οπότε και παράγονται αιθέρες, αλκοόλες κ.α.

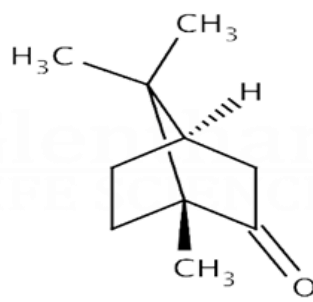
Η διάκριση μεταξύ των διάφορων ποικιλιών αιθέριου ελαίου λεβάντας γίνεται με βάση την περιεκτικότητά τους σε οξικό λιναλυλεστέρα, λιναλουόλη, 1,8-κινεόλη και καμφορά [10]. Τα είδη με χαμηλή περιεκτικότητα σε καμφορά, έχουν υψηλά επίπεδα τερπενίων και το αντίστροφο. Τα πρώτα χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία για την παρασκευή αρωμάτων και καλλυντικών, ενώ τα δεύτερα, χρησιμοποιούνται ως εντομοαπωθητικά και για μη αρωματικές χρήσεις [13]

Υπάρχουν όμως και συστατικά που απαντώνται σε πολύ περιορισμένη έκταση μεταξύ των ειδών της λεβάντας, όπως ο οξικός νεκροδυλεστέρας, ο οποίος έχει εντοπιστεί μόνο στη *L. stoechas* υποείδος *luisieri* και έχει αναφερθεί παλαιότερα μόνο σαν έκκριση του σκαθαριού *Nicrodes surinamensis* [14]

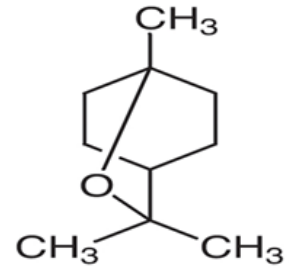
Για την παραλαβή αιθέριου ελαίου λεβάντας, χρησιμοποιείται συχνά η υδραπόσταξη, κατά την οποία παραλαμβάνεται και υδρόλυμα. Τα υδρολύματα έχουν πιο απαλή οσμή από τα αιθέρια έλαια. Όσο μεγαλύτερη ποσότητα υδρολύματος παραλαμβάνουμε, τόσο το αρωματικό του προφίλ απομακρύνεται από αυτό του ελαίου. Όσον αφορά τουλάχιστον τη *L. angustifolia*, τα κυριότερα συστατικά του υδρολύματος είναι η λιναλουόλη, το οξείδιο της λιναλουόλης, η βορνεόλη και η α-τερπινεόλη ενώ δεν υπάρχουν αιθανικός λιναλυλεστέρας ή μονοτερπένια [15]. Βρέθηκαν ακόμη, καφεϊκό και φερουλικό οξύ ως τα κύρια φαινολικά οξέα και αστραγαλίνη, λουτεολίνη και ισοκερσετίνη ως τα κύρια φλαβονοειδή [16].



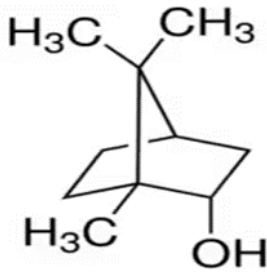
Λιναλούλη [17]



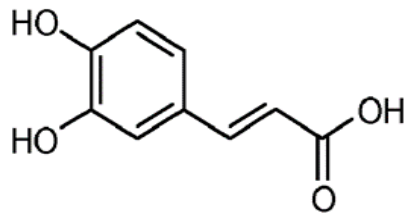
Καμφορά [17]



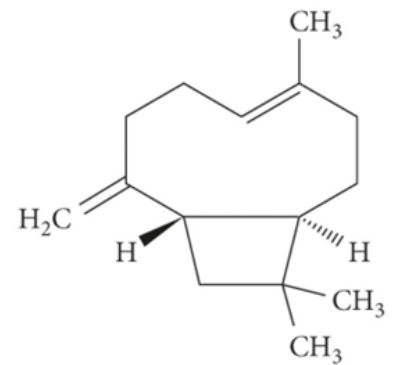
1,8- κινεόλη [18]



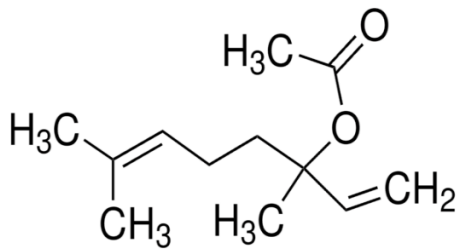
Βορνεόλη [19]



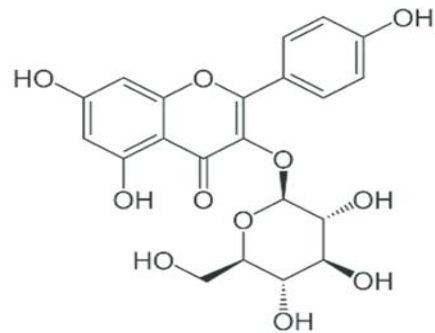
Καφεϊκό οξύ [20]



καρυοφυλλένιο [21]



Αιθανικός λιναλυλεστέρας [19]



αστραγαλίνη [21]

Εικόνα 3 : Χαρακτηριστικά συστατικά του αιθέριου ελαίου λεβάντας

1.3. Χρήσεις

Η χρήση της λεβάντας ήταν διαδεδομένη και σε άλλους λαούς εκτός από τους Έλληνες και τους Ρωμαίους. Οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν τα λουλούδια της στη διαδικασία της ταρίχευσης. Κατά τη διάρκεια του Μεσαίωνα και της Αναγέννησης χρησίμευε, όπως και σήμερα, στην αποθήκευση των φρεσκοπλυμένων ρούχων. Στην Κίνα, χρησιμοποιούνταν παραδοσιακά για την αντιμετώπιση της στειρότητας, διάφορων λοιμώξεων, του άγχους και του πυρετού. Οι Άραβες τη θεώρησαν αποτελεσματική για την αντιμετώπιση των πόνων στο στομάχι και των προβλημάτων των νεφρών. Κατά τη βικτωριανή εποχή, η λεβάντα χρησιμοποιήθηκε ως αφροδισιακό. Σύμφωνα με τις διάφορες λαϊκές παραδόσεις το φυτό χρησιμοποιήθηκε και για πλήθος άλλους ιατρικούς σκοπούς όπως η τριχόπτωση και ο ίλιγγος [5] αλλά και ως βοηθητικό για τον ύπνο [10]. Εκχυλίσματά της έχουν χρησιμοποιηθεί για την αύξηση των εκκρίσεων της χολής, για την αντιμετώπιση των κισμών και την ανακούφιση πόνων προερχόμενων από το καρπικό σύνδρομο [5].

Η λεβάντα χρησιμοποιείται επί αιώνες στην βιομηχανία καλλυντικών για το ευχάριστο άρωμά της σε προϊόντα όπως ενυδατικές κρέμες, αντηλιακά, λοσιόν, σαμπουάν, προϊόντα μπάνιου και σώματος, σαπούνια και αρώματα [3].

Σε μικρές ποσότητες, χρησιμοποιείται για να αρωματίσει ροφήματα ή φαγητά [9].

Είναι πολύ χρήσιμη στην αρωματοθεραπεία, έχοντας αποδειχτεί ότι το αιθέριο έλαιό της

- α) Βελτιώνει την ποσότητα και την ποιότητα του ύπνου σε άτομα τα οποία εμφανίζουν διαταραχές ύπνου όταν εισπνέεται ή εφαρμόζεται τοπικά.

- β) Ελαττώνει το άγχος και αυξάνει το βαθμό χαλάρωσης όταν προστίθεται στο νερό του μπάνιου, σε όλες τις ηλικίες, από τα βρέφη ως τους ενήλικες.

- γ) Εμφανίζει αγχολυτική και αντικαταθλιπτική επίδραση μετά από χορήγηση, τόσο με εισπνοή όσο και κατάποση.

- δ) Έχει επιδείξει θετικά αποτελέσματα στις καρδιακές παθήσεις, λόγω της αυξημένης χαλάρωσης, της μείωσης των επιπέδων κορτιζόλης στον ορό και της αυξημένης στεφανιαίας κυκλοφορίας.

- ε) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως αναλγητικό σε γυναίκες που αντιμετωπίζουν δυσμηνόρροια, κατά τη διάρκεια του τοκετού και σε γυναίκες που έχουν υποστεί καισαρική τομή

Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου της λεβάντας, δίνουν τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί επίσης, ως αποτελεσματική εναλλακτική λύση στις συμβατικές φαρμακευτικές αγωγές, ενώ οι αντιφλεγμονώδεις του ιδιότητες το καθιστούν μια πολλά υποσχόμενη πιθανή πηγή δραστικών ουσιών, ικανών να δράσουν σε διάφορα σημεία του μηχανισμού δημιουργίας φλεγμονής, ακόμα και να μειώσουν την ανοσολογική απόκριση σε περίπτωση αλλεργίας.

Ωστόσο, υπάρχουν περιπτώσεις ατόμων που εμφάνισαν δερματίτιδες μετά από τη χρήση καλλυντικών προϊόντων γεγονός που οφείλεται στο ότι η λιναλουόλη και ο οξικός λιναλιλεστέρας που είναι ασθενή αλλεργιογόνα και βρίσκονται σε μεγάλη περιεκτικότητα στο αιθέριο έλαιο της λεβάντας, αμέσως μετά την επαφή τους με τον αέρα οξειδώνονται σε ισχυρότερα αλλεργιογόνα. Είναι, κατά συνέπεια, απαραίτητη η σχετική σήμανση στα αντίστοιχα προϊόντα [3]

Η επιλογή του αιθέριου ελαίου για φαρμακευτική χρήση ή για μελέτη των πιθανών δραστικών ουσιών, γίνεται ακόμα πιο πολύπλοκη εφ' όσον πρέπει να λάβουμε υπ' όψιν μας αφ' ενός τη συνεργατική δράση των συστατικών του [22], αφ' ετέρου το γεγονός ότι ακόμη και σε φυτά του ίδιου υποείδους υπάρχουν διαφορετικοί χημειότυποι [23].

Εξ' αιτίας των αντιβακτηριακών και μυκητοτοξικών ιδιοτήτων του, ερευνάται επίσης η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί σαν συντηρητικό τόσο για τα τρόφιμα όσο και για τα καλλυντικά.

Το υδρόλυμα, εμφανίζει και αυτό αντιοξειδωτικές και αντιμυκητιακές ιδιότητες και θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί στην ανάπτυξη νέων προϊόντων για την αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών ενώ παράλληλα, επειδή αποσυντίθεται γρήγορα και δεν είναι τοξικό για το περιβάλλον, θα ήταν ιδανικό για οικολογικές καλλιέργειες [16].

Υπάρχει επίσης η δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί και σαν συντηρητικό στα καλλυντικά, όχι μόνο επειδή θα μπορούσε να επεκτείνει το χρόνο ζωής τους λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών και αντιμυκητιακών του ιδιοτήτων, αλλά και επειδή δεν χρειάζονται διάλυση, με αποτέλεσμα η επιλογή του να είναι οικονομικά και περιβαλλοντικά συμφέρουσα [3].

Πίνακας 1: Ενδεικτικός πίνακας συστατικών του αιθέριου ελαίου της λεβάντας και ορισμένων δράσεών τους

Συστατικό		Δράση
Μονοτερπένια	α-πινένιο	Αντιμυκητιακή, εντομοκτόνος [9], αντιφλεγμονώδης, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή [24]
	β-πινένιο	Αντιμυκητιακή [9] αντιφλεγμονώδης, αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή [24]
	καμφένιο	Εντομοκτόνος [9] αντιβακτηριακή, Αντιμυκητιακή, αντικαρκινική, αντιφλεγμονώδης [25]
	καμφορά	Αντιβακτηριακή, Αντιμυκητιακή [9]
	λιμονένιο	Αντιμυκητιακή, εντομοκτόνος [9], αντιμικροβιακή [26]
	p-κιμένιο	Αντιμυκητιακή [9]
	σαβινένιο	Αντιφλεγμονώδης [27]
τερπινένιο	Αντιμικροβιακή [28]	
Μονοτερπενικές αλκοόλες	α-τερπινεόλη	Αντιβακτηριακή [9]
	βορνεόλη	Αντιφλεγμονώδης, αντιοξειδωτική [29]
	λεβαντουλόλη	Λειτουργεί ως φερομόνη. Χρησιμοποιείται για την προστασία των φυτών από έντομα [30]
	λιναλοόλη	Καταπραϋντική, Αντιμυκητιακή, εντομοκτόνος, αναλγητική [9], αντιμικροβιακή [28]
	Trans-πινοκαρβεόλη	Ζιζανιοκτόνος [31]
Μονοτερπενικές αλδεΐδες	Κουμινική αλδεΐδη	Νευροπροστατευτική, βελτιώνει τη μνήμη [32]
Μονοτερπενικοί αιθέρες	1,8 κυνεόλη (ευκαλυπτόλη)	Αντιμυκητιακή, αντιβακτηριακή [9], αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική [33]
Μονοτερπενικοί εστέρες	Οξικός λιναλυλεστέρας,	καταπραϋντική [9],
Μονοτερπενικές κετόνες	Καρβόνη	Αντιμυκητιακή, αντιβακτηριακή, αντιοξειδωτική, αντιπαρασιτική αντιφλεγμονώδης, αντικαρκινική [34]
	Κρυπτόνη	Αντιβακτηριακή [35]
	Φεντσόνη	Αντιφλεγμονώδης, αντιμικροβιακή [36]
Αρωματικά	Ευγενόλη	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αναλγητική, αναισθητική (τοπικά) [37]
	Κουμαρίνη	Αντιφλεγμονώδης, αντιπυρετική [38]
	Καβακρόλη	Αντιμικροβιακή, αντιοξειδωτική, αντικαρκινική [39]
	Υδροξυκιναμικά οξέα	Αντιοξειδωτική [9]
	Ροζμαρινικό οξύ	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αντιογκογεννητική [40]
Θυμόλη	Αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδης, αναλγητική, αντισπασμωδική, αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή, αντισηπτική, αντικαρκινική [41]	
Σεσκιτερπένια	Καρυοφυλλένιο	Αντικαρκινική [42]
	Οξείδιο του καρυοφυλλένιου	Αντιφλεγμονώδης [9], αντικαρκινική [42]

2. Αιθέρια έλαια

2.1. Γενικά

Τα αιθέρια έλαια είναι μίγματα λιπόφιλων και εξαιρετικά πτητικών δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών, με σχετική μοριακή μάζα μικρότερη από 300, που μπορούν να διαχωριστούν με φυσικές μεθόδους από άλλα φυτικά συστατικά ή μεμβρανώδη ιστό. Είναι διαυγή και συνήθως άχρωμα υγρά, με χαρακτηριστική οσμή, η οποία δεν εξαρτάται από την αναλογία συγκεντρώσεων των συστατικών του αιθέριου ελαίου, αλλά από το κατώφλι ανίχνευσης καθενός από αυτά, το οποίο συσχετίζεται με τη δομή και την πτητικότητα του αντίστοιχου συστατικού. Κατά συνέπεια, ακόμα και συστατικά με μικρή αναλογία, μπορούν να έχουν ισχυρή επίδραση στην οσμή [43].

Πολλά από τα συστατικά των αιθέριων ελαίων παρουσιάζουν ομοιότητες στη δομή τους καθώς τα περισσότερα έχουν προκύψει από τρεις οδούς βιοσύνθεσης: α) την οδό του μεβαλονικού οξέος που οδηγεί σε σεσκιτερπένια , β) την οδό της μεθυλο-ερυθρυτόλης που οδηγεί σε μονο και δι-τερπένια και γ) την οδό του σικιμικού οξέος που οδηγεί σε φαινυλοπροπένια. Υπάρχουν όμως και αρκετά συστατικά που εμφανίζουν μοναδικότητα και προκύπτουν από διαφορετικές οδούς [44].

Παράγονται σε εξειδικευμένους εκκριτικούς σχηματισμούς των φυτών (αδενώδεις τρίχες, οαδένες, εκκριματοφόρους αγωγούς, ιδιόβλαστα ελαιοκύτταρα) οι οποίοι βρίσκονται σε διάφορα μέρη τους, όπως στα πέταλα, στα φύλλα , στον φλοιό των καρπών , αλλά και στις ρίζες, στον φλοιό ή ακόμα και στο ξύλωμα [45].

Τα αιθέρια έλαια επιτελούν διάφορες λειτουργίες στα φυτά. Ορισμένες από τις δράσεις τους είναι :

- Προστασία του φυτού από παθογόνα
- Προστασία του φυτού από φυτοφάγα , με προσέλκυση των φυσικών αντιπάλων τους
- Διευκόλυνση της αναπαραγωγής με προσέλκυση επικονιαστών ή οργανισμών που διασπείρουν τους σπόρους
- Σηματοδότηση μεταξύ των φυτών [46]
- Αναστολή της εκβλάστησης φυτικών σπερμάτων [10]
- Προστασία του φυτού από το ψύχος και την υψηλή θερμοκρασία καθώς με την εξάτμισή τους σχηματίζουν ένα προστατευτικό νέφος γύρω από τα φυτά.

- Αύξηση της ανθεκτικότητας των φυτών στην ξηρασία λόγω μείωσης της διαπνοής που οφείλεται στην είσοδό τους στους μεσοκυττάριους χώρους.
- Συμμετοχή στη ρύθμιση του μεταβολισμού των φυτών.
- Καταλυτική δράση στις μεταβολικές αντιδράσεις που αφορούν τους γλυκοζίτες και άλλες ουσίες.
- Προστασία των φυτικών ιστών από τη ρητίνη που παράγουν από ορισμένα αειθαλή δέντρα, η οποία χρησιμεύει στην κάλυψη των τραυμάτων του φλοιού [45].

Λόγω των πολλών εφαρμογών τους στην καθημερινή ζωή, έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι παραλαβής των αιθέριων ελαίων, με κύριο μέλημα να μην καταστραφούν τα δραστικά συστατικά τους. Η μέθοδος παραλαβής εξαρτάται από τη φύση της πρώτης ύλης, την ποσότητά της, την περιεκτικότητα σε δραστικό συστατικό, τον χρόνο παραλαβής, το κόστος του εξοπλισμού και της παραγωγικής διαδικασίας [47] όπως και το αν θα υπάρξει ή όχι διαδικασία προετοιμασίας του φυτικού υλικού.

Συνήθως προτιμάται τα φυτά να αποξηραίνονται. Η διαδικασία της αποξήρανσης οδηγεί στη μείωση της ενεργότητας του νερού με αποτέλεσμα να αναστέλλεται ή και να αποτρέπεται η ανάπτυξη των μικροοργανισμών και να επιβραδύνονται οι χημικές και ενζυμικές αντιδράσεις που μπορούν να προκαλέσουν αλλοιώσεις. Αυτό έχει ως συνέπεια, το δείγμα να διατηρείται για περισσότερο χρόνο [45]. Υπάρχουν όμως και υλικά που η προεπεξεργασία μπορεί να αποβεί καταστροφική, όπως στα μπαχαρικά, γιατί καταστρέφει τους αδένες που τα φυλάσσουν με αποτέλεσμα να χάνονται τα πτητικά αιθέρια έλαια [47].

Σε αρκετές περιπτώσεις επιλέγεται, επίσης, η ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων του φυτικού υλικού, η οποία επιτυγχάνεται με άλεση ή με κονιοποίηση του δείγματος ώστε να αυξηθεί η επιφάνεια επαφής μεταξύ του φυτού και του διαλύτη εκχύλισης [45]

Συνοψίζοντας, η παραλαβή των αιθέριων ελαίων γίνεται με διάφορους τρόπους απόσταξης, εκχύλισης, μηχανικής παραλαβής, και συνδυασμών τους.

2.2. Μέθοδοι Παραλαβής αιθέριων ελαίων-Απόσταξη

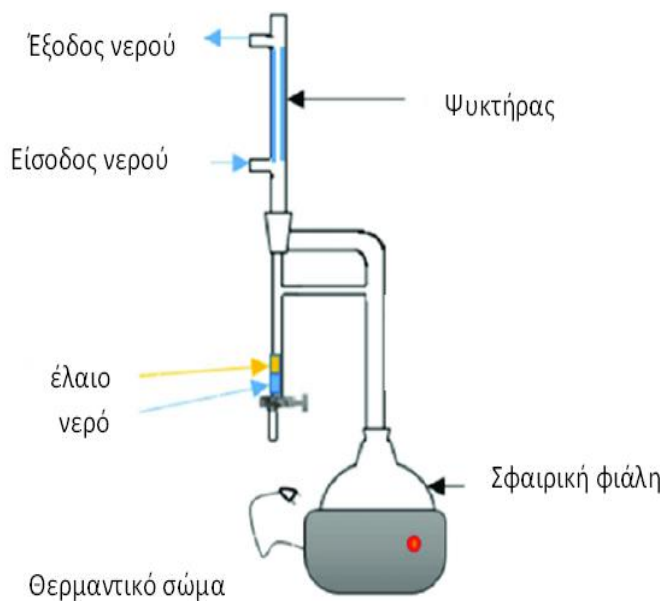
2.2.1. Υδροαπόσταξη

Η υδροαπόσταξη είναι η πιο παλιά και απλή μέθοδος παραλαβής αιθέριων ελαίων. Ανακαλύφθηκε από τον Αβικέννα (980-1037) [48]. Το προς απόσταξη φυτικό υλικό τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με νερό, η οποία συνδέεται με ψυκτήρα και με θερμαντική συσκευή (Εικ.4). Το νερό και το φυτικό υλικό είναι σε άμεση επαφή [49]. Κατά τη διάρκεια της απόσταξης συμβαίνει :

α) διάχυση. Οι μεμβράνες των φυτικών κυττάρων, όταν βρίσκονται υπό φυσιολογικές συνθήκες, είναι σχεδόν αδιαπέραστες από τα πτητικά έλαια. Κατά τη διαδικασία της υδροαπόσταξης, οι κυτταρικές μεμβράνες διογκώνονται λόγω της επαφής τους με το νερό. Στη θερμοκρασία του βραστού νερού, ένα μέρος του πτητικού ελαίου διαλύεται στο νερό που υπάρχει μέσα στα ελαιοφόρα κύτταρα, και αυτό το διάλυμα ελαίου-νερού διαποτίζει, λόγω ώσμωσης, τις διογκωμένες μεμβράνες και τελικά φτάνει στην

εξωτερική επιφάνεια, όπου το λάδι εξατμίζεται με τη διέλευση ατμού. Η ταχύτητα της εξατμισμού του λαδιού δεν επηρεάζεται από την πτητικότητα των συστατικών του ελαίου, αλλά από τον βαθμό διαλυτότητάς τους στο νερό. Ως εκ τούτου, τα υψηλού σημείου ζέσεως αλλά περισσότερο υδατοδιαλυτά συστατικά του ελαίου στον φυτικό ιστό αποσπάζονται πριν από τα χαμηλού σημείου ζέσεως αλλά λιγότερο υδατοδιαλυτά συστατικά.

β) υδρόλυση. Πολλά από τα συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι εστέρες οι οποίοι με την επίδραση του νερού καταστρέφονται εν μέρει, καθώς ένα ποσοστό τους μετατρέπεται σε αλκοόλη και οξύ λόγω υδρολύσεως.



Εικόνα 4: Συσκευή Clevenger [45]

γ) θερμική αποσύνθεση. Σχεδόν όλα τα συστατικά των αιθέριων ελαίων είναι ασταθή σε υψηλή θερμοκρασία [50].

Κατά τον βρασμό, οι ατμοί, οι οποίοι είναι ένα ομογενές μίγμα αιθερίων ελαίων και υδρατμού, διέρχονται από τον ψυκτήρα, υγροποιούνται και ρέουν σε διαβαθμισμένο σωλήνα που στο άκρο του φέρει στρόφιγγα. Στο σωλήνα, το έλαιο και το νερό δημιουργούν δύο στοιβάδες, εκ των οποίων η κατώτερη είναι η υδατική [45].

Στην υδροαπόσταξη το έλαιο απομονώνεται από το φυτικό υλικό σε θερμοκρασίες μικρότερες από 100°C [48]. Διατηρεί τις θεραπευτικές του ιδιότητες [51], αν και, α) τα πτητικά συστατικά, οι φυσικές χρωστικές και οι βιοδραστικές ενώσεις που είναι ασταθείς στη θερμότητα μπορεί να διασπαστούν σε αυτή τη θερμοκρασία [52], β) τα δυσδιάλυτα στο νερό συστατικά και αυτά με τα υψηλά σημεία ζέσεως δεν αποστάζονται πλήρως, γ) κάποιοι εστέρες υφίστανται μερικώς υδρόλυση, ενώ κάποιες αλδεΐδες μπορεί να πολυμεριστούν [50]. Η υπερθέρμανση του φυτικού υλικού, είτε λόγω πιθανής επαφής του με το κάτω μέρος της φιάλης είτε λόγω παρατεταμένης διάρκειας της διαδικασίας, πρέπει να αποφεύγεται, ώστε να μην συμβαίνει θερμική διάσπαση διαφόρων συστατικών του αιθέριου ελαίου και παραγωγή δυσάρεστων πτητικών ουσιών [53]. Η μέθοδος αυτή, απαιτεί μεγάλο χρόνο σε σχέση με άλλες τεχνικές απόσταξης, εμφανίζει μικρή απόδοση σε αιθέριο έλαιο, το οποίο είναι κατώτερης ποιότητας. Επίσης, αν δεν ελέγχεται η θέρμανση, υπάρχει κίνδυνος να διαφέρουν τα αποστάγματα από παρτίδα σε παρτίδα.

Παρά τα μειονεκτήματά της, χρησιμοποιείται για εργαστηριακούς σκοπούς [45] και επειδή οι αποστακτήρες είναι φθηνοί, εύκολοι στην κατασκευή και κατάλληλοι για λειτουργία πεδίου εξακολουθεί να χρησιμοποιείται ευρέως με φορητό εξοπλισμό σε πολλές χώρες [50]. Το παραπροϊόν που προκύπτει, το υδρόλυμα (το οποίο, εάν αποστάζονται άνθη, ονομάζεται «ανθόνερο») επίσης χρησιμοποιείται.

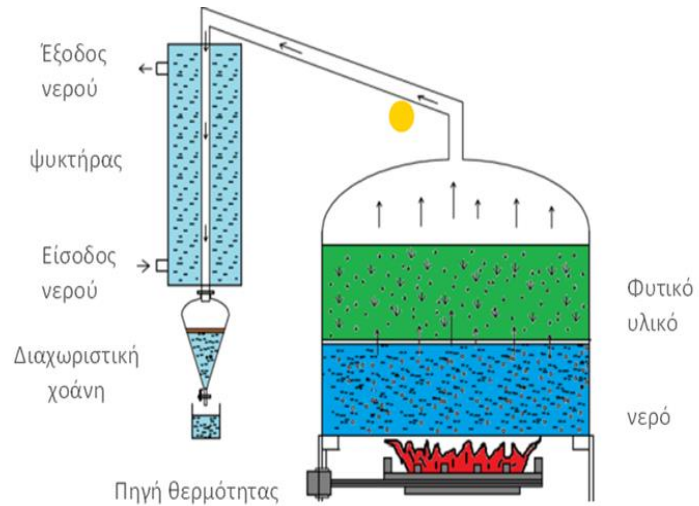
2.2.2. Απόσταξη με υδρατμούς

Η απόσταξη με ατμό είναι μια διαδικασία διαχωρισμού κατάλληλη για υλικά ευαίσθητα στη θερμοκρασία (π.χ. λάδια, ρητίνες, υδρογονάνθρακες κλπ.) τα οποία είναι αδιάλυτα στο νερό και μπορεί να αποσυντεθούν στο σημείο βρασμού τους. Αυτό οφείλεται στο ότι επιτρέπει την απόσταξη μιας ένωσης ή ενός μείγματος ενώσεων σε θερμοκρασία σημαντικά χαμηλότερη από τα σημεία βρασμού των μεμονωμένων συστατικών. Τα αιθέρια έλαια περιέχουν ουσίες με σημεία βρασμού έως 200 °C ή υψηλότερα, αλλά παρουσία ατμού ή

βραστού νερού, οι ουσίες αυτές εξατμίζονται στο σημείο βρασμού του νερού (100 °C) σε ατμοσφαιρική πίεση [54].

Στην απόσταξη με υδρατμούς, ο ατμός που χρησιμοποιείται, μπορεί να παραχθεί είτε όπως φαίνεται στη διάταξη της

εικόνας 5, και να παρασύρει το αιθέριο έλαιο από το φυτικό υλικό που βρίσκεται σε ειδική βάση πάνω από το νερό, ώστε να μην έρχεται σε επαφή μαζί του, είτε σε ειδικό ατμολέβητα, και κατόπιν να εισάγθει στο δοχείο που περιέχει το φυτικό υλικό ώστε να παρασύρει το



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση απόσταξης με υδρατμούς -Διάταξη Α [45]

αιθέριο έλαιο [49] (εικ. 6). Ο ατμός δεν διεισδύει στις ξηρές κυτταρικές μεμβράνες αλλά παρασύρει το πτητικό έλαιο που έχει απελευθερωθεί από τα ελαιοφόρα κύτταρα με την πρώτη ενδελεχή θρυμματοποίηση του φυτικού υλικού [50]. Το μίγμα υδρατμών – αιθέριου ελαίου φθάνει στον ψυκτήρα, υγροποιείται και προωθείται στον κύριο χώρο της συσκευής, όπου σχηματίζεται ένα διφασικό μίγμα [49] από όπου συλλέγεται το αιθέριο έλαιο.

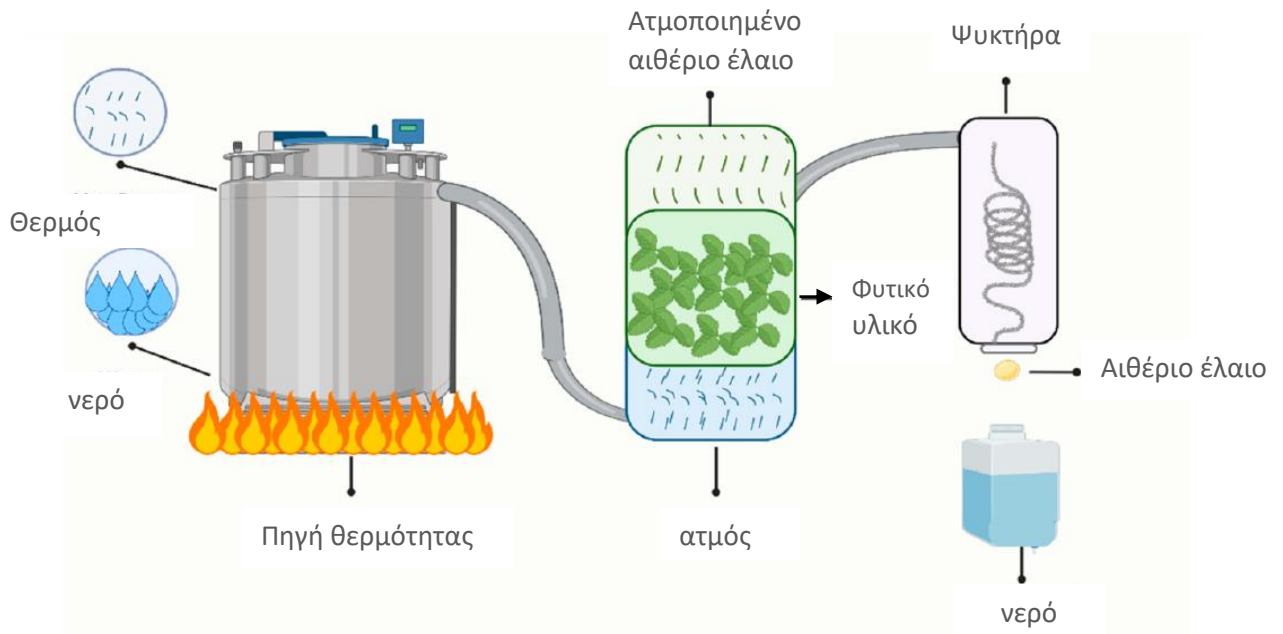
Η απόσταξη με υδρατμούς δεν επιβαρύνει το περιβάλλον γιατί χρησιμοποιεί ως διαλύτη το νερό το οποίο είναι μη τοξικό και σε σχέση με την υδροαπόσταξη:

- Εμφανίζει υψηλότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο
- Το αιθέριο έλαιο που παράγεται είναι καλύτερης ποιότητας διότι δεν έχει υποστεί έντονη θερμική επεξεργασία με αποτέλεσμα να μην υπάρχουν προϊόντα υδρόλυσης ή πολυμερισμού.
- Το αιθέριο έλαιο έχει πιο αναπαραγωγίμη ποιότητα.
- Η ταχύτητα απόσταξης είναι μεγαλύτερη, επομένως έχει καλύτερη ενεργειακή απόδοση.

Ωστόσο, στην περίπτωση που χρησιμοποιείται η διάταξη Α, αν τα έλαια που παραλαμβάνονται έχουν υψηλά σημεία ζέσεως, επειδή ο ανερχόμενος ατμός έχει χαμηλή πίεση απαιτείται μεγαλύτερη ποσότητα ατμού για εξάτμιση - επομένως περισσότερες ώρες

απόσταξης. Επίσης, χρειάζεται έλεγχος ώστε το νερό να μην βράσει πολύ έντονα και να έρθει σε άμεση επαφή με το φυτικό υλικό που στηρίζεται στο πλέγμα [50].

Είναι η τεχνική απόσταξης που εφαρμόζεται συχνότερα, ακόμη και για μεγάλες ποσότητες, παρά το γεγονός ότι εμφανίζει χαμηλές αποδόσεις και είναι χρονοβόρα.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση απόσταξης με υδρατμούς
Διάταξη Β

[45]

2.3. Μέθοδοι παραλαβής αιθέριων ελαίων – εκχύλιση

Η εκχύλιση, βασίζεται στην κατανομή της διαλυμένης ουσίας μεταξύ δύο διαλυτών, οι οποίοι είναι πρακτικά μη αναμίξιμοι (υδατική-οργανική φάση). Στην υδατική φάση κατά κύριο λόγο συλλέγονται οι πολικές ουσίες και τα ανόργανα συστατικά, ενώ στην οργανική οι μη πολικές ουσίες [49].

Η εκχύλιση χρησιμοποιείται κυρίως για την παραλαβή του αιθέριου ελαίου από τμήματα των φυτών που είναι ευπαθή στην απόσταξη, όπως άνθη και φύλλα. Η απόδοση της εκχύλισης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες : α) τον τύπο του διαλύτη β) τον λόγο διαλύτη προς φυτικό υλικό γ) τη θερμοκρασία δ) το χρόνο ε) τη δομή του φυτικού υποστρώματος, όπως είναι το μέρος του φυτού και το μέγεθος των σωματιδίων που προκύπτουν από την κατάτμησή του [55]. Ανάλογα με το υλικό που χρησιμοποιείται για την εκχύλιση, αυτή διακρίνεται σε

- εκχύλιση με νερό
- εκχύλιση με ψυχρό λίπος
- εκχύλιση με θερμό λίπος
- εκχύλιση με πτητικούς διαλύτες
- εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά [49].

2.3.1. Εκχύλιση με νερό

Είναι ο παλαιότερος τρόπος απομόνωσης δραστικών συστατικών από τα φυτά. Μπορεί να είναι είτε έκχυση, δηλαδή διαβροχή της φυτικής ύλης για λίγα λεπτά σε κρύο ή βραστό νερό, είτε παρασκευή αφεψήματος, δηλαδή βρασμός του φυτικού υλικού σε ορισμένο όγκο νερού, για καθορισμένο χρονικό διάστημα. Η παρασκευή αφεψήματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραλαβή θερμοσταθερών συστατικών [45].

2.3.2. Εκχύλιση με ψυχρό λίπος

Η εκχύλιση με ψυχρό λίπος (enfleurage) (εικ.7) αποτελεί μία τεχνική που χρησιμοποιείται για την εξαγωγή του αρώματος από ευαίσθητα άνθη , όπως γιασεμιού, βιολέτας κ.α [56] στα οποία η περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο είναι πολύ μικρή [50].

Παλαιότερα χρησιμοποιούνταν ζωικό λίπος, όπως χοιρινό ή αγελαδινό, συνήθως κατόπιν απόσμησης. Σήμερα, η τεχνική αυτή έχει σχεδόν εγκαταλειφθεί και, στις ελάχιστες περιπτώσεις που χρησιμοποιείται, το ζωικό λίπος έχει αντικατασταθεί από φυτικά λίπη όπως το κεριόφοινικα. Το λίπος απλώνεται σε



Εικόνα 7: Εκχύλιση με ψυχρό λίπος [129]

γυάλινη επιφάνεια και τα πέταλα των λουλουδιών τοποθετούνται επάνω του. Μια δεύτερη γυάλινη επιφάνεια τα καλύπτει και τοποθετούνται σε ξύλινο πλαίσιο. Παραμένουν κάποιες μέρες και αντικαθίστανται από άλλα άνθη. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται έως ότου κορεστεί το λίπος και μπορεί να διαρκέσει, ανάλογα με την πρώτη ύλη, ακόμα και για μήνες. Το προϊόν ονομάζεται «πομάδα» και μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχει. Μπορεί και να εκχυλιστεί σε διαλύτες όπως η αιθανόλη και να αποδώσει τα αρώματα που έχει απορροφήσει. Στη συνέχεια, ο διαλύτης αφήνεται να εξατμιστεί. Το αρωματικό έλαιο που προκύπτει ονομάζεται «απόλυτο» (absolute) [56].

2.3.3. Εκχύλιση με θερμό λίπος

Η εκχύλιση αυτή διαφέρει από την εκχύλιση με ψυχρό λίπος στο γεγονός ότι τα άνθη τοποθετούνται σε λειωμένο λίπος (45-60°C) για 1-2 ώρες, ανάλογα με το είδος. Αφήνουμε να κρυώσει και να στερεοποιηθεί. Μετά από κάποιο χρονικό διάστημα, θερμαίνουμε και αντικαθιστούμε τα άνθη. Επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία μέχρι να κορεστεί το λίπος [57].

2.3.4. Εκχύλιση με διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συχνότερα είναι ο πετρελαϊκός αιθέρας, το βενζόλιο και η αιθυλική αλκοόλη. Το αιθέριο έλαιο που προκύπτει μετά την απομάκρυνση του πτητικού διαλύτη περιέχει διάφορες προσμίξεις όπως κηρούς και χρωστικές, που συνεκχυλίζονται.

Για τον καθαρισμό του, ακολουθεί επεξεργασία με αιθυλική αλκοόλη [49].

Η ανάγκη για πιο ασφαλείς διαλύτες (μη καρκινογόνους, μεταλλαξογόνους, αλλεργιογόνους, τοξικούς ή που να προκαλούν προβλήματα στις αναπαραγωγικές λειτουργίες), με μικρότερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα, από ανανεώσιμες πηγές και σε λογικό κόστος, σύμφωνα



Εικόνα 8: Κριτήρια που επηρεάζουν την επιλογή διαλύτη [56]

με τις αρχές της Πράσινης Χημείας, οδήγησε στη χρήση νέων διαλυτών, που δεν προέρχονται από τον ορυκτό πλούτο.

Μεταξύ των εναλλακτικών λύσεων, υπάρχουν διαλύτες προερχόμενοι από την αγροτική παραγωγή, μέσα στους οποίους περιλαμβάνονται φυτικά έλαια, βιοδιαλύτες που προκύπτουν από ζύμωση ζάχαρης ή αμύλου από δημητριακά, ζαχαροκάλαμο και πατάτες (π.χ. οξικός αιθυλεστέρας, αιθανόλη, βουτανόλη, κ.λπ.) και φυσικούς διαλύτες που προέρχονται από βιομάζα πλούσια σε λιγνίνη και κυτταρίνη (π.χ. d-λιμονένιο, α- και β-πινένια, κ.λπ.), νερό σε διάφορες μορφές όπως κανονική ή υποκρίσιμη αλλά και υγρά σε υπερκρίσιμη κατάσταση, ιονικά υγρά και βαθιά ευτηκτικοί διαλύτες [53].

2.3.5. Υδατική εκχύλιση με ζύμωση

Σε αυτή τη διαδικασία, το ακατέργαστο φυτό εμποτίζεται είτε ως σκόνη είτε ως αφέψημα για ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα κατά τη διάρκεια του οποίου, το φυτό παράγει αιθανόλη in situ, η οποία εκχυλίζει τα επιθυμητά συστατικά.

Ταυτόχρονα, η αλκοόλη που παράγεται λειτουργεί και ως συντηρητικό για το εκχύλισμα που λαμβάνεται, προστατεύοντάς το από την ανάπτυξη βακτηρίων.

Το σημαντικότερο πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής εκχύλισης είναι ότι οδηγεί στην εκχύλιση ενός ευρύτερου φάσματος δραστικών συστατικών που περιέχονται στο φυτικό κύτταρο από οποιαδήποτε άλλη τεχνική.

Επίσης, η διαδικασία της ζύμωσης, μειώνει τις απαιτήσεις για εκτεταμένο καθαρισμό του εκχυλίσματος που λαμβάνεται, γιατί βοηθά στην απομάκρυνση ανεπιθύμητων σακχάρων, φυτοφαρμάκων, βαρέων μετάλλων και άλλων προσμείξεων που μπορούν να το μολύνουν [45].

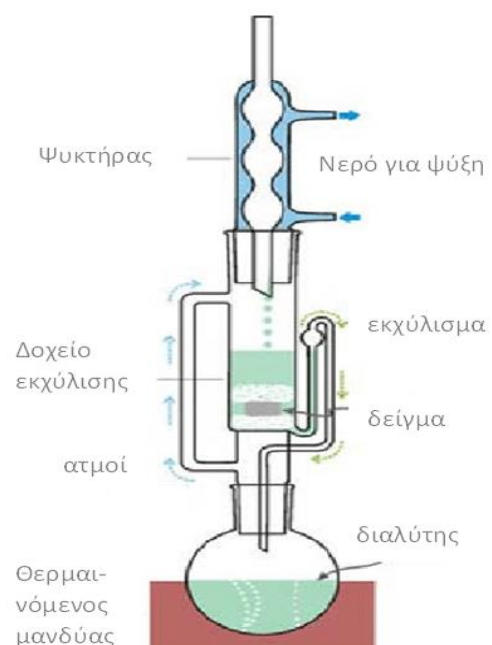
2.3.6. Εκχύλιση Soxhlet

Σε μία συσκευή Soxhlet, η τοποθέτηση του φυτικού υλικού γίνεται σε μια θήκη από πορώδες υλικό, όπως διηθητικό χαρτί ή κυτταρίνη, η οποία ονομάζεται «δακτυλήθρα» (thimble) (εικ.9). Στη σφαιρική φιάλη είναι ο διαλύτης, ο οποίος θερμαίνεται εξατμίζεται και ανέρχεται προς τον ψυκτήρα, όπου συμπυκνώνεται και ρέει στο θάλαμο που περιέχει το δείγμα. Όταν το συμπυκνωμένο μίγμα των διαλυτών φθάσει στο επίπεδο υπερχειλίσης, πραγματοποιείται σιφωνισμός του διαλύματος και το διάλυμα διαλυτών μαζί με τις ουσίες που έχουν εκχυλιστεί, επιστρέφει στη φιάλη απόσταξης. Οι διαλυμένες ουσίες και οι διαλύτες παραμένουν στη φιάλη και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθεί η εκχύλιση των επιθυμητών ενώσεων. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που προσφέρει η εκχύλιση Soxhlet είναι:

- Αυξάνει την αποδοτικότητα της εκχύλισης λόγω της μικρότερης ποσότητας διαλύτη που χρησιμοποιείται.
- Διατηρεί τη σχετικά υψηλή θερμοκρασία εκχύλισης, διότι η θερμότητα μεταφέρεται από τη φιάλη απόσταξης στον θάλαμο εκχύλισης.

- Μειώνει την ανάγκη διήθησης του εκχυλίσματος, όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία.

Τα κυριότερα μειονεκτήματα της εκχύλισης Soxhlet :



Εικόνα 9: Συσκευή Soxhlet [45]

- Χρονοβόρα διαδικασία.
- Δεν υπάρχει δυνατότητα ανάδευσης.
- Είναι πιθανό, επειδή ο διαλύτης βρίσκεται στο σημείο βρασμού του για αρκετό χρόνο, κάποιες από τις ενώσεις-στόχους να υποστούν μερική θερμική αποσύνθεση.
- Οι διαλύτες συχνά είναι τοξικοί και εύφλεκτοι με αποτέλεσμα η μέθοδος να μην μπορεί να θεωρηθεί ούτε φιλική προς το περιβάλλον ούτε ασφαλής για τον χειριστή.
- Οι διαλύτες πρέπει να έχουν υψηλή καθαρότητα και κατά συνέπεια, το κόστος της όλης διαδικασίας αυξάνει [45].

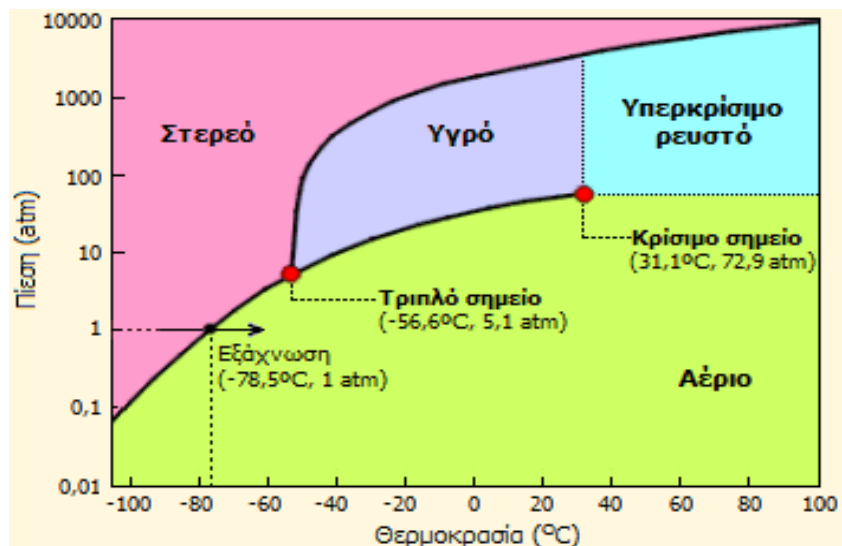
2.3.7. Εκχύλιση με υπερκρίσιμα υγρά (SPE)

Κάθε ουσία σε θερμοκρασία και πίεση πάνω από το κρίσιμο σημείο βρίσκεται σε υπερκρίσιμη κατάσταση, στην οποία η υγρή και η αέρια φάση παύουν να υπάρχουν. Η συμπεριφορά του υπερκρίσιμου ρευστού έχει φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και των δύο φάσεων, η ικανότητα διάλυσης μοιάζει με των υγρών και το χαμηλό ιξώδες μοιάζει με των αερίων [45]. Ως εκ τούτου, διαχέονται εύκολα, και αυτό είναι πολύ σημαντικό στην εκχύλιση, όπου η ενέργεια που εφαρμόζεται χρησιμεύει κυρίως στο σπάσιμο των λιπιδικών μεμβρανών για την απελευθέρωση του περιεχομένου του φυτικού κυττάρου. Μετά την

εκχύλιση, η ελάττωση της πίεσης επιτρέπει την εύκολη ανάκτηση των εξαγόμενων μορίων από το υπερκρίσιμο ρευστό και το αέριο μπορεί να ανακυκλωθεί με επανασυμπίεση. Η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά απαιτεί λιγότερη εργασία, οδηγώντας σε

μείωση του κόστους και καλύτερη χρήση της ενέργειας.

Πολλά αέρια εμφανίζουν υπερκρίσιμη συμπεριφορά (αιθάνιο, μεθάνιο, αιθυλένιο κ.λπ.), αλλά δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν εξ' αιτίας είτε της τοξικότητάς τους είτε επειδή



Εικόνα 10: Διάγραμμα φάσεων CO₂

[130]

έχουν υψηλές υπερκρίσιμες θερμοκρασίες, οι οποίες θα κατέστρεφαν τις προς εκχύλιση ενώσεις. Το υπερκρίσιμο CO₂ είναι ένας καθαρός μη πολικός διαλύτης που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση ενώσεων χαμηλής πολικότητας από διάφορα φυτικά υποστρώματα, χωρίς να παρουσιάζει τα ανωτέρω μειονεκτήματα [53].

2.4. Μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων – Μηχανική παραλαβή

Μερικά πτητικά έλαια, όπως αυτά που απαντώνται στους φλοιούς των εσπεριδοειδών, δεν μπορούν να αποσταχθούν χωρίς αποσύνθεση και έτσι συνήθως λαμβάνονται με πίεση. Στο παρελθόν, η διαδικασία γινόταν με το χέρι. Ο φλοιός ή το ξύσμα εσπεριδοειδών εμποτίζονταν σε ζεστό νερό και στη συνέχεια συμπιέζονταν με ένα σφουγγάρι το οποίο απορροφούσε το αιθέριο έλαιο αναμεμιγμένο με νερό. Το σφουγγάρι πιέζονταν πάνω από ένα δοχείο και το αιθέριο έλαιο συλλέγονταν μετά από λίγο χρόνο κατά τη διάρκεια του οποίου επιτυγχάνονταν φυσικά ο διαχωρισμός του αιθέριου ελαίου από το νερό [53].

Σήμερα, η ίδια διαδικασία γίνεται με μηχανήματα τα οποία είτε ξύνουν είτε τρυπούν τους φλοιούς των εσπεριδοειδών και στη συνέχεια τους συμπιέζουν. Το γαλάκτωμα που παράγεται αρχικά διαχωρίζεται από το στερεό υπόλειμμα και στη συνέχεια απομονώνονται τα αιθέρια έλαια με φυγοκέντρηση [50]. Τα μηχανήματα για τους ξηρούς καρπούς είναι ένα είδος πιεστηρίων, παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στα ελαιοτριβεία [45].



Εικόνα 11: Μηχανήματα μηχανικής παραλαβής αιθερίων ελαίων [50]

2.5. Τεχνολογίες εντατικοποίησης των διαδικασιών παραλαβής αιθέριων ελαίων

2.5.1. Εκχύλιση με ρευστά υπό πίεση

Εκτός από την εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά, υπάρχει και η εκχύλιση με διαλύτη υπό πίεση (PSE) και η εκχύλιση με νερό σε υποκρίσιμη κατάσταση .

Η PSE συνήθως εκτελείται με οργανικούς διαλύτες (κυρίως εξάνιο, μεθανόλη ή αιθανόλη) που μπορούν να απομακρυνθούν εύκολα στο τέλος της διαδικασίας. Η διαδικασία χρησιμοποιεί υψηλή θερμοκρασία (50-200 °C) και πίεση (500-3000 psi), η οποία έχει ως αποτέλεσμα μικρότερο χρόνο εκχύλισης, μειωμένη κατανάλωση διαλύτη και υψηλότερη απόδοση.

Οι αυξημένες θερμοκρασίες αυξάνουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης ενώ η αυξημένη πίεση διατηρεί τον διαλύτη σε κατάσταση υγρού καθώς η θερμοκρασία είναι καθορισμένη πάνω από το σημείο βρασμού του.

Οι υψηλές πιέσεις διευκολύνουν επίσης την πρόσβαση των διαλυτών σε περιοχές του φυτικού υποστρώματος που δεν θα μπορούσαν να προσεγγιστούν διαφορετικά. Ωστόσο, οι υψηλές θερμοκρασίες αποκλείουν τη χρήση της μεθόδου για την εξαγωγή ενώσεων ευαίσθητων στη θερμότητα.

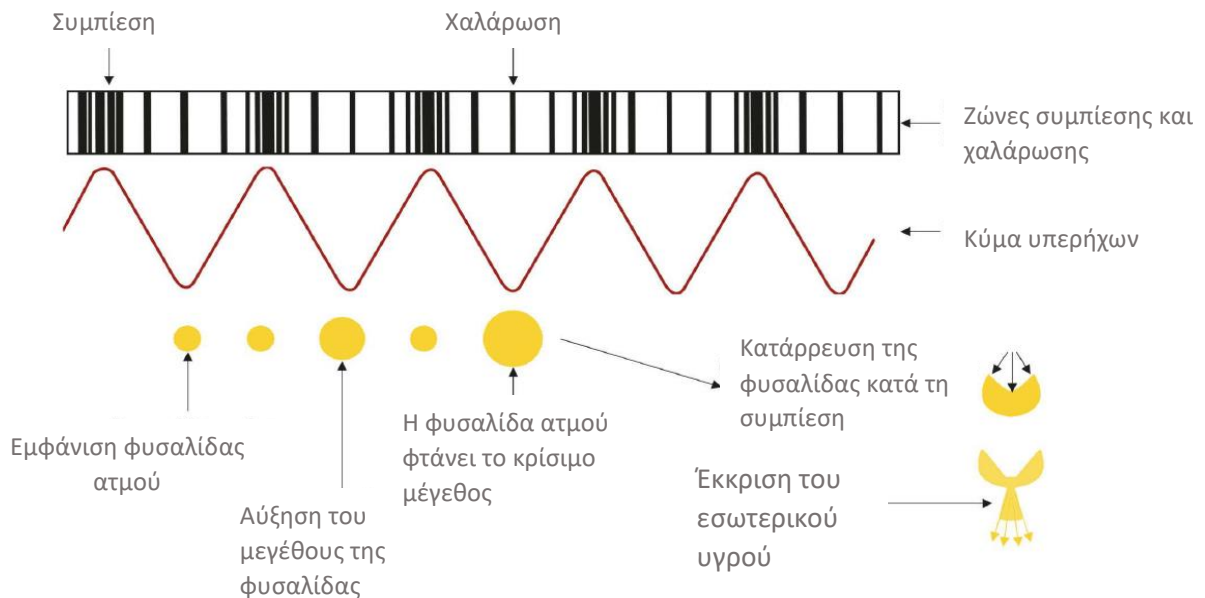
Η εκχύλιση με νερό σε υποκρίσιμη κατάσταση, αποτελεί βελτίωση της μεθόδου.

Το νερό είναι ένας πολικός διαλύτης, ο οποίος, όταν θερμανθεί στους 200°C και με την εφαρμογή πίεσης παραμένει σε υγρή μορφή, η διηλεκτρική του σταθερά πέφτει από 79 σε 35, και εμφανίζει ιδιότητες παρόμοιες με αυτές της αιθανόλης ή της μεθανόλης. Και η εκχύλιση με νερό σε υποκρίσιμη κατάσταση είναι, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών, ακατάλληλη για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων ουσιών, ενώ υπάρχουν δυσκολίες στον σχεδιασμό κατάλληλων συσκευών παραγωγής ικανών να λειτουργούν σε συνεχή βάση και υπό υψηλή πίεση και θερμοκρασία. Κατά συνέπεια, η τεχνολογία PFE δεν αξιοποιείται επί του παρόντος σε βιομηχανικό επίπεδο [53].

2.5.2. Εκχύλιση με υπερήχους

Οι υπέρηχοι είναι ηχητικά κύματα με συχνότητα μεγαλύτερη των 20KHz. Όταν χρησιμοποιούνται, προκαλείται κίνηση του υγρού λόγω συμπίεσης και αραιώσης μέσω του ηχητικού σήματος. Με την αύξηση της πίεσης επιτυγχάνονται τα φαινόμενα διείσδυσης και

μεταφοράς, ενώ όταν αυξάνεται η θερμοκρασία επιταχύνονται τα φαινόμενα διάχυσης και διαλυτοποίησης. Η αποτελεσματικότερη εκχύλιση με χρήση υπερήχων σχετίζεται με το φαινόμενο της ακουστικής σπηλαιώσης (cavitation), δηλαδή της δημιουργίας φυσαλίδων εντός του μέσου. Αυτές οι φυσαλίδες αυξάνονται κατά τη διάρκεια των φάσεων της αραιώσης, ενώ το μέγεθός τους μειώνεται κατά τη διάρκεια της φάσης της συμπίεσης [58]. Όταν το μέγεθός τους φθάσει στο κρίσιμο σημείο, καταρρέουν κατά τη διάρκεια ενός κύκλου συμπίεσης, διαρρηγνύεται το κυτταρικό τοίχωμα και απελευθερώνονται οι οργανικές ενώσεις οι οποίες εμπεριέχονται στα κύτταρα, με αποτέλεσμα, ο επιλεγμένος διαλύτης να τις εκχυλίζει ευκολότερα [45].



Εικόνα 12: Αρχή της εκχύλισης με υπερήχους

Η εκχύλιση με τη βοήθεια υπερήχων είναι μια αποτελεσματική και γρήγορη μέθοδος, η οποία δεν απαιτεί ιδιαίτερα ακριβό εξοπλισμό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για θερμοευαίσθητες ενώσεις καθώς δεν χρησιμοποιεί υψηλή θερμοκρασία.

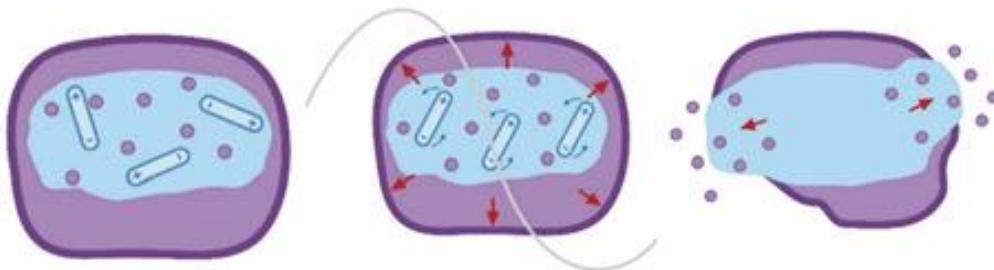
Ωστόσο, κατά την διάρκεια της κατεργασίας με υπερήχους, ενδέχεται να σχηματιστούν ελεύθερες ρίζες, οι οποίες θα είναι σε θέση να προκαλέσουν ανεπιθύμητες αλλαγές στα εκχυλιζόμενα μόρια.

2.5.3. Εκχύλιση με μικροκύματα

Τα μικροκύματα είναι ακτινοβολία με συχνότητα 300 MHz ως 300 GHz (μεταξύ του υπέρυθρου και των ακτίνων Χ). Η εκχύλιση με τη χρήση τους, είναι μία καινοτόμος διαδικασία, με υψηλή απόδοση σε μικρό χρόνο, και χαμηλή κατανάλωση ενέργειας και διαλύτη [53]. Τα μικροκύματα μπορούν να διαπεράσουν τα βιοϋλικά και να αλληλεπιδράσουν με πολικά μόρια μέσα σε αυτά ώστε να δημιουργήσουν θερμότητα. Η ταχεία θέρμανση επιτυγχάνεται με περιστροφή των διπόλων που σχηματίζουν τα μόρια των διηλεκτρικών υλικών μέσα στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο μεταβαλλόμενης διεύθυνσης. Η ηλεκτρική ενέργεια μετατρέπεται σε κινητική και η κινητική σε θερμική [53]. Η θερμοκρασία αυξάνεται πάρα πολύ και η εσωτερική υπερθέρμανση προκαλεί την εξάτμιση του υγρού στο εσωτερικό των κυττάρων, ρήξη των κυτταρικών τοιχωμάτων και των πλασματικών μεμβρανών. Με αυτόν τον τρόπο διευκολύνεται η εκρόφιση των φυτικών συστατικών από το κύτταρο και κατά συνέπεια αυξάνεται σημαντικά η απόδοση της εκχύλισης [55].

Η εκχύλιση με μικροκύματα, μπορεί να απαντηθεί σε διάφορες παραλλαγές όπως :

- Υδροδιάχυση με μικροκύματα και βαρύτητα (Microwave Hydrodiffusion and Gravity - MHG). Εφαρμόζεται χωρίς διαλύτη, σε ατμοσφαιρική πίεση. Τα αιθέρια έλαια συλλέγονται στον πυθμένα του αντιδραστήρα με συμπύκνωση του αποστάγματος.



Εικόνα 13: Μηχανισμός εκχύλισης με μικροκύματα

[53]

- Ξηρή απόσταξη με τη βοήθεια μικροκυμάτων (SFME). Η θέρμανση του νερού που περιέχεται στα φυτικά κύτταρα τα διαστέλλει και προκαλεί τη ρήξη των ελαιοφόρων αδένων και την απελευθέρωση του αιθέριου ελαίου το οποίο εξατμίζεται μαζί με το νερό. Σύστημα ψύξης έξω από το φούρνο μικροκυμάτων συμπυκνώνει συνεχώς τους ατμούς, οι οποίοι συλλέγονται σε ειδικό γυάλινο σκεύος.
- Εκχύλιση με διαλύτες με τη βοήθεια μικροκυμάτων. Σε πολλές περιπτώσεις, απαιτείται η ύπαρξη διαλύτη για τη συνέχιση της διαδικασίας. Υπάρχουν α) πολικοί διαλύτες, που

απορροφούν την ενέργεια των μικροκυμάτων, όπως η αιθανόλη και η μεθανόλη που θερμαίνονται λιγότερο από το νερό γιατί έχουν χαμηλότερη διηλεκτρική σταθερά, και β) μη πολικοί διαλύτες όπως το εξάνιο, που δεν απορροφούν τα μικροκύματα. Οι τελευταίοι, δεν θερμαίνονται, και αυτό τους κάνει ιδιαίτερα χρήσιμους όταν επιθυμούμε να παραλάβουμε θερμοευαίσθητα συστατικά [53].

2.5.4. Εκχύλιση κατ' αντιρροή

Στην εκχύλιση κατ' αντιρροή (Counter-Current Extraction – CCE), το φυτικό δείγμα μετακινείται προς μία κατεύθυνση μέσα σε έναν κύλινδρο όπου έρχεται σε άμεση επαφή με τον διαλύτη εκχύλισης. Όσο περισσότερο κινείται η πρώτη ύλη μέσα στη μάζα του διαλύτη, τόσο πιο συμπυκνωμένο γίνεται το λαμβανόμενο εκχύλισμα. Για να αυξηθεί η αποδοτικότητα της εκχύλισης, γίνεται προσεκτική ρύθμιση κατά περίπτωση της ποσότητας του διαλύτη και του φυτικού δείγματος, της ταχύτητας ροής καθώς και άλλων παραμέτρων. Η εκχύλιση κατ' αντιρροή εμφανίζει υψηλή απόδοση, μικρό χρόνο εκχύλισης, χρειάζεται μικρή ποσότητα διαλύτη ενώ παράλληλα είναι κατάλληλη για την παραλαβή θερμοευαίσθητων συστατικών γιατί συνήθως γίνεται σε θερμοκρασία δωματίου [45].

2.5.5. Εκχύλιση με παλμικά ηλεκτρικά πεδία

Η τεχνολογία παλμικού ηλεκτρικού πεδίου (Pulsed Electric Fields - PEF) χρησιμεύει κατά κύριο λόγο στη διατήρηση τροφίμων με υψηλότερη ηλεκτρική αγωγιμότητα, όπως υγρά ή ημι-υγρά τρόφιμα. Το υλικό τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια και εφαρμόζονται διακοπτόμενα παλμοί συνεχούς ρεύματος υψηλής τάσης (kV), για πολύ μικρά χρονικά διαστήματα (μs ως ms). Δημιουργείται ένα ηλεκτρικό πεδίο, η ένταση του οποίου εξαρτάται από την απόσταση μεταξύ των ηλεκτροδίων και την τάση που εφαρμόζεται. Εάν το ηλεκτρικό πεδίο είναι αρκετά έντονο, εμφανίζεται το φαινόμενο της ηλεκτροδιάτρησης, δηλαδή δημιουργούνται πόροι και αυξάνει η διαπερατότητα της κυτταρικής μεμβράνης στη διέλευση ιόντων και μακρομορίων.

Ανάλογα με τις συνθήκες, η διαπερατότητα μπορεί να είναι είτε παροδική (αναστρέψιμη ηλεκτροδιάτρηση), είτε οι πόροι να είναι μόνιμοι (μη αναστρέψιμη ηλεκτροπόρωση). Οι σημαντικότερες παράμετροι που επηρεάζουν την ηλεκτροδιάτρηση είναι η ένταση του

ηλεκτρικού πεδίου, ο χρόνος επεξεργασίας, η ειδική ενέργεια και η θερμοκρασία εφαρμογής [45].

3. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα

3.1. Γενικά

Παρασιτοκτόνα ή φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι οποιεσδήποτε ουσίες ή μείγματα ουσιών που χρησιμοποιούνται για την πρόληψη, την καταστροφή ή τον έλεγχο παρασίτων, συμπεριλαμβανομένων των εντόμων, μυκήτων, τρωκτικών ή ανεπιθύμητων ειδών φυτών που προκαλούν βλάβη κατά την παραγωγή και αποθήκευση των καλλιεργειών. Ο όρος "φυτοφάρμακο" έχει επικρατήσει και περιλαμβάνει ενώσεις των κατηγοριών εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων, μυκητοκτόνων και τρωκτικοκτόνων [59].

Από την αρχαιότητα, οι άνθρωποι προσπάθησαν να εφαρμόσουν τεχνικές ώστε η καλλιέργεια των φυτών που χρησιμοποιούσαν για τη διατροφή τους να είναι πιο αποδοτική. Υπάρχουν αναφορές ότι καλλιεργούσαν δηλητηριώδη και θρεπτικά φυτά στον ίδιο χώρο, λόγω της προστατευτικής δράσης των τοξικών φυτών απέναντι στα έντομα. Επίσης χρησιμοποιούσαν, και εξακολουθούν μέχρι και σήμερα να χρησιμοποιούν, στοιχειακό θείο. Στον πάπυρο Ebers, (Αίγυπτος, 1500 π.Χ) περιέχονται μερικές τεχνικές προετοιμασίας για την απομάκρυνση των εντόμων από τα τρόφιμα. Παράλληλα, στην Κίνα χρησιμοποιούσαν πρωτόγονα σουλφίδια. Αλλά και ο Όμηρος στην Οδύσσεια, που γράφτηκε περίπου την ίδια εποχή, περιγράφει τη χρήση ουσιών για την απομάκρυνση των εντόμων [59]. Χρησιμοποιούσαν ακόμη τον καπνό από άχυρα, ήρα, κοπριά και άλλα (υπολείμματα κυρίως) για να αντιμετωπίσουν τη μούχλα και το ωίδιο, ενώ τα ζιζάνια τα έλεγχαν χειρονακτικά [60].

Γύρω στο 1500 μΧ, αρχίζουν να χρησιμοποιούνται τα «παρα-φυτοφαρμάκα», δηλαδή ο υδράργυρος και το αρσενικό. Οι ουσίες αυτές χρησιμοποιήθηκαν μέχρι την έναρξη της εποχής των συνθετικών φυτοφαρμάκων (1940 και μετά), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την καταστροφή των αποθεμάτων τροφής κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου και αργότερα ως πολύτιμα εργαλεία στις διαδικασίες που χρησιμοποιούνταν για την καλλιέργεια των τροφίμων που καταναλώνονταν καθημερινά. Ωστόσο, ήδη από αυτή την περίοδο, αρκετοί επιστήμονες επεσήμαναν τις δυσμενείς επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων, όταν χρησιμοποιούνται για μεγάλο χρονικό διάστημα, στην ανθρώπινη υγεία [59].

Το 1939 ο Paul Muler εφηύρε το DDT (διχλωρο-διφαινυλ-τριχλωροαιθάνιο), το οποίο αργότερα του χάρισε το βραβείο Νόμπελ γιατί βοήθησε τόσο στο να μειωθούν οι ζημιές στη γεωργία όσο και για να ελαττωθούν τα προβλήματα που σχετίζονται με την υγεία όπως η ελονοσία ή ο τύφος [59]. Το γεγονός ότι δεν ήταν τοξικό για τα θηλαστικά, ήταν ένα ακόμη

από τα χαρακτηριστικά του που οδήγησαν στην ευρεία χρήση του παγκοσμίως. Την περίοδο μετά το 1945, εφαρμόστηκαν και άλλα συνθετικά φυτοφάρμακα, όπως τα aldrin , dieldrin, endrin (οργανικές ενώσεις με χλώριο), το παραθείον και άλλα, που είχαν κοινά μειονεκτήματα τους υψηλούς ρυθμούς εφαρμογής, την έλλειψη επιλεκτικότητας και την υψηλή τοξικότητα [60].

Το 1962, με το βιβλίο της «Σιωπηλή Άνοιξη», η συγγραφέας Rachel Carson, ανέπτυξε τις βλαβερές συνέπειες του DDT. Τα επόμενα χρόνια πολλές πολιτείες των ΗΠΑ απαγόρευσαν τη χρήση του DDT, για να απαγορευτεί παντελώς το 1972 λόγω του ότι είναι επιζήμιο σε φυτά και ζώα που δεν αποτελούν στόχους, καθώς και του γεγονότος ότι βιοσυσσωρεύεται προκαλώντας μακροχρόνιες βλάβες [60]. Με την απόσυρσή του, δόθηκε χώρος για την ανάπτυξη των οργανοφωσφορικών, των καρβαμιδικών και των πυρεθρινών.

Τα οργανοφωσφορικά έμεναν κατά κύριο λόγο στην αφάνεια πριν αποκαλυφθεί η επικινδυνότητα του DDT. Αποτελούν μία ομάδα φυτοφαρμάκων με περισσότερες από 100 ενώσεις. Ένα σημαντικό τους πλεονέκτημα είναι ότι μετά την εφαρμογή αποσυντίθενται σε μη τοξικές ενώσεις, με αποτέλεσμα να μην συσσωρεύονται στο περιβάλλον, και να μην μεταφέρονται μέσω της τροφικής αλυσίδας [61].

Τα πρώτα καρβαμιδικά συνετέθησαν στα μέσα έως τα τέλη της δεκαετίας του 1940, σε μια προσπάθεια να αναπτυχθούν νέα εντομοαπωθητικά. Η πρώτη ένωση της ομάδας που βρέθηκε να έχει βιολογικό αποτέλεσμα, ήταν η φυσοστιγμίνη ή αλλιώς εσερίνη. Το αλκαλοειδές αυτό απομονώθηκε από τα φασόλια calabar, την πάστα των οποίων υποχρεώνονταν στη Δυτική Αφρική να φάνε άτομα που είχαν κατηγορηθεί για μαγεία. Εάν τα άτομα πέθαιναν, τότε ήταν ένοχα. Αν όχι, κηρύσσονταν αθώα [62].

Είναι εστέρες του Ν-μέθυλοκαρβαμικού οξέος και χρησιμοποιούνται στη γεωργία, ως εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, νηματοκτόνα ή αναστολείς φύτρωσης. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται ως βιοκτόνα για βιομηχανικές ή άλλες εφαρμογές και για προϊόντα οικιακής χρήσης [63].

Τα πυρεθροειδή αποτελούν τα συνθετικά ανάλογα των πυρεθρινών, ουσιών που απομονώθηκαν από το πύρεθρο, δηλαδή την εντομοκτόνο σκόνη που παρασκευάζονταν εδώ και περισσότερα από 2000 χρόνια από τα αποξηραμένα άνθη ενός είδους χρυσάνθεμου. Οι πρώτες συνθετικές πυρεθρίνες, που παρασκευάστηκαν το 1949 , είχαν την ίδια τοξικότητα με τις φυσικές, ήταν εξ' ίσου φωτοευαίσθητες, αλλά κόστιζαν λιγότερο. Η χρήση των πυρεθροειδών επεκτάθηκε μετά το 1973, όταν οι καινούριες ενώσεις που παρασκευάστηκαν

είχαν ισχυρότερη εντομοκτόνο δράση, μικρότερη τοξικότητα στα θηλαστικά και ήταν σταθερές στο φως [64].

Με το πέρασμα του χρόνου, εμφανίστηκαν έντομα που ανέπτυξαν ανθεκτικότητα σε όλες τις παραπάνω κατηγορίες φυτοφαρμάκων. Μετά από έρευνες δεκαετιών, το 1991 εισήχθη στην αγορά το imidacloprid, ξεκινώντας ουσιαστικά την εποχή των νεονικοτινοειδών. Τα νεονικοτινοειδή οφείλουν το όνομά τους στο γεγονός ότι ο τρόπος δράσης τους είναι ίδιος με την (S)- νικοτίνη [65]. Δεν βιοσυσσωρεύονται, είναι λιγότερο τοξικά για τα θηλαστικά και τα πτηνά, διασπώνται σχετικά γρήγορα και μπορούν να εφαρμοστούν με μεθόδους που χρησιμοποιούν λιγότερα φυτοφάρμακα από τους παραδοσιακούς ψεκασμούς φυλλώματος [66]. Ωστόσο, συσχετίστηκαν με τη διαταραχή κατάρρευσης αποικίας (colony collapse disorder - CCD), ένα φαινόμενο που παρατηρήθηκε αρχικά στις ΗΠΑ στα τέλη του 2006 και αφορούσε στο γεγονός ότι οι μέλισσες δεν επέστρεφαν στην κυψέλη τους. Μόνο μεταξύ του 2014 και του 2019, πάνω από 170 εργασίες έχουν δημοσιευτεί σχετικές με την επίδραση των νεονικοτινοειδών στις μέλισσες οι οποίες συγκλίνουν στο συμπέρασμα ότι οι μη θανατηφόρες επιπτώσεις σε μέλισσες που έχουν μολυνθεί με νεονικοτινοειδή είναι υπεύθυνες μέσω άλλων μηχανισμών (όπως μη αναπαραγωγικές περιόδους ή μεγαλύτερη ευαισθησία σε ιούς ή μύκητες) για την μείωση του πληθυσμού των μελισσών σε παγκόσμιο επίπεδο. Από το 2017 και έπειτα, πολλές χώρες στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.), οι ΗΠΑ και ο Καναδάς προχώρησαν στην απαγόρευσή τους [67].

Σήμερα το 1/3 της παγκόσμιας παραγωγής σε τρόφιμα εξαρτάται από τα φυτοφάρμακα, ενώ υπάρχουν και δευτερεύοντα οφέλη από τη χρήση τους, όπως βελτίωση της διατροφής και της υγείας, μεγαλύτερη ασφάλεια στη χρήση των τροφίμων, ελαττωμένα ιατρικά κόστη για ανθρώπους και ζώα κ.α. [60]. Αυτό έχει σαν συνέπεια η χρήση τους να είναι πλέον απαραίτητη.

Ωστόσο, δεν μπορούμε να παραβλέψουμε τις αρνητικές επιπτώσεις που επιφέρουν τόσο στο περιβάλλον όσο και στους ανθρώπους όπως:

α) Η ρύπανση των υδάτων

β) Η υποβάθμιση του εδάφους μέσω της επίδρασης στην δομή του, στο πορώδες και τις φυσικοχημικές ιδιότητές του, με αποτέλεσμα τη μείωση της κατακράτησης του ύδατος καθώς και περισσότερες απορροές.

γ) Η επίδραση σε φυτά που δεν αποτελούν στόχους, με αποτέλεσμα τη βιοσυσσώρευση των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων κατά μήκος της τροφικής αλυσίδας.

δ) Η αρνητική επίδραση σε ωφέλιμους μικροοργανισμούς και ένζυμα του εδάφους, όπως μικροοργανισμούς που συμμετέχουν στην αποσύνθεση των οργανικών ουσιών και ιδιαίτερα εκείνων που εμπλέκονται στους βιογεωχημικούς κύκλους του αζώτου, του άνθρακα και του φωσφόρου.

ε) Η αρνητική επίδραση σε ωφέλιμους μικροοργανισμούς που ζουν στο νερό και σε άγλη, που δεν αποτελούν στόχους.

στ) Ανάπτυξη αντίστασης στους οργανισμούς-στόχους, καθώς και διασταυρούμενη αντίσταση με άλλα φυτοφάρμακα.

ζ) Η αύξηση των θανάτων στην άγρια πανίδα, σε συνδυασμό με την εξασθένηση ζωτικών λειτουργιών όπως η αναπαραγωγή, καταλήγουν στη διατάραξη της ισορροπίας του οικοσυστήματος, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της βιοποικιλότητας [59].

Το αποτέλεσμα είναι η έρευνα να κατευθύνεται σε μία προσπάθεια ελαχιστοποίησης των αρνητικών συνεπειών της χρήσης των φυτοφαρμάκων με την ανάπτυξη καινούριων ουσιών, λιγότερο τοξικών, περισσότερο εξειδικευμένων, που να αποσυντίθενται πιο γρήγορα. Τα νέα φυτοφάρμακα μπορούμε να τα χωρίσουμε σε δύο κατηγορίες: βιοφυτοφάρμακα και νανοφυτοφάρμακα

Βιοφυτοφάρμακα: Τα βιοφυτοφάρμακα παρασκευάζονται από μικροοργανισμούς, φυτά και ζώα. Αν και ήδη από το 1835 ήταν γνωστό ότι μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τα σπόρια του μύκητα *Beauveria bassiana* για την προστασία του μεταξοσκώληκα από ασθένειες, μόλις τελευταία άρχισε να επεκτείνεται η χρήση τους.

Συνήθως δεν έχουν νευροτοξική δράση, αλλά χρησιμοποιούν εναλλακτικές οδούς, όπως μπλοκάρισμα της λειτουργία των υποδοχέων διεγέρσεως της διατροφής (αντισιτιστική δράση), διαταραχές ζευγαρώματος, αποξήρανση και ασφυξία.

Μπορούν να είναι α) μικρόβια, όπως βακτήρια, μύκητες, ιοί ή πρωτόζωα που προσβάλλουν και σκοτώνουν το παράσιτο β) δευτερογενείς μεταβολίτες των φυτών όπως τερπενοειδή και αλκαλοειδή γ) προστατευτικά ενσωματωμένα στα φυτά (PIP's), τα οποία παράγονται από τα γενετικώς τροποποιημένα φυτά, όπως διάφοροι τύποι κρυσταλλικής πρωτεΐνης (που στη φύση παράγεται από το βακτήριο *Bacillus thuringiensis*) ή δίκλωνου RNA που εμποδίζει το παράσιτο να σχηματίσει κάποιες από τις βασικές του πρωτεΐνες οδηγώντας σε μη θανατηφόρα αποτελέσματα ή θάνατο.

Νανοφυτοφάρμακα: Εκμεταλλεύονται τις ιδιαίτερες ιδιότητες των νανοσωματιδίων για μεταφορά των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Έχουν προταθεί διάφορες μορφές, όπως νανογαλακτώματα, νανο-ενθυλακώσεις, νανο-κυστίδια, νανο-πηκτές, νανο-ίνες [68].

Ωστόσο, η έκθεση ανθρώπων σε επικίνδυνα αγροχημικά που μπορούν να διασχίσουν βιολογικούς φραγμούς (όπως ο αιματεγκεφαλικός φραγμός ή ο πλακούντας), εγκυμονεί κινδύνους. Το εύρος των παρενεργειών οι οποίες περιλαμβάνουν οξείες και χρόνιες παθολογικές εκδηλώσεις σε διάφορα συστήματα όπως το αναπνευστικό το καρδιαγγειακό, το λεμφικό, το νευρολογικό και διάφορους καρκίνους σχετίζονται τόσο με την ατομική ευαισθησία όσο και τον χρόνο έκθεσης στα νανοσωματίδια και μπορεί να εκδηλωθούν αμέσως μετά από έκθεση ή πολλά χρόνια αργότερα ως αποτέλεσμα της βιοσυσσώρευσης. Περαιτέρω έρευνα είναι απαραίτητη, η οποία δεν θα εστιάζει μόνο στις ιδιότητες των δραστικών ουσιών, αλλά και στις φυσικοχημικές ιδιότητες του σκευάσματος [69].

3.2. Υπολείμματα φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον

Σύμφωνα με κάποιες εκτιμήσεις, λιγότερο από το 1% της ποσότητας των φυτοφαρμάκων φτάνει στον οργανισμό – στόχο. Το υπόλοιπο, εισάγεται στο περιβάλλον [70] με αποτέλεσμα υπολείμματα φυτοφαρμάκων να ανιχνεύονται σε όλα τα σημεία της υδρογείου, στο έδαφος, τα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα και την ατμόσφαιρα. Βρέθηκαν, ήδη από το 1966 ακόμα και στην Ανταρκτική, σε απόσταση χιλιάδων χιλιομέτρων από το σημείο εφαρμογής τους [71].

Μετά την εφαρμογή του, το φυτοφάρμακο υφίσταται μια σειρά διαδικασιών φυσικών, χημικών και βιολογικών που οδηγούν είτε στην αποδόμησή του είτε στη μεταφορά του μέσω του νερού ή/και του ανέμου.

Η αποδόμηση γίνεται με διεργασίες όπως η οξείδωση, η αναγωγή, η φωτοδιάσπαση και η υδρόλυση. Στην όλη πορεία, ενδέχεται να συμμετέχουν μικροοργανισμοί. Τα προϊόντα των αντιδράσεων συχνά έχουν δραστικότητα και τοξικότητα διαφορετική από αυτή των αρχικών ενώσεων.

Στη μεταφορά, συμμετέχουν διεργασίες όπως η πρόσληψη από τα φυτά, η προσρόφηση από το έδαφος, η έκπλυση, η επιφανειακή απορροή και η εξάτμιση. Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη συμπεριφορά των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον, που σχετίζονται α) με το ίδιο το φυτοφάρμακο όπως η διαλυτότητα στο νερό, το μοριακό βάρος, η πολικότητα των

ενώσεων και η πτητικότητα, β) με το έδαφος στο οποίο βρίσκεται η καλλιέργεια όπως η μηχανική και χημική του σύσταση, το είδος των κολλοειδών της αργίλου, η ικανότητα ανταλλαγής ιόντων αλλά και το είδος και ποσοστό της περιεχόμενης οργανικής ύλης και γ) με τις συνθήκες που επικρατούν κατά την περίοδο της εφαρμογής όπως η δόση και ο τρόπος εφαρμογής, η θερμοκρασία, η ποσότητα και η ένταση της βροχόπτωσης [72].

3.3. Μέγιστα όρια υπολειμμάτων (MRL)

Με σκοπό τη διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών και τη διευκόλυνση του εμπορίου μεταξύ των κρατών μελών της Ε.Ε., καθώς και μεταξύ Ε.Ε. και Τρίτων Χωρών, έχουν θεσπιστεί τα μέγιστα όρια υπολειμμάτων (Maximum Residue Levels – MRL). Το MRL ωστόσο, δεν αποτελεί τοξικολογική παράμετρο της υπό έλεγχο ουσίας, γι' αυτό και η, κατά περίπτωση, υπέρβασή του, δεν είναι νόμιμη μεν από εμπορικής πλευράς, αλλά μπορεί να είναι ασφαλής για την ανθρώπινη υγεία.

Το MRL σε προϊόντα φυτικής προέλευσης ορίζεται ως η μέγιστη αναμενόμενη ποσότητα υπολείμματος όταν εφαρμόζεται ένα φυτοπροστατευτικό προϊόν σε μία καλλιέργεια σύμφωνα με την Ορθή Γεωργική Πρακτική δηλαδή τον τρόπο εφαρμογής του στην καλλιέργεια, ο οποίος εξασφαλίζει την αποτελεσματικότητα στην χρήση, έχοντας ως κύριες παραμέτρους τη δόση ανά επιφάνεια (gr ή cm^3 φυτοπροστατευτικού προϊόντος ανά στρέμμα ή εκτάριο), τον αριθμό των εφαρμογών του φυτοπροστατευτικού προϊόντος, τον ψεκαστικό όγκο (lt νερού ανά στρέμμα ή εκτάριο), καθώς και την τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (ημέρες).

Για να καθορισθεί το MRL αρχικά υπολογίζεται το όριο υπολείμματος της υπό έλεγχο φυτοπροστατευτικής ουσίας η οποία εφαρμόστηκε στην καλλιέργεια του ενδιαφέροντος φυτού με εργαστηριακή ανάλυση. Αυτό γίνεται με βάση τη «χειρότερη» Ορθή Γεωργική Πρακτική, δηλαδή εφαρμόζοντας τη μεγαλύτερη δόση φυτοπροστατευτικού προϊόντος, τους περισσότερους ψεκασμούς και τη συντομότερη, χρονικά, τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (πείραμα αγρού).

Τα πειράματα και οι αναλύσεις πραγματοποιούνται από ομάδες διαπιστευμένες για αυτό το σκοπό, σύμφωνα με τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (Ευρωπαϊκή Οδηγία 93/71) [73].

Το όριο υπολείμματος συσχετίζεται με την ημερήσια διατροφική κατανάλωση του συγκεκριμένου προϊόντος φυτικής προέλευσης, σε ευρωπαϊκό ή εθνικό επίπεδο, και χρησιμοποιείται για να εκτιμηθεί ο βαθμός έκθεσης των καταναλωτών.

Για την ακρίβεια, η θεωρητική ημερήσια λήψη της ουσίας συγκρίνεται με την Ημερήσια Αποδεκτή Λήψη από την τροφή (Acceptable Daily Intake ή ADI), η οποία προέρχεται από την αξιολόγηση της χρόνιας τοξικολογικής έκθεσης του ανθρώπου στην υπό εξέταση ουσία (mg ουσίας ανά kg βάρους σώματος ανθρώπου), αλλά και την Οξεία Δόση Αναφοράς (Acute Reference Dose ή ARfD) που υπολογίζεται από την αξιολόγηση της βραχυπρόθεσμης τοξικολογικής έκθεσης του ανθρώπου στη συγκεκριμένη ουσία (mg ουσίας ανά kg βάρους σώματος ανθρώπου / ημέρα).

Εαν το αποτέλεσμα είναι μικρότερο αριθμητικά από το όριο της Ημερήσιας Αποδεκτής Λήψης τροφής και της Οξείας Δόσης Αναφοράς (εφ' όσον έχει καθοριστεί), τότε αυτό ορίζεται ως MRL [73].

Τα MRL για τα τρόφιμα καθορίζονται στον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 396/2005 και στα αντίστοιχα Παραρτήματα. Αν δεν έχει καθοριστεί συγκεκριμένο MRL, τότε έχει προκαθοριστεί η τιμή 0,01 mg/Kg. Ωστόσο, αυτός ο κανονισμός δεν ισχύει αν τα φυτικά προϊόντα δεν προορίζονται για παραγωγή τροφής για ανθρώπους ή ζώα [74].

Η χρήση της αποξηραμένης λεβάντας στη μαγειρική δεν είναι διαδεδομένη. Ενίοτε όμως, χρησιμοποιείται ως μπαχαρικό. Τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων που τυχόν περιέχει μπορεί να γίνουν ακόμη χαμηλότερα διότι είναι γνωστό πως φυσικοχημικές διαδικασίες όπως η θέρμανση ή η επεξεργασία στον ατμό ελαττώνουν τα επίπεδα φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα [75]. Αυτός είναι ίσως ο λόγος που δεν έχουν θεσπιστεί MRLs προς το παρόν για την αποξηραμένη λεβάντα. Ωστόσο έχουν θεσπιστεί MRLs για το έκχυμά της.

Όσον αφορά τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε βότανα που χρησιμοποιούνται φαρμακευτικά, στο βιβλίο της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας (Κεφ. 2.8.13, 10^η έκδοση) περιέχεται κατάλογος μερικών φυτοπροστατευτικών ουσιών και τα αντίστοιχα όριά τους.

Οι ουσίες που δεν αναφέρονται σε αυτό τον κατά, και των οποίων υπάρχει υπόνοια παρουσίας, υποχρεούνται να συμμορφώνονται με τα όρια που ορίζονται από το νομικό πλαίσιο που ισχύει για τα τρόφιμα (κανονισμός νο 396/2005).

Εάν κάποια φυτοπροστατευτικά δεν αναφέρονται ούτε στο Κεφάλαιο 2.8.13 της Ευρωπαϊκής Φαρμακοποιίας ούτε στα παραρτήματα του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 396/2005, το μέγιστο όριο υπολειμμάτων υπολογίζεται χρησιμοποιώντας την σχέση

$$\frac{ADI * M}{MDD_{HD} * 100} \quad \text{Εξίσωση 1}$$

όπου

ADI: Ημερήσια Αποδεκτή Λήψη όπως ορίζεται από τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (mg/Kg σωματικού βάρους)

M: Σωματικό βάρος (Kg) (Για τον υπολογισμό παίρνουμε ένα μέσο βάρος 60 Kg)

MDD_{HD}: Ημερήσια δόση του φαρμακευτικού βοτάνου (Kg).

Εάν το βότανο χρησιμοποιείται για την παρασκευή του φαρμάκου, τότε τα MRL των φυτοφαρμάκων στο παρασκεύασμα υπολογίζονται ως εξής :

$$\text{Αν } DER \leq 10 \quad MRL_{HD} * DER \quad \text{Εξίσωση 2}$$

$$\text{Αν } DER > 10 \quad \frac{ADI * M}{MDD_{HP} * 100} \quad \text{Εξίσωση 3}$$

Όπου:

DER (drag/extract ratio): αναλογία φαρμάκου/εκχυλίσματος, δηλαδή η αναλογία μεταξύ της ποσότητας του φαρμακευτικού φυτού που χρησιμοποιείται στην παρασκευή ενός φυτικού φαρμάκου και της ποσότητας του παρασκευάσματος που λαμβάνεται.

MRL_{HD}: μέγιστο όριο υπολειμμάτων του φυτοφαρμάκου στο φυτικό φάρμακο, όπως δίνεται στην Ευρωπαϊκή Φαρμακοποιία ή στα κείμενα της Ε.Ε. ή υπολογίζονται με χρήση της Εξίσωσης 1

MDD_{HP}: ημερήσια δόση του φαρμακευτικού παρασκευάσματος (kg) [76].

Το αιθέριο έλαιο της λεβάντας είναι ένα από τα αιθέρια έλαια που έχουν «Γενικώς Χαρακτηρισθεί Ως Ασφαλή» (Generally Recognized As Safe - GRAS) και έχουν εγκριθεί να χρησιμοποιηθούν ως αρωματικά ή συντηρητικά σε τρόφιμα από την ΕΕ και τον United States Food and Drug Administration (FDA) [77].

Για τα αιθέρια έλαια δεν έχουν θεσπιστεί συγκεκριμένα MRLs. Δεν είναι εύκολο, καθώς παράγονται σε πολλές περιοχές παγκοσμίως, με αποτέλεσμα η πρώτη ύλη να είναι αποτέλεσμα διαφορετικών γεωργικών πρακτικών, και μάλιστα σε κάποιες περιπτώσεις φυτοφάρμακα που επιτρέπονται σε μία περιοχή να απαγορεύονται σε κάποια άλλη [78]. Για όσα αιθέρια έλαια χρησιμοποιούνται για φαρμακευτικούς σκοπούς, θα μπορούσαν όμως να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των MRL οι εξισώσεις 2 και 3.

3.4. Προστασία της καλλιέργειας της λεβάντας

Η λεβάντα είναι ένα φυτό το οποίο δεν έχει ανάγκη υψηλής προστασίας καθώς πλήθος από τα συστατικά του αιθέριου ελαίου της την προστατεύουν από διάφορες ασθένειες και παράσιτα (Πίνακας 1).

Ωστόσο, κατά τη συστηματική της καλλιέργεια, σύμφωνα με το υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, χρησιμοποιούνται οι δραστικές ουσίες που αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα [79].

Το μεγαλύτερο μέρος των φυτοπροστατευτικών ουσιών αποτελείται από βιοφυτοφάρμακα, είτε η καλλιέργεια είναι στο θερμοκήπιο είτε στην ύπαιθρο. Και στα δύο είδη καλλιέργειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως εντομοκτόνο και το κραμβέλαιο. Εάν πρόκειται για καλλιέργεια θερμοκηπίου, υπάρχει επιπλέον η δυνατότητα χρησιμοποίησης του σακχάρου μαλτοδεξτρίνη, που δεν είναι επικίνδυνο για τον άνθρωπο. Το μόνο φυτοπροστατευτικό που παρασκευάζεται τεχνικά είναι το pendimethalin (που ανήκει στην κατηγορία των δινιτροανιλινών). Κατά συνέπεια, από καλλιέργειες που προέρχονται από τον ελλαδικό χώρο τουλάχιστον, αναμένεται να ανιχνευθούν υπολείμματα μόνο του pendimethalin ενώ οτιδήποτε άλλο οφείλεται είτε σε παράτυπη χρήση από τον καλλιεργητή είτε σε επιμόλυνση.

Πίνακας 2: Προστασία της καλλιέργειας της λεβάντας

	ΛΕΒΑΝΤΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ	ΛΕΒΑΝΤΑ ΥΠΑΙΘΡΟΥ
Κατηγορία φυτοπροστατευτικού		
ΜΥΚΗΤΟΚΤΟΝΟ	Bacillus amyloliquefaciens (former subtilis) QST 7	Bacillus amyloliquefaciens (former subtilis) QST 7
	Trichoderma harzianum strain T-22	Trichoderma harzianum strain T-22
ΝΗΜΑΤΩΔΟΚΤΟΝΟ	Bacillus firmus I-1582	Bacillus firmus I-1582
	Purpureocillium lilacinum strain 251 (former Paeci)	Purpureocillium lilacinum strain 251 (former Paeci)
ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΟ	Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus (HearNPV)	Helicoverpa armigera nucleopolyhedrovirus (HearNPV)
	Plant oils/ Rape seed oil (Κραμβέλαιο)	Plant oils/ Rape seed oil (Κραμβέλαιο)
	Maltodextrin	
ZIZANIOΚΤΟΝΟ		Pendimethalin

4. Μέθοδοι προσδιορισμού φυτοφαρμάκων

4.1. Απομόνωση φυτοφαρμαμάκων από το υπόστρωμα

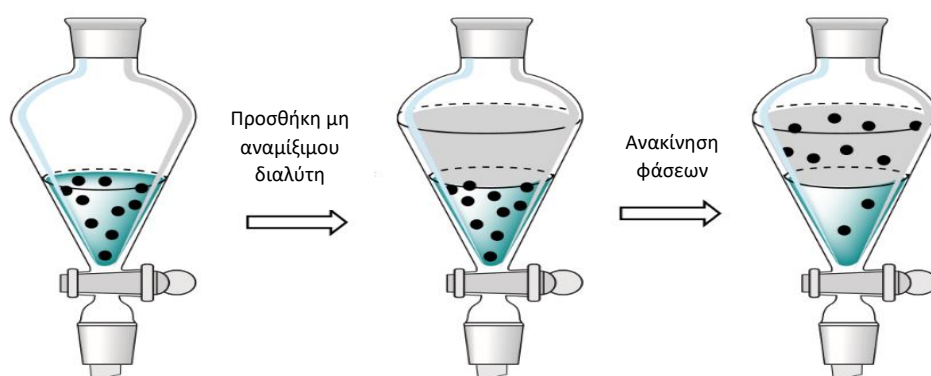
Η έκθεση των ανθρώπων στα φυτοφάρμακα έχει συνδεθεί με πλήθος παθολογικές καταστάσεις, διότι, λόγω του φαινομένου της βιοσυσσώρευσης, ακόμα και πολύ μικρές ποσότητες μπορούν να οδηγήσουν σε σοβαρά προβλήματα υγείας με το πέρασμα του χρόνου. Κατ' επέκταση, υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης ιχνών (της τάξης των μg ή ng) πολλαπλών υπολειμμάτων για πολλές κατηγορίες φυτοφαρμάκων.

Το πρώτο βήμα για τον σωστό προσδιορισμό, είναι η συλλογή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος. Η Ευρωπαϊκή ένωση έχει εκδώσει κανονισμούς και οδηγίες που προβλέπουν τον τρόπο δειγματοληψίας στα τρόφιμα, ανάλογα με την υπό εξέταση κατηγορία υπολειμμάτων. Για τα φυτοφάρμακα ισχύει η οδηγία 2002/63.

Ακολουθεί η μεταφορά σε καθαρό περιέκτη (συνήθως γυάλινο) και η φύλαξη, λαμβάνοντας τα κατάλληλα μέτρα ώστε να μην υπάρξει επιμόλυνση ή αλλοίωση του δείγματος [80].

Επειδή τα τρόφιμα αποτελούν πολύπλοκα υποστρώματα, στη συνέχεια απαιτείται η απομόνωση των προς εξέταση ουσιών, με κάποια μέθοδο εκχύλισης.

4.1.1. Εκχύλιση υγρού - υγρού



Εικόνα 14 : Εκχύλιση υγρού-υγρού

[81]

Η πρώτη αξιοσημείωτη πολλαπλών κατηγοριών και πολύ-υπολειμματική μέθοδος (multiclass multiresidue methods - MRM) ανάλυσης φυτοφαρμάκων, ήταν η μέθοδος Mills που στηρίζεται στην απομόνωση των φυτοφαρμάκων με εκχύλιση υγρού-υγρού. Η μέθοδος Mills αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1960 από τον χημικό P.A. Mills του FDA, επικεντρώνονταν

κυρίως στα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα και, με την πάροδο των χρόνων, τροποποιήθηκε ώστε να χρησιμοποιηθεί και για άλλες ενώσεις.

Με τη μέθοδο αυτή, τα οργανοχλωριωμένα και άλλα μη πολικά φυτοφάρμακα εξάγονταν από μη λιπαρά τρόφιμα με ακετονιτρίλιο (MeCN), το οποίο στη συνέχεια αραιώνονταν με νερό, και τα φυτοφάρμακα κατανέμονταν σε μη πολικό διαλύτη (πετρελαϊκός αιθέρας) [82]. Η απομόνωση των φυτοφαρμάκων εξαρτάται από τις σχετικές διαλυτότητές τους α) μεταξύ του διαλύτη εκχύλισης και του υποστρώματος του δείγματος και β) μεταξύ του διαλύτη εκχύλισης και του μη αναμίξιμου διαλύτη που προστίθεται στη συνέχεια.

Συνεπώς, τα σχετικά πολικά φυτοφάρμακα χάνονταν εν μέρει κατά τη διάρκεια του δεύτερου βήματος, όπως για παράδειγμα ορισμένα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (OPs). Για να γίνει εφικτή η απομόνωσή τους, όπως και άλλων φυτοφαρμάκων, η μέθοδος τροποποιήθηκε στα στάδια του διαχωρισμού και του καθαρισμού.

Στη δεκαετία του 1970, αναπτύχθηκαν και άλλες παρόμοιες μέθοδοι, που χρησιμοποίησαν άλλους διαλύτες εκχύλισης, όπως μεθανόλη και ακετόνη αντί για ακετονιτρίλιο και προστέθηκε NaCl στην υδατική φάση, για την αύξηση του κορεσμού, ώστε να κατανεμηθεί μεγαλύτερη ποσότητα του διαλύτη εκχύλισης στην οργανική φάση και να αυξηθούν οι ανακτήσεις. Ως μη αναμίξιμοι διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν επίσης εξάνιο, αιθέρας και οξικός αιθυλεστέρας. Κάποιες από αυτές, όπως η μέθοδος Becker και η μέθοδος Luke χρησιμοποιήθηκαν ως επίσημες μέθοδοι [82].

Η εκχύλιση υγρού- υγρού, παρουσιάζει τα εξής μειονεκτήματα

- δεν αρμόζει σε όλες τις ομάδες ενώσεων
- η εκλεκτικότητα των διαλυτών εκχύλισης είναι μικρή
- είναι απαραίτητες μεγάλες ποσότητες δείγματος
- απαιτείται μεγάλος όγκος οργανικού διαλύτη
- Είναι πιθανό να σχηματιστούν γαλακτώματα
- είναι αρκετά χρονοβόρα μέθοδος
- το άτομο που εκτελεί την ανάλυση εκτίθεται σε διαλύτες

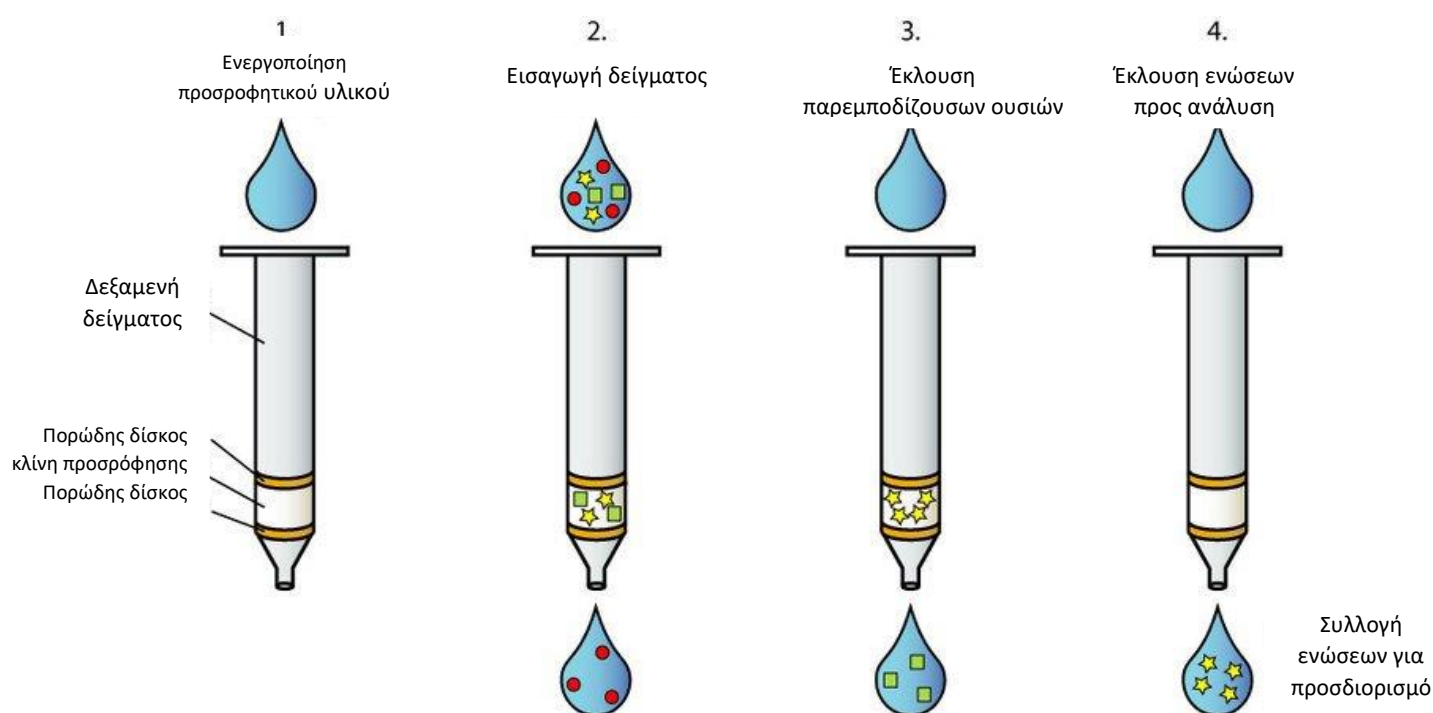
Για τους παραπάνω λόγους έγιναν προσπάθειες αντικατάστασης της εκχύλισης υγρού-υγρού με άλλες μεθόδους [83]

4.1.2. Εκχύλιση στερεάς φάσης (υγρού-στερεού)

Από τη δεκαετία του 1980, ο Casanova και οι Nordenmeyer και Thier εισήγαγαν την εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction - SPE) για να απομονώσουν φυτοφάρμακα από αραιωμένα εκχυλίσματα ακετόνης [82]

Η εκχύλιση στερεάς φάσης, αναπτύχθηκε ως εναλλακτική της εκχύλισης υγρού-υγρού γιατί ελαχιστοποιεί την ποσότητα του διαλύτη που χρησιμοποιείται, το χρόνο εργασίας, το υψηλό κόστος και τις πιθανές πηγές σφάλματος. Επίσης παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία, υψηλή επιλεκτικότητα και δυνατότητα αυτοματοποίησης [84].

Η SPE χρησιμοποιεί την επιλεκτική απορρόφηση και έκλυση ώστε να εμπλουτιστούν, να διαχωριστούν και να καθαριστούν τα δείγματα και περιλαμβάνει τα παρακάτω βήματα



Εικόνα 15: Εκχύλιση στερεάς φάσης

[85]

- Ενεργοποιούνται οι δραστικές ομάδες του προσροφητικού υλικού ώστε να αλληλεπιδράσει με το δείγμα – εκπλύνεται το προσροφητικό υλικό με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη (CH_3OH , CH_3CN , H_2O , κ.α).
- Εισάγεται το δείγμα
- Εκπλύνεται το προσροφητικό υλικό με μια ακολουθία διαφορετικών διαλυτών για απομακρυνθούν οι παρεμποδίζουσες ενώσεις. Οι διαλύτες επιλέγονται με προσοχή

ώστε να μην εκροφηθούν και οι ενώσεις που εξετάζονται. Στη συνέχεια μπορεί να ακολουθεί ξήρανση του προσροφητικού.

- Το προσροφητικό υλικό εκλούεται με κατάλληλο διαλύτη για να παραληφθούν εκλεκτικά οι ενώσεις [83].

Η SPE παρέχει τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθούν διαφορετικές τεχνικές διαχωρισμού, όπως η προσρόφηση, η κατανομή και η ιοντοανταλλαγή. Η στατική φάση μπορεί να είναι πολική όπως πυρίτιο ή αλουμίνα, ή μη πολική όπως το C18 (οκταδεκυλοσιλυλο-παραγώγο πυρίτιο) και το πολυμερές SDVB (styrene-divinylbenzene) [84].

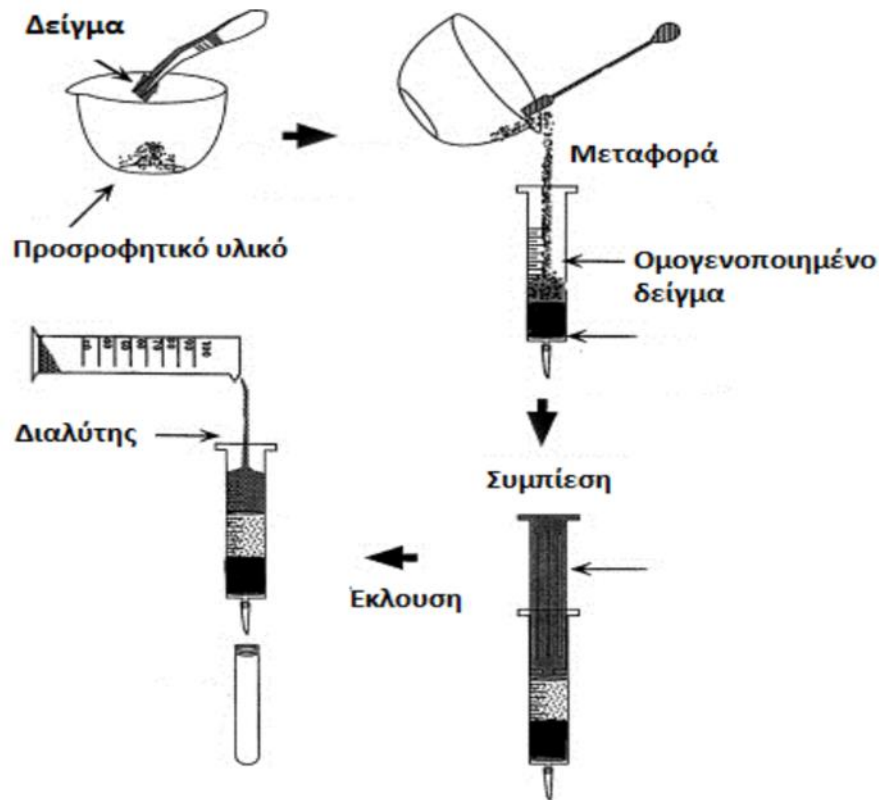
Οι διαλύτες διαβιβάζονται με διάφορες τεχνικές όπως: υπό κενό σε ειδικές συσκευές, φυγοκέντριση ή μηχανική άσκηση πίεσης.

Η επιλογή τόσο της στατικής φάσης όσο και του διαλύτη, εξαρτώνται από τις αναλυόμενες ουσίες, το υπόστρωμα από το οποίο απομονώνονται, και τις παρεμποδίζουσες ουσίες. Ο δε διαχωρισμός στηρίζεται σε διάφορες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ τους, όπως οι δυνάμεις Van der Waals, οι δεσμοί υδρογόνου, οι δεσμοί δίπολου-δίπολου ή ανταλλαγές ιόντων [86].

4.1.3. Εκχύλιση με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση

Κατά τη δεκαετία του 1990, η ανάγκη για περαιτέρω μείωση της χρήσης διαλυτών και της χειρωνακτικής εργασίας οδήγησε στην εισαγωγή διαφόρων εναλλακτικών τεχνικών εκχύλισης. Η εκχύλιση με διασπορά του υποστρώματος σε στερεά φάση (matrix solid-phase dispersion – MSPD) είναι μία από αυτές [82]. Εισήχθηκε το 1989 από τους S.A. Barker et al. για την εκχύλιση υπολειμμάτων φαρμάκων από ζωικό ιστό. Επιτυγχάνει ελαχιστοποίηση μεγέθους-ομογενοποίηση, εκχύλιση, φιλτράρισμα και καθαρισμό δείγματος σε ένα βήμα και είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για στερεά, ημιστερεά και παχύρρευστα δείγματα .

Τα στάδια εφαρμογής της περιλαμβάνουν:



Εικόνα 16: Σχηματική παρουσίαση μιας τυπικής εκχύλισης MSPD

[88]

- Ανάμιξη του μίγματος με προσροφητικό και ομογενοποίηση. Με την άμεση μηχανική ανάμιξη του δείγματος με το προσροφητικό, παράγεται ένα ημίξηρο, ομοιογενές υλικό. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες του προσροφητικού επηρεάζουν σημαντικά τον επακόλουθο εμπλουτισμό και τον προσδιορισμό των ενώσεων-στόχων καθώς κατά τη διάρκεια της διαδικασίας, αναπτύσσονται δυνάμεις διάτμησης και το στερεό προσροφητικό καταστρέφει τη δομή του δείγματος, προάγοντας έτσι την απελευθέρωση των ενώσεων-στόχων από το υπόστρωμα. Τα κλασικά προσροφητικά, που συνήθως διαθέτουν μεγάλες ειδικές επιφάνειες και ισχυρές ικανότητες προσρόφησης, όπως το πυριτικό μαγνήσιο (florisil), το πυρίτιο, η αλουμίνα και ο διατομίτης, έχουν διερευνηθεί εκτενώς. Τα τελευταία χρόνια, ωστόσο, έχουν ξεχωρίσει μερικά από τα εναλλακτικά προσροφητικά, όπως τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (Molecularly imprinted polymers -MIPs), που χρησιμοποίησαν οι Gholami et al. για την ανίχνευση μελαμίνης σε δείγματα γάλακτος, το τροποποιημένο γραφένιο που χρησιμοποιήθηκε από τους Sun et al. για την απομόνωση, τον καθαρισμό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φλαβονοειδών στα φύλλα του *Murraya ranunculata* (L.) Jack και διάφορα είδη νανοϋλικών [87].

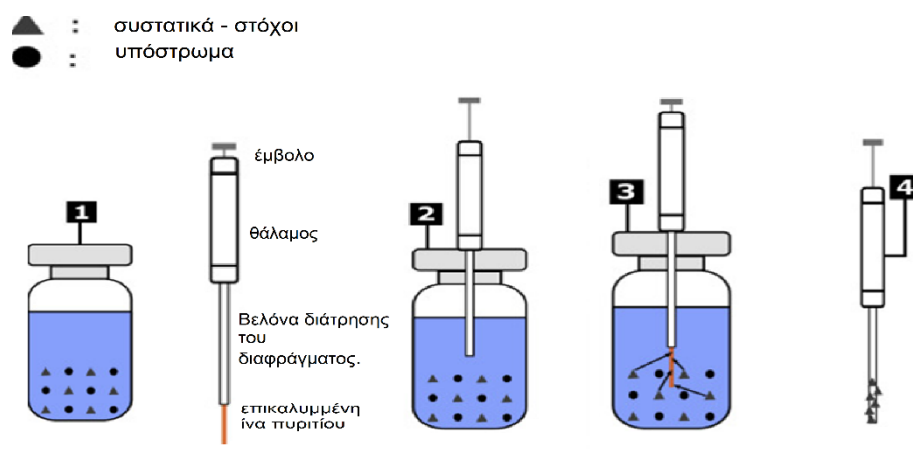
- Τοποθέτηση του ομογενοποιημένου μείγματος σε μια στήλη SPE ανάμεσα από δύο ηθμοειδή πλακίδια, και ελαφρά συμπίεση στη συνέχεια, ώστε να μην μείνουν κενά.
- Έκλυση. Οι συνηθισμένοι διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη, το ακετονιτρίλιο και η ακετόνη, παρέχουν υψηλή πολικότητα, αλλά συνήθως προτιμώνται τα μίγματα μεθανόλης- νερού για την εξαγωγή συστατικών με υψηλή πολικότητα. Ωστόσο, αυτοί οι οργανικοί διαλύτες έχουν τοξικότητα και συνήθως συνεκχυλίζουν μεγάλο αριθμό ενώσεων από το υπόστρωμα. Κατά συνέπεια, ένα μέρος της έρευνας προσανατολίζεται στην εύρεση εναλλακτικών διαλυτών έκλυσης, όπως τα ιονικά υγρά για να ξεπεραστούν τα μειονεκτήματα [87].

Η MSPD πλεονεκτεί σε σχέση με την SPE γιατί α) δίνει τη δυνατότητα να κατανεμηθεί πλήρως το δείγμα και να διασπαρεί σε σωματίδια πολύ μικρού μεγέθους, γεγονός που οδηγεί σε αύξηση της επιφάνειας επαφής και, συνεπώς, σε πιο αποτελεσματική εκχύλιση του δείγματος β) Στην MSPD προσροφάται σε όλη τη μάζα του προσροφητικού ενώ στην SPE, το δείγμα συνήθως προσροφάται στην κορυφή του υλικού πάκτωσης της μικροστήλης [88]. γ) Οι φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις των συστατικών του συστήματος είναι πιο έντονες στην MSPD και διαφορετικές, από ορισμένες απόψεις, από αυτές που παρατηρούνται στην κλασική SPE δ) Στην MSPD η διάσπαση του δείγματος διεξάγεται ταυτόχρονα με την εκχύλιση ενώ στην προετοιμασία δειγμάτων για SPE η διάσπαση του δείγματος πρέπει να διεξάγεται ως ξεχωριστό βήμα. ε) Η MSPD χειρίζεται απευθείας στερεά ή παχύρρευστα υγρά δείγματα ενώ τα δείγματα για SPE πρέπει να είναι σε υγρή μορφή, σχετικά απαλλαγμένα από στερεά και μέτριοι ιξώδους πριν από την προσθήκη στη στήλη [89].

4.1.4. Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (solid-phase microextraction - SPME) κατοχυρώθηκε ως ευρεσιτεχνία το 1989 από τον Pawliszyn και τους συνεργάτες του. Η Supelco (Bellefonte, ΗΠΑ) παρουσίασε την πρώτη εμπορική συσκευή SPME το 1993, η οποία βελτιώθηκε το 2001 με μια προσαρμοσμένη βάση για δειγματοληψία.

Η συσκευή SPME είναι μια ίνα, η οποία περιέχεται σε μια βελόνα από ανοξείδωτο χάλυβα επικαλυμμένη με υγρό ή στερεό προσροφητικό υλικό [90]. Η στατική φάση που χρησιμοποιήθηκε στην ανάπτυξη της ήταν το πολυμερές polydimethylsiloxane (PDMS). Σήμερα ωστόσο, η SPME διατίθεται σε πλήθος φάσεων [84]. Εφαρμόστηκε για τη δειγματοληψία διαφόρων αναλυτών από διαφορετικά υποστρώματα, είτε αέρια είτε υγρά. Λόγω της γεωμετρίας της, τα μεγαλύτερα μειονεκτήματά της είναι η ευθραυστότητα και η έλλειψη σταθερότητας, για τις οποίες γίνονται μελέτες ώστε να αντιμετωπιστούν [90].



Εικόνα 17: Σχηματική παρουσίαση εκχύλισης SPME

Στην εκχύλιση SPME: 1) το δείγμα τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο 2) η βελόνα SPME εισάγεται με την ίνα SPME ανασυρμένη 3) οι ίνες SPME βυθίζονται στο δείγμα και οι ενώσεις -στόχοι εμπλουτίζουν τις ίνες 4) Η βελόνα SPME αφαιρείται [91].

Στη συνέχεια, η βελόνα τοποθετείται στο θερμό εισαγωγέα χρωματογράφου, όπου οι ουσίες εκροφώνται από την ίνα, εξαιτίας της υψηλής θερμοκρασίας και διαβιβάζονται στην στήλη του αέριου χρωματογράφου.

Η SPME επηρεάζεται από διάφορες παραμέτρους της δειγματοληψίας όπως η θερμοκρασία και ο χρόνος που διαρκεί, η ιοντική δύναμη και η ανάδευση κατά τη διάρκειά της [84].

Η SPME μοιάζει με την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), γιατί περιλαμβάνει τις ίδιες διεργασίες για την κατανομή των ουσιών προς ανάλυση, από το υπόστρωμα του δείγματος στις φάσεις εκχύλισης. Σε αντίθεση με αυτή, είναι μια μη εξαντλητική μέθοδος εκχύλισης και όταν οι προς ανάλυση ουσίες φτάσουν στην ισορροπία κατανομής μεταξύ του υποστρώματος και των φάσεων εκχύλισης, οι ποσότητές τους είναι στο μέγιστο. Η

κατάσταση ισορροπίας θεωρείται συχνά ότι επιτυγχάνεται όταν η εξαγόμενη προς ανάλυση ουσία είναι αρκετά κοντά στη θεωρητική ποσότητα [92].

4.1.5. Εκχύλιση QuEChERS

Οι υπάρχουσες μέχρι το 2000 MRMs, δεν μπορούσαν να επιτύχουν μια γρήγορη και εύκολη εκχύλιση και ταυτόχρονα να διατηρήσουν υψηλές ανακτήσεις για μια ευρεία γκάμα ενώσεων, παρέχοντας την επιλεκτικότητα και επαναληψιμότητα που χρειάζεται μία αξιόπιστη τεχνική. Επίσης, δεν χρησιμοποιούσαν τα πλεονεκτήματα και τις δυνατότητες που παρείχαν οι καινούριες αναλυτικές τεχνικές, καθώς δεν τις είχαν ενσωματώσει [82], ενώ παράλληλα έγινε επιτακτική η ανάγκη για ελάττωση των ποσοτήτων των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και της χειρωνακτικής εργασίας.

Ο Michelangelo Anastassiades και οι συνεργάτες του επιχείρησαν να αναπτύξουν μία MRM η οποία θα ελάττωνε τα βήματα της διαδικασίας απλοποιώντας την εκχύλιση και τον καθαρισμό, χωρίς να θυσιάζει τις υψηλές ανακτήσεις ακόμα και για τις πιο δύσκολες ενώσεις και θα χρησιμοποιούσε λίγα αντιδραστήρια, σε μικρές ποσότητες και λίγα σκεύη [82].

Η μέθοδος στην οποία κατέληξαν και δημοσίευσαν το 2003, ονομάστηκε QuEChERS, από τα αρχικά των λέξεων Quick (γρήγορη), Easy (εύκολη), Cheap (οικονομική), Effective (αποτελεσματική), (ανθεκτική), και Safe (ασφαλής). Αυτές οι ιδιότητες βοήθησαν α) στην εξάπλωσή της για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων πέτρα από τα φρούτα και λαχανικά, για τα οποία αρχικά σχεδιάστηκε, και σε διάφορα άλλα υποστρώματα, όπως ψάρι και ψαροτροφή [93], διάφορα είδη κρέατος, αυγά και γάλα [94], λιναρόσπορο και φυστίκια [95], ελαιόλαδο [96] και άλλα βρώσιμα έλαια [97], οίνο [98], νερό και ιζήματα [99] και β) στην τροποποίηση της, ώστε να μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε υπολείμματα άλλων υλικών, όπως στην ανάλυση μυκοτοξινών στη μύρα [100], στην παρακολούθηση των φαρμακευτικών ουσιών και των μεταβολιτών τους στα ψάρια [101], στον προσδιορισμό κτηνιατρικών φαρμάκων σε ιστό ζώων [102] και γάλα [103], θαλάσσιων τοξινών σε οστρακοειδή [104], πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) σε διάφορα είδη τσαγιού [105], πτητικές φαινόλες σε μπύρες, κρασιά και φρουτοχυμούς [106] κ.α.

Η QuEChERS μπορεί να θεωρηθεί ως μία διαδικασία δύο βημάτων. Το πρώτο βήμα είναι η εκχύλιση των ενώσεων που ενδιαφέρουν, από το δείγμα. Το δεύτερο είναι ο καθαρισμός, στον οποίο αφαιρούνται από το εκχύλισμα πολλές ουσίες που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανάλυση.

Το στάδιο της εκχύλισης ξεκινά με την ομογενοποίηση του υποστρώματος, η οποία παράγει ένα ομοιόμορφο δείγμα που αντιπροσωπεύει όλο το προϊόν και βελτιώνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των επιθυμητών ουσιών [107]. Βρέθηκε ότι 2-3 g καλώς ομογενοποιημένου δείγματος με την κατάλληλη τεχνική, δίνει εξ' ίσου αξιόπιστα αποτελέσματα με μεθόδους που χρησιμοποιούσαν 50 – 100 g, κάνοντας την QuEChERS κατάλληλη και για κινητά εργαστήρια για τα οποία επίσης προορίζεται [82].

Οι βέλτιστες συνθήκες τόσο για το κυρίως στάδιο της εκχύλισης όσο και για τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό επηρεάζονται από διάφορους παράγοντες, όπως:

- 1) Η σύσταση του δείγματος (π.χ. pH, περιεκτικότητα σε νερό, λιπίδια, σάκχαρα).
- 2) Ο τύπος διαλύτη εκχύλισης.
- 3) Η αναλογία δείγματος προς διαλύτη.
- 4) Η διαδικασία εκχύλισης (π.χ. ανάμειξη ή ανακίνηση).
- 5) Η θερμοκρασία εξαγωγής (η πίεση είναι μια άλλη πιθανή παράμετρος αλλά ισχύει μόνο όταν εφαρμόζονται πολύ υψηλές θερμοκρασίες).
- 6) Η αρχή του διαχωρισμού φάσης (π.χ. προσθήκη ή μη πολικών συνδιαλυτών και/ή αλάτων).
- 7) Ο χρόνος ανάμειξης ή ανακίνησης και ο αριθμός επαναλήψεων.
- 8) Τα υλικά που χρησιμοποιούνται για καθαρισμό.

Για την επιλογή του διαλύτη λαμβάνονται υπ' όψην:

- 1) Η ικανότητα κάλυψης του επιθυμητού αναλυτικού φάσματος.
- 2) Η επιλεκτικότητα που μπορεί να επιτευχθεί κατά την εξαγωγή, τον διαχωρισμό και τον καθαρισμό.
- 3) Η επίτευξη διαχωρισμού από το νερό.
- 4) Η καταλληλότητα σε διάφορες τεχνικές χρωματογραφικού διαχωρισμού (π.χ. SPE, GC, LC, GPC).
- 5) Το κόστος και η ασφάλεια για τους ανθρώπους το περιβάλλον.
- 6) Η ευκολία χειρισμού (π.χ. ευκολία στην εξάτμιση, στη μεταφορά όγκου).

Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι διαλύτες είναι το ακετυλονιτρίλιο (MeCN), η ακετόνη και ο οξικός αιθυλεστέρας (EtAc), καθώς έχουν δείξει να δίνουν υψηλές ανακτήσεις σε ευρεία γκάμα φυτοφαρμάκων.

Το MeCN και η ακετόνη αναμιγνύονται με το νερό και οδηγούν σε μονοφασικό διαλύτη μετά την εκχύλιση του δείγματος. Εξαιρούνται δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε σάκχαρα, στα οποία MeCN και νερό σχηματίζουν δύο φάσεις. Σε σύγκριση με τον EtAc και

την ακετόνη, το MeCN εκχυλίζει μικρότερες ποσότητες από λιπόφιλα υλικά, π.χ. κεριά, λίπος και λιπόφιλες χρωστικές. Επιπλέον, σχηματίζει διακριτές φάσεις διαχωρισμού με μη πολικούς διαλύτες (π.χ. εξάνιο), γεγονός που παρέχει τη δυνατότητα για ένα ακόμα εύκολο βήμα καθαρισμού για την απομάκρυνση των συνεκχυλισμένων λιπόφιλων συστατικών εάν χρειάζεται. Ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα του MeCN έναντι της ακετόνης είναι ότι το υπολειπόμενο νερό (μετά το στάδιο διαχωρισμού) μπορεί να αφαιρεθεί καλύτερα με ξηραντικούς παράγοντες όπως το MgSO₄. Τέλος, η χαμηλότερη πτητικότητα του MeCN, ελαχιστοποιεί την πιθανότητα μεταβολής του όγκου, που οφείλεται σε εξάτμιση του διαλύτη, κατά τη μεταφορά μικρών όγκων υγρών.

Το MeCN είναι συμβατό με εφαρμογές GC, αλλά λόγω του χαμηλού ιξώδους και της ενδιάμεσης πολικότητας του, είναι επίσης πολύ χρήσιμο στην υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (LC) και εφαρμογές SPE. Ο EtAc είναι πιο συμβατός με κοινές μεθόδους GPC (Gel permeation chromatography-χρωματογραφία μέσω πηκτώματος), αλλά ούτε ο EtAc ούτε η ακετόνη είναι χρήσιμα σε κοινές εφαρμογές LC. Ένα άλλο μειονέκτημα του EtAc είναι η πιθανότητα συσσώρευσης οξικού οξέος στον διαλύτη κατά την αποθήκευση.

Τα μειονεκτήματα του MeCN έναντι της ακετόνης και του EtAc σε MRMs για τα φυτοφάρμακα περιλαμβάνουν:

- 1) Μεγαλύτερη διαστολή του όγκου του διαλύτη κατά την εξάτμιση σε GC.
- 2) Επιζήμια επίδραση του MeCN στον ανιχνευτή φώσφορου-αζώτου (NPD) και τους ανιχνευτές ηλεκτρολυτικής αγωγιμότητας (ELCD).
- 3) Χαμηλότερη πτητικότητα (αλλά συγκρίσιμη με του EtAc), η οποία κάνει τους χρόνους εξάτμισης μεγαλύτερους.
- 4) Μεγαλύτερο κόστος σε σχέση με τον EtAc και την ακετόνη παρόμοιας ποιότητας
- 5) Υψηλότερη τοξικότητα, αλλά όχι στην έκταση των χλωριωμένων διαλυτών.

Ωστόσο, έχει χαμηλή χρόνια τοξικότητα και συγκριτικά χαμηλή πτητικότητα και χρησιμοποιείται ευρέως σε εφαρμογές LC. Ο κίνδυνος για τον εργαζόμενο ελαττώνεται περισσότερο επειδή δεν υπάρχει ανάμειξη, ούτε εξάτμιση διαλύτη και ο χειρισμός των δειγμάτων κατά τη διαδικασία είναι ελάχιστος [82].

Η εκχύλιση επιτυγχάνεται με ανατάραξη, η οποία παρουσιάζει πλεονεκτήματα έναντι της ανάμειξης, όπως για παράδειγμα: α) μεγαλύτερη ασφάλεια λόγω του κλειστού δοχείου, β) μικρότερες πιθανότητες επιμόλυνσης, γ) μικρότερη ποσότητα διαλύτη, δ) λιγότερα σκεύη και χρόνο εργασίας και καθαρισμού ε) μικρότερο κόστος για τα όργανα.

Για να διαχωριστεί η υδατική από την οργανική φάση, στην περίπτωση που διαλύτης είναι το MeCN προστίθενται άλατα, ενώ αν χρησιμοποιηθεί ακετόνη, χρειάζεται ένας μη πολικός συνδιαλύτης. Όταν χρησιμοποιούνται αφυδατικά άλατα όπως το $MgSO_4$ προάγεται ο καταμερισμός των φυτοφαρμάκων στην οργανική φάση και αυξάνονται οι ανακτήσεις. Η προσθήκη NaCl επηρεάζει και τον διαχωρισμό των πολικών συστατικών του υποστρώματος στην οργανική φάση. Μεταβάλλοντας την ποσότητά του, μεταβάλλεται η επιλεκτικότητα σε αυτό το στάδιο.

Για τον καθαρισμό χρησιμοποιείται η διασκορπιστική εκχύλιση στερεάς φάσης (d-SPE). Βασίζεται στη διασπορά ενός στερεού προσροφητικού υλικού σε υγρά δείγματα, κατά την απομόνωση και τον καθαρισμό διάφορων ενώσεων από πολύπλοκα υποστρώματα, μέσω εκχύλισης. Η διαδικασία της διασποράς αυξάνει την περιοχή επαφής μεταξύ προσροφητικού και της αναλυόμενης ουσίας, με αποτέλεσμα να απλοποιεί τον καθαρισμό σε σχέση με την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Επίσης επιτρέπει την ανάλυση περισσότερων δειγμάτων ταυτόχρονα, ενώ χρησιμοποιούνται μικρότεροι όγκοι σε διαλύτες, και είναι μικρότερο το κόστος των υλικών καθώς και ο χρόνος που πρέπει να απασχοληθούν οι εργαζόμενοι. Μετά τη διασπορά, το προσροφητικό απομονώνεται με διαδικασία φυγοκέντρησης ή διήθησης.

Διάφορα προσροφητικά υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό με εκχύλιση στερεάς φάσης όπως:

- PSA (primary secondary amine): Είναι ένας ασθενής ανιονικός ιονανταλάκτης, που χρησιμοποιείται ως το πιο κοινό προσροφητικό και αφαιρεί αποτελεσματικά πολλά πολικά συστατικά του υποστρώματος, όπως οργανικά οξέα, ορισμένες πολικές χρωστικές και σάκχαρα.
- GCB (graphitized carbon black): έχει ισχυρή χημική συγγένεια με τα επίπεδα μόρια, γι' αυτό και αφαιρεί αποτελεσματικά χρωστικές, όπως η χλωροφύλλη και τα καροτενοειδή, και στερόλες οι οποίες απαντώνται συχνά στα τρόφιμα. Αφαιρεί όμως και επίπεδα φυτοφάρμακα, όπως thiabendazole, coumaphos, cyprodinil, και chlorothalonil, γι' αυτό και προστίθεται μόνο όταν είναι απολύτως απαραίτητος. Οι απώλειες των φυτοφαρμάκων βρέθηκε να είναι χαμηλότερες στα υποστρώματα με υψηλή ποσότητα χλωροφύλλης, αλλά εξαρτώνται επίσης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος και την ποσότητα του GCB [82].
- C18 (Octadecylsilane) είναι ένα μη πολικό προσροφητικό (προσδεμένη αλυσίδα C18 σε πυριτία), που παγιδεύει και αφαιρεί αποτελεσματικά ίχνη λιπιδίων, αμύλου, σακχάρων και άλλων παρεμποδιστών.

Συχνά χρησιμοποιείται συνδυασμός των προσροφητικών υλικών για καλύτερα αποτελέσματα, όπως μίγμα PSA/GCB όταν υπάρχουν υψηλά επίπεδα χρωστικών, μίγμα PSA/C18 για δείγματα με υψηλά ποσοστά λιπαρών υλών και μίγμα PSA/MgSO₄ ώστε το MgSO₄ να αφαιρέσει τυχόν επιπλέον υγρασία.

Κάποιες φορές το ομογενοποιημένο δείγμα είτε ψύχεται σε χαμηλές θερμοκρασίες (-80°C) ώστε συστατικά του υποστρώματος, όπως λίπη, κηροί, σάκχαρα κ.α., να απομακρυνθούν εξ' αρχής είτε μετά την εκχύλιση καταψύχεται η οργανική φάση, με αποτέλεσμα τα συστατικά του υποστρώματος που έχουν χαμηλή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο να καθιζάνουν και να μην παρεμποδίζουν την αναλυτική διαδικασία [83].

Η οργανική φάση που προκύπτει μετά τον καθαρισμό και τον αντίστοιχο διαχωρισμό συνήθως προωθείται για προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων σε σύστημα υγρής ή αέριας χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας.

Η μέθοδος QuEChERS τροποποιείται ανάλογα με τις ανάγκες του κάθε υποστρώματος και των υπολειμμάτων που αναζητούνται. Πέρα από την αρχική πρόταση των Anastassiades et al. υπάρχουν σήμερα δύο κοινώς χρησιμοποιούμενες βελτιστοποιημένες παραλλαγές, στις οποίες γίνεται ρύθμιση της οξύτητας κατά τη διάρκεια της εκχύλισης ώστε να επιτευχθεί μεγαλύτερη σταθερότητα των προς ανάλυση ενώσεων και να βελτιωθεί η ποιότητα του εκχυλίσματος. Η μία προτείνεται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης (European Committee for Standardization-CEN) και χρησιμοποιεί ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών για την εκχύλιση. Η άλλη, η οποία υιοθετήθηκε από τον Σύλλογο των Επισήμων Χημικών Γεωπονίας (Association of Official Agricultural Chemists - AOAC) σαν επίσημή του μέθοδος, χρησιμοποιεί ρυθμιστικό διάλυμα οξικών.

Στάδιο 1: Εκχύλιση / άλατα, διαλύτες που προστίθεται

Original Quechers
Αναστασιάδης κ.α 2003

Προσθήκη 10 ml MeCN σε
10 g ομογενοποιημένου
δείγματος σε σωλήνα
φυγοκέντρησης των 50ml

Προσθήκη ISTD

Ανακίνηση με έντονο
ρυθμό.

AOAC Quechers
AOAC 2007.01

Προσθήκη 15 ml από 1%
HOAc σε MeCN σε 15 g
ομογενοποιημένου δείγματος
σε σωλήνα φυγοκέντρησης
των 50 ml

Προσθήκη ISTD

Ανακίνηση με έντονο
ρυθμό.

Buffered Quechers
EN 15662

Προσθήκη 10 MeCN σε
10 g ομογενοποιημένου
δείγματος σε σωλήνα
φυγοκέντρησης των 50
ml

Προσθήκη ISTD

Ανακίνηση με έντονο
ρυθμό.

Προσθήκη 4 g MgSO₄ και
1 g NaCl
Ανακίνηση με έντονο ρυθμό
για 1 λεπτό

Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε
5000 rpm.

Προσθήκη 6 g MgSO₄ και
1.5 g NaOAc
Ανακίνηση με έντονο ρυθμό
για 1 λεπτό

Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό σε
> 1500 ref

Προσθήκη 4 g NaCl και 1
g Na₃Citrate .2H₂O
0.5 g Na₂HCitr .1.5H₂O
Ανακίνηση με έντονο
ρυθμό για 1 λεπτό

Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
σε 3000 U/min.

Στάδιο 2: καθαρισμός d- SPE

Μεταφορά 1 ml σε
σωλήνα φυγοκέντρησης
15 ml που περιέχει 150mg
MgSO₄ και 50 mg PSA

Ανακίνηση για 1 λεπτό

Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό
στις 6000 rpm.

Μεταφορά 1 ml σε σωλήνα
φυγοκέντρησης 15 ml που
περιέχει MgSO₄, PSA
(C18, GCB η ChloroFiltr
μπορεί να προστεθεί για
καλύτερο καθαρισμό)
Ανακίνηση για 30 δευτέρα

Φυγοκέντρηση για 1 λεπτό
στις > 1500 ref.

Μεταφορά 1 ml σε σωλήνα
φυγοκέντρησης 15 ml που
περιέχει 150 mg MgSO₄
και 25 mg PSA (συν 2.5 η
7.5 mg GCB για αφαίρεση
χρωστικών.
Ανακίνηση για 30 δευτερα

Φυγοκέντρηση για 5 λεπτά
στις 3000 στροφές U/min.

Μεταφορά 0.5 ml σε
φιαλίδιο για υγρή η αέρια
χρωματογραφία μάζας
ανάλυση

Αλλαγή διαλύτη σε
τολουόλιο
για αέρια χρωματογραφία
μάζας ή 6.7 mM φορμικό
οξύ σε MeCN για υγρή
χρωματογραφία μάζας

Προσθήκη εσωτερικού
προτύπου

Αλλαγή διαλύτη σε 5%
φορμικό οξύ σε ACN

Μεταφορά 0.5 ml σε
φιαλίδιο για υγρή η αέρια
χρωματογραφία μάζας
ανάλυση

Στάδιο 3: Ανάλυση με υγρή η αέρια χρωματογραφία - φασματογραφία μάζας

Σχήμα 1: Σχηματική αναπαράσταση των τριών σημαντικότερων παραλλαγών της μεθόδου QuEChERS (Original QuEChERS Method, AOAC 2007.01 Official Method, EN 15662 The European Official Method) και των σταδίων εκχύλισης, καθαρισμός και ανάλυσης

Η μέθοδος αναπτύχθηκε αρχικά για φρούτα και λαχανικά, που έχουν υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Για να χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα και γενικότερα ξηρά υποστρώματα, όπως έδαφος [108], με χαμηλότερη περιεκτικότητα σε νερό, χρειάζεται επιπλέον προσθήκη του. Ο AOAC δεν έχει δώσει σαφείς οδηγίες σχετικά με την ποσότητα του νερού που προστίθεται, γι' αυτό ακολουθούνται οι οδηγίες που συστήνονται από τη CEN.

Πίνακας 3: Οι οδηγίες σύμφωνα με τη μέθοδο CEN για την προσθήκη νερού σε εμπορεύματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό [131]

Είδος δείγματος	Βάρος δείγματος (g)	Προστιθέμενο νερό (g)	Παρατηρήσεις
Φρούτα και λαχανικά με περιεκτικότητα νερού > 80%	10	-	
Φρούτα και λαχανικά με περιεκτικότητα νερού μεταξύ 25-80%	10	X	X = 10 g – ποσό νερού περιέχεται στα 10 g δείγματος
Δημητριακά	5	10	
Αποξηραμένα φρούτα	5	7,5	Το νερό μπορεί να προστεθεί κατά τη διάρκεια του θρυμματισμού
Μέλι	5 g	10	
Μπαχαρικά	2 g	10	

4.2. Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μία σειρά τεχνικών διαχωρισμού και προσδιορισμού συστατικών μείγματος. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή των συστατικών μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μιας κινητής που βρίσκονται στη χρωματογραφική «στήλη». Η κατανομή είναι αποτέλεσμα των διαφορών των συστατικών του μίγματος σε ορισμένες ιδιότητες, όπως το σημείο ζέσεως, η πολικότητα, τα ηλεκτρικά φορτία (όταν πρόκειται για ιοντικές ενώσεις) και το μέγεθος των μορίων, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα διαφορετική φυσικοχημική συγγένεια του κάθε συστατικού ως προς τις δύο φάσεις της χρωματογραφικής «στήλης».

Η κινητή (φέρουσα) φάση, διέρχεται μέσα από τη στατική και προκαλεί διαφορετική μετατόπιση επάνω σε αυτή των συστατικών του μίγματος με συνέπεια τα συστατικά να

διαχωρίζονται μεταξύ τους και να εξέρχονται από τη στήλη, συνήθως σε διαφορετικές χρονικές στιγμές. Εάν στην έξοδο της στήλης υπάρχει σύστημα ανίχνευσης και καταμέτρησης της ποσότητας κάθε συστατικού, τότε εκτός από το διαχωρισμό, πραγματοποιείται και ποσοτικός προσδιορισμός.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές διαφέρουν ως προς: α) τη φύση της κινητής φάσης β) τη φύση και τη μορφή της στατικής φάσης γ) το μηχανισμό διαχωρισμού δ) τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση ε) τον τρόπο κίνησης των συστατικών του δείγματος στη στατική φάση.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές ταξινομούνται με βάση

- Τη φύση της κινητής φάσης.

α) Αεριοχρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) αν η κινητή φάση είναι αέρια

Αν η στατική φάση είναι στερεή Αεριο-στερεο-χρωματογραφία (GSC)

Αν η στατική φάση είναι υγρή Αεριο-υγρο-χρωματογραφία (GLC).

β) Υγροχρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) αν η κινητή φάση είναι υγρή.

Αν η στατική φάση είναι στερεή, υγρο-στερεο-χρωματογραφία (LSC).

Αν η στατική φάση είναι υγρή, Υγρο-υγρο-χρωματογραφία (LLC).

- Τη φύση και τη μορφή της στατικής φάσης.

α) Χρωματογραφία στήλης. Ανάλογα με τη μορφή της στήλης σε

i) Χρωματογραφία πληρωμένων στηλών

ii) Χρωματογραφία τριχοειδών στηλών

β) Επίπεδη χρωματογραφία

i) Χρωματογραφία χάρτου

ii) Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας

- Τον μηχανισμό διαχωρισμού

α) Χρωματογραφία προσρόφησης

β) Χρωματογραφία ιονανταλλαγής

γ) Χρωματογραφία κατανομής

δ) Χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού

ε) Χρωματογραφία συγγενείας

- Τον τρόπο εισαγωγής και κίνησης των συστατικών του δείγματος στη στατική φάση.

α) Μετωπική χρωματογραφία

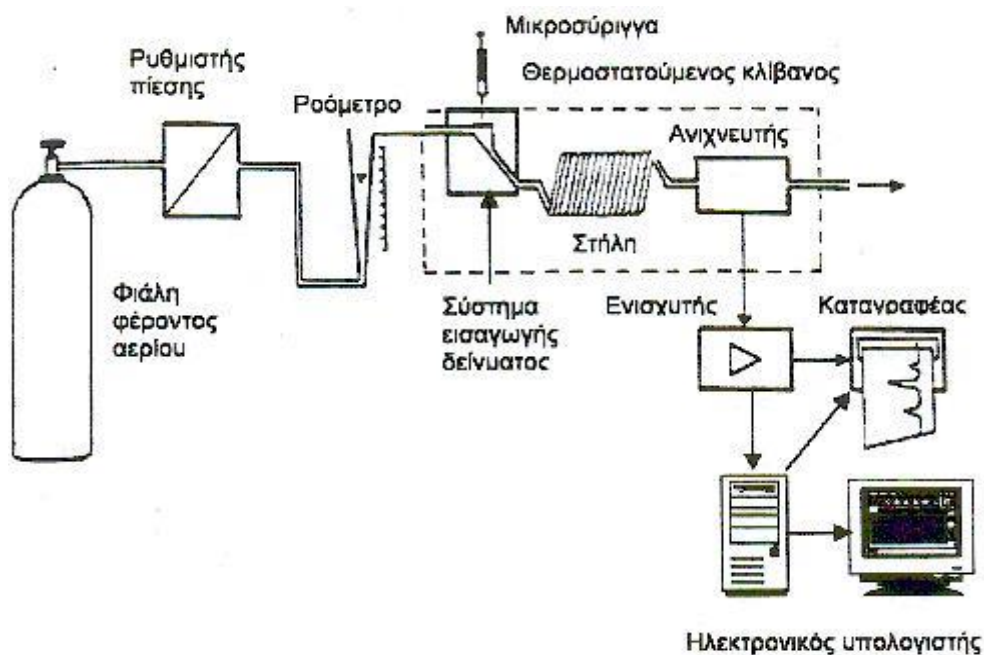
β) Χρωματογραφία εκτοπίσεως

γ) Χρωματογραφία εκλούσεως

4.2.1. Αέρια Χρωματογραφία

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό καθώς και τον ποιοτικό/ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων που είναι ή μπορούν να γίνουν πτητικές (με εξάτμιση ή θέρμανση) χωρίς να διασπώνται.

Τα βασικά χαρακτηριστικά του συστήματος αέριας χρωματογραφίας φαίνονται στο σχήμα 2.



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση συστήματος αέριας χρωματογραφίας [115]

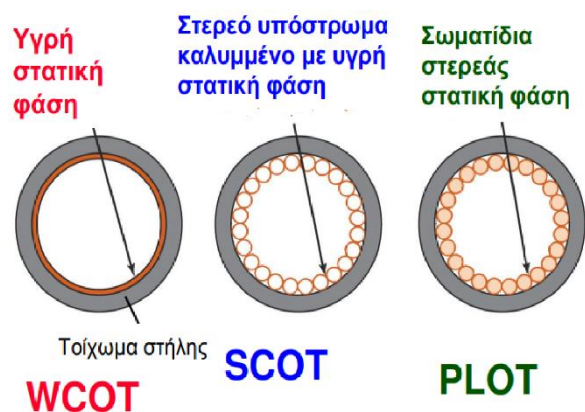
Το δείγμα εκχύεται στο σύστημα εισαγωγής, όπου εξατμίζεται ταχύτατα και εισάγεται στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης, καθώς παρασύρεται από το φέρον αέριο. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές, απαλλαγμένο προσμίξεων, να διαφοροποιείται στον ανιχνευτή από τα διάφορα συστατικά του μίγματος, να μην περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και να μην περιέχει καθόλου υγρασία γιατί έτσι απενεργοποιείται η στατική φάση. Συνήθως χρησιμοποιείται ήλιο, άζωτο, αργό ή υδρογόνο για το οποίο ρυθμίζονται οι συνθήκες πίεσης, παροχής και θερμοκρασίας.

Τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται εντός της στήλης.

Η χρωματογραφία αερίου-στερεού (GSC) στηρίζεται στη χρήση στερεάς στατικής φάσης. Η κατακράτηση των αναλυτών οφείλεται σε μια μερική και εκλεκτική προσρόφηση επάνω στη στερεή επιφάνεια χωρίς να υπάρχει μεταξύ τους αλληλεπίδραση.

Η χρωματογραφία αερίου-υγρού (GLC) στηρίζεται στην κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και της υγρής φάσης, που είναι ακινητοποιημένη στην επιφάνεια ενός αδρανούς στερεού. Στη GLC οι αναλύτες αλληλεπιδρούν με την υμενική φάση γιατί διαλύονται σε αυτή

Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με στήλες πληρώσεως και με τριχοειδείς στήλες. Το υλικό της στήλης μπορεί να είναι γυαλί, ανοξείδωτο ατσάλι ή τηγμένη πυριτία γεμάτη με διάφορα υλικά που εξαρτώνται από τα συστατικά που θέλουμε να διαχωρίσουμε. Στις στήλες ανοιχτού σωλήνα με πορώδη στιβάδα (porous layer open tubular column - PLOT) μια λεπτή στιβάδα προσροφητή προσφύεται στα εσωτερικά τοιχώματα του τριχοειδούς για την GSC.



Εικόνα 18: Είδη τριχοειδούς στήλης αέριας χρωματογραφίας τροποποίηση από [133]

Για την GLC υπάρχουν δύο βασικοί τύποι:

α) Στήλες με επικάλυψη τοιχωμάτων (wall-coated tubular - WCOT) στις οποίες το εσωτερικό τοίχωμα επικαλύπτεται με λεπτό στρώμα στατικής φάσης.

β) Στήλες επικαλυμμένες με υλικό στήριξης (support-coated, open tubular, SCOT) πάνω στο οποίο τοποθετείται η υγρή στατική φάση.

Πλεονέκτημα για την GC αποτελεί η ποικιλία των ανιχνευτών με τους οποίους μπορεί να συζευχθεί όπως:

- i. Ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας (FID)
- ii. Ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας (TCD)
- iii. Ανιχνευτής χημειοφωταύγειας θείου (SCD)
- iv. Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)
- v. Ανιχνευτής ατομικής εκπομπής (AED)
- vi. Θερμιοντικός ανιχνευτής (TID)
- vii. Φλογοφωτομετρικός ανιχνευτής (FPD)
- viii. Φασματόμετρο μάζας (MS)

4.2.2. Υγρή χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία είναι μία μη καταστρεπτική μέθοδος διαχωρισμού, ποιοτικής και ποσοτικής ανάλυσης μιγμάτων, κυρίως μοριακών ή ιοντικών ενώσεων που έχουν χαμηλές τάσεις ατμών ή είναι θερμικά ασταθείς και δεν μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν .

Η υγρή κινητή φάση διαβιβάζεται μέσα από τη στατική α) Με την επίδραση της βαρύτητας β) Με τη χρήση αντλιών χαμηλής πίεσης όταν η στατική φάση αποτελείται από σχετικά μεγάλα σωματίδια με μικρή αντίσταση (Κλασική Υγροχρωματογραφία στήλης) γ) Με την εφαρμογή πίεσης αέρα (χρωματογραφία Flash ή χρωματογραφία μεσαίας πίεσης) δ) Με τη χρήση αντλιών υψηλής πίεσης όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου σωματίδια με μεγάλη αντίσταση, αλλά υψηλή διαχωριστική απόδοση (Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης, High Performance Liquid Chromatography, HPLC).

Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή.

Όταν είναι στερεή (υγρό-στερεο-χρωματογραφία), τα συστατικά του μίγματος κατανέμονται ανάλογα με τις δυνάμεις προσρόφησης που αναπτύσσονται μεταξύ τους και του προσροφητικού υλικού που αποτελεί τη στερεά φάση. Το προσροφητικό υλικό επιλέγεται ώστε να έχει μεγάλο εμβαδό επιφάνειας και μεγάλο αριθμό χημικώς ενεργών κέντρων. Δημιουργείται μία ισορροπία μεταξύ της συγκέντρωσης του προσροφημένου συστατικού στη σταθερή στερεή φάση (C_s) και στη συγκέντρωσή του στην υγρή κινητή φάση (C_m). Η ταχύτητα μετακίνησής του στη στήλη, εξαρτάται από το γραμμομοριακό του κλάσμα στην κινητή φάση. Συνηθισμένα προσροφητικά υλικά είναι: α) Πηκτή Διοξειδίου Πυριτίου (Πυριτία) β) Τριοξείδιο αργιλίου (alumina) γ) Κυτταρίνη δ) Ενεργοποιημένος άθρακας ε) Ένυδρο οξείδιο μαγνησίου (magnesia) στ) Πυριτικό μαγνήσιο (Florisol). Ο διαλύτης (κινητή φάση) δρα ανταγωνιστικά με τα συστατικά του μείγματος για την κατάληψη των θέσεων προσρόφησης της στατικής φάσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η έκλυση μιας ουσίας να οφείλεται στην εκτόπισή της από τον διαλύτη στο προσροφητικό υλικό της στατικής φάσης και όχι στην κατανομή της μεταξύ των δύο φάσεων. Η σχετική ικανότητα εκλούσεως του διαλύτη δεν εξαρτάται από την ουσία.

Η χρωματογραφία υγρού-υγρού στηρίζεται στην κατανομή των μορίων του δείγματος μεταξύ δύο υγρών φάσεων που δεν αναμιγνύονται. Η λεπτή στιβάδα υγρού που αποτελεί τη στατική φάση στηρίζεται σε στερεό υλικό στήριξης που εφάπτεται στη στήλη. Στην LLC κανονικής

φάσης, το στήριγμα επικαλύπτεται με μια πολική στατική φάση, ενώ ένας σχετικά μη πολικός διαλύτης χρησιμοποιείται ως κινητή φάση. Στην LLC αντίστροφης φάσης, το λιγότερο πολικό υγρό είναι η στατική φάση και το πολικό υγρό είναι η κινητή φάση.

Ανάλογα με το συγκεκριμένο πρόβλημα διαχωρισμού, μπορούν να χρησιμοποιηθούν συστήματα LLC που αποτελούνται από υδατικούς/υδατικούς, υδατικούς/οργανικούς ή οργανικούς/οργανικούς διαλύτες [109]. Υπάρχουν από ένα ως τέσσερα δοχεία από τα οποία μπορούν να αντληθούν και να αναμιχθούν ισάριθμοι διαλύτες. Η έκλουση δύναται να πραγματοποιηθεί είτε με έναν είτε με ένα μίγμα διαλυτών σε όλη την πορεία της διαδικασίας (ισοκρατική έκλουση) ή με αλλαγή της σύστασης των διαλυτών κατά τη διάρκεια της ανάλυσης (βαθμωτή έκλουση). Η τελευταία προτιμάται στα σύνθετα μείγματα, όπου υπάρχει ποικιλία ενώσεων με μικρή ή μεγαλύτερη συγγένεια, τις οποίες δεν μπορεί να διαχωρίσει ικανοποιητικά ένας διαλύτης ή ένα μίγμα διαλυτών και εμφανίζονται φαινόμενα συνέκλουσης [110].

Στο σύστημα LLC έχουν χρησιμοποιηθεί ποικίλα στήριγματα, και αυτά με βάση το πυρίτιο φαίνεται να είναι τα καταλληλότερα [109].

Άλλα είδη υγρής χρωματογραφίας είναι:

α) Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής. Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αναλυόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι σημαντικότεροι παράγοντες από τους οποίους καθορίζεται η συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

β) Χρωματογραφία Μοριακού Αποκλεισμού ή Διάχυσης Πηκτής. Η στατική φάση αποτελείται από μικρά σωματίδια πυριτίου ή πολυμερούς ώστε να σχηματιστούν ομοιόμορφοι πόροι. Τα πιο μικρά μόρια παγιδεύονται στα σωματίδια του πυριτίου και διαφεύγουν από τη στήλη αργότερα από τα μεγαλύτερα μόρια. Δεν υπάρχει καμία αλληλεπίδραση, φυσική ή χημική, μεταξύ της αναλυόμενης ουσίας και της στατικής φάσης.

γ) Χρωματογραφία Συγγένειας. Έχει τη βάση της στην εξειδικευμένη αλληλεπίδραση μιας ουσίας ακινητοποιημένης (με ομοιοπολική σύνδεση) σε στερεό φορέα και ενός μόνο από τα συστατικά του πολύπλοκου μείγματος. Το συστατικό που κατακρατείται εκλύεται όταν προστεθεί υγρό, το οποίο μεταβάλλει τις συνθήκες με αποτέλεσμα να εξασθενήσει η σύνδεση του συστατικού στη στήλη.

δ) Χρωματογραφία Εναντιομερών. Ειδική περίπτωση της χρωματογραφίας συγγένειας με τη βοήθεια της οποίας μπορούν να διαχωριστούν εναντιομερείς μορφές ενώσεων που εμφανίζουν χειρομορφία

4.2.3. Υγρή χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (ή Απόδοσης - HPLC)

Η HPLC είναι μία μορφή της χρωματογραφίας στήλης στην οποία η κινητή φάση ρέει με τη βοήθεια αντλίας υψηλής πίεσης. Η χρήση χρωματογραφικών στηλών με σωματιδία υλικού πλήρωσης τα οποία έχουν μικρό μέγεθος, οπότε προσφέρουν αυξημένο εμβαδόν επιφάνειας της στατικής φάσης ικανό να αλληλεπιδράσει με τα μόρια που μετακινούνται μέσω της κινητής φάσης, έχει ως αποτέλεσμα τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού των αναλυόμενων μορίων αλλά και την αύξηση της αντίστασης στην ροή της κινητής φάσης. Η υψηλή πίεση αντισταθμίζει την αύξηση της αντίστασης ώστε να μειωθεί ικανοποιητικά το μέγεθος της στήλης που απαιτείται για έναν διαχωρισμό. Οι μέθοδοι HPLC μπορούν να διαχωρίσουν μη πτητικά, θερμοευαίσθητα και μεγάλα μόρια, σε αντίθεση με τις άλλες τεχνικές που είναι κατάλληλες μόνο για την ανάλυση πτητικών και θερμοσταθερών ενώσεων με σχετικά χαμηλή μοριακή μάζα. Η εξαιρετική ισχύς διαχωρισμού, η υψηλή ευαισθησία, καθώς και η σημαντική ποικιλία των διαλυμένων ουσιών που μπορούσαν να διαχωριστούν με HPLC συνέβαλαν στη δημοτικότητά της. Συγκεκριμένα, είναι αυτή η χρωματογραφική τεχνική που χρησιμοποιείται περισσότερο για ποσοτική ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων. Είναι μία κατεξοχήν αυτοματοποιημένη διαδικασία και μπορεί να συζευχθεί με διάφορους ανιχνευτές όπως

- i. ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV/Vis Detector),
- ii. ανιχνευτές συστοιχίας φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD),
- iii. αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές (Conductivity Detector),
- iv. ανιχνευτές δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector),
- v. φασματογράφοι μάζας MS (Mass Spectroscopy Detector, MS Detector),
- vi. ανιχνευτής Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (Ανιχνευτής NMR) (Nuclear Magnetic Resonance Detector, NMR Detector),
- vii. ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές (Electrochemical Detector),
- viii. φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (Fluorescence Detector).

4.2.4. Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC)

Το 2004 εισήχθη στην αγορά από την εταιρεία Waters, ένα βελτιστοποιημένο σύστημα HPLC το οποίο διατηρεί την πρακτικότητα και τις αρχές της HPLC, ενώ παράλληλα βελτιώνει τα χαρακτηριστικά της ταχύτητας, ευαισθησίας και διακριτικής ικανότητας. Το σύστημα αυτό ονομάστηκε υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (UHPLC).

Η εμφάνισή του, ήταν αποτέλεσμα της ανάγκης για ταχείες αναλύσεις μεγάλου αριθμού δειγμάτων, σε συνδυασμό με την εξέλιξη στην τεχνολογία των υλικών πλήρωσης των χρωματογραφικών στηλών.

Πίνακας 4: Διαφορές μεταξύ HPLC και UHPLC

[110]

	HPLC	UHPLC
Ταχύτητα ροής κινητής φάσης	1-2 mL/min	0,2-0,7 mL/min
Μέγιστη πίεση	400 bar	1500 bar
Διαστάσεις Στατικής φάσης:	4.6 x 250 mm	UPLC 2.1 x 100 mm
Μέγεθος σωματιδίων στατικής φάσης	3-5 μm	<2 μm
		Στενότερες κορυφές
	Συνήθεις εφαρμογές	Ερευνητικές εφαρμογές

Οι αντλίες υψηλής πίεσης έγιναν περισσότερο ακριβείς και έχουν τη δυνατότητα να λειτουργήσουν σε πιέσεις μέχρι και 1200-1300 bar (18000-19500 psi). Τα υλικά πλήρωσης είναι περισσότερο αποτελεσματικά για τους διάφορους διαχωρισμούς και επιπλέον βελτιώθηκαν ο σχεδιασμός του ανιχνευτή, ο έλεγχος και η επεξεργασία των δεδομένων. Με τη χρήση μικρότερων σωματιδίων αδρανούς υλικού ως στατική φάση (stationary phase) βελτιώθηκαν τα όρια της ανάλυσης. Χρησιμοποιούνται πλήρως πορώδη σωματίδια πυριτίου με μέγεθος μικρότερο από 2 μm [109]. Ωστόσο, τα συστήματα UHPLC έχουν μεγαλύτερο κόστος αγοράς, καθότι έχουν τμήματα από ειδικά υλικά ώστε να αντέχουν σε υψηλές πιέσεις. Υπάρχουν ανιχνευτές όπως τα φασματομέτρα μάζας που λειτουργούν ορθότερα σε χαμηλές ροές και, κατά συνέπεια, είναι αποδοτικότεροι όταν συζευγνύονται με συστήματα UHPLC [110].

Το 2009 αναπτύχθηκε μια καινούργια μέθοδος για την επίτευξη αποτελεσμάτων εξαιρετικά υψηλής πίεσης (UHPLC) με τη χρήση σωματιδίων τύπου πυρήνα-κελύφους μεγέθους μικρότερου από 3 μm (στήλες Kinetex) [111] .

4.3. Φασματογραφία μάζας

Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry - MS) ονομάζεται η αναλυτική τεχνική κατά την οποία τα μόρια ενός δείγματος μετατρέπονται σε ταχύτατα κινούμενα ιόντα και στη συνέχεια διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους (m/z). Αρχικά, τα μόρια των ενώσεων, μετατρέπονται σε ιόντα (με θετικό, ή αρνητικό φορτίο) και με τη βοήθεια ηλεκτρικών πεδίων, ευθυγραμμίζονται σε λεπτή δέσμη. Η δέσμη διέρχεται μέσω ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου, οπότε το κάθε ιόν, ανάλογα με τον λόγο μάζα προς ηλεκτρικό φορτίο (m/z), αποκλίνει από την αρχική κατεύθυνση. Με κατάλληλο ανιχνευτή, μπορεί να μετρηθεί το ηλεκτρικό ρεύμα, που παράγουν τα ιόντα με διαφορετικό λόγο m/z . Επειδή τα ιόντα που παράγονται φέρουν κατά κανόνα ένα φορτίο, ο λόγος m/z αντιστοιχεί αριθμητικά με το μοριακό βάρος του ιόντος. Το διάγραμμα, που δείχνει τη σχετική ένταση του μετρούμενου ρεύματος ως συνάρτηση του λόγου m/z των ιόντων, ονομάζεται φάσμα μαζών της ένωσης. Η μορφή του φάσματος μαζών είναι χαρακτηριστική της αρχικής ένωσης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή της [112] .

Η φασματομετρία μαζών είναι από τις πλέον διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης διότι δίνει τη δυνατότητα να εξαχθούν πληροφορίες που αφορούν: α) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση αγνώστων μιγμάτων, β) τη χημική δομή πολύ μεγάλου αριθμού ενώσεων, γ) την παρουσία και το ποσοστό ισωτόπων, δ) τη δομή και σύσταση επιφανειών με μορφή απεικόνισης (MS Imaging). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να βρίσκει εφαρμογές σε διάφορους τομείς, όπως οι επιστήμες ζωής (έλεγχος τοξικότητας μεταβολισμού φαρμάκων, έλεγχος ναρκωτικών τροφίμων (ανίχνευση τοξινών), οι περιβαλλοντικές επιστήμες (ανίχνευση ιχνών βαρέων μετάλλων) και οι τεχνολογίες omics (εύρεση δομής πεπτιδίων, πρωτεϊνών, νουκλεοτιδίων).

Μερικά από τα πλεονεκτήματά της είναι :

α) Η μεγάλη εκλεκτικότητα, που οφείλεται στην ακριβή μέτρηση των σχετικών μοριακών μαζών και έχει ως αποτέλεσμα την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

β) Η πολύ υψηλή ευαισθησία, που φτάνει έως τα 10^{-18} mol.

γ) Η δυνατότητα, θεωρητικά, να δράσει σαν ολικός ανιχνευτής (universal detector) και, επομένως, να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε ενώσεως.

δ) Η δυνατότητα εύρεσης δομής αγνώστων ενώσεων [113].

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι:

α) Το μεγάλο κόστος αγοράς, συντήρησης και λειτουργίας του εξοπλισμού

β) Ο μεγάλος βαθμός εξειδίκευσης του χρήστη

4.3.1. Φασματογράφος μάζας

Ένας τυπικός φασματογράφος μαζών αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα:

1) Το σύστημα της εισαγωγής του δείγματος. Τις περισσότερες φορές το δείγμα εισάγεται στην αέρια ή την υγρή μορφή [113]. Οι ευαίσθητες ενώσεις, τα στερεά και τα μη πτητικά υγρά, εισάγονται κατ' ευθείαν στον θάλαμο ιονισμού. Για τα σύνθετα μίγματα προηγείται μία μέθοδος διαχωρισμού, όπως αέρια (GC) ή υγρή χρωματογραφία (LC) ή τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (CE).

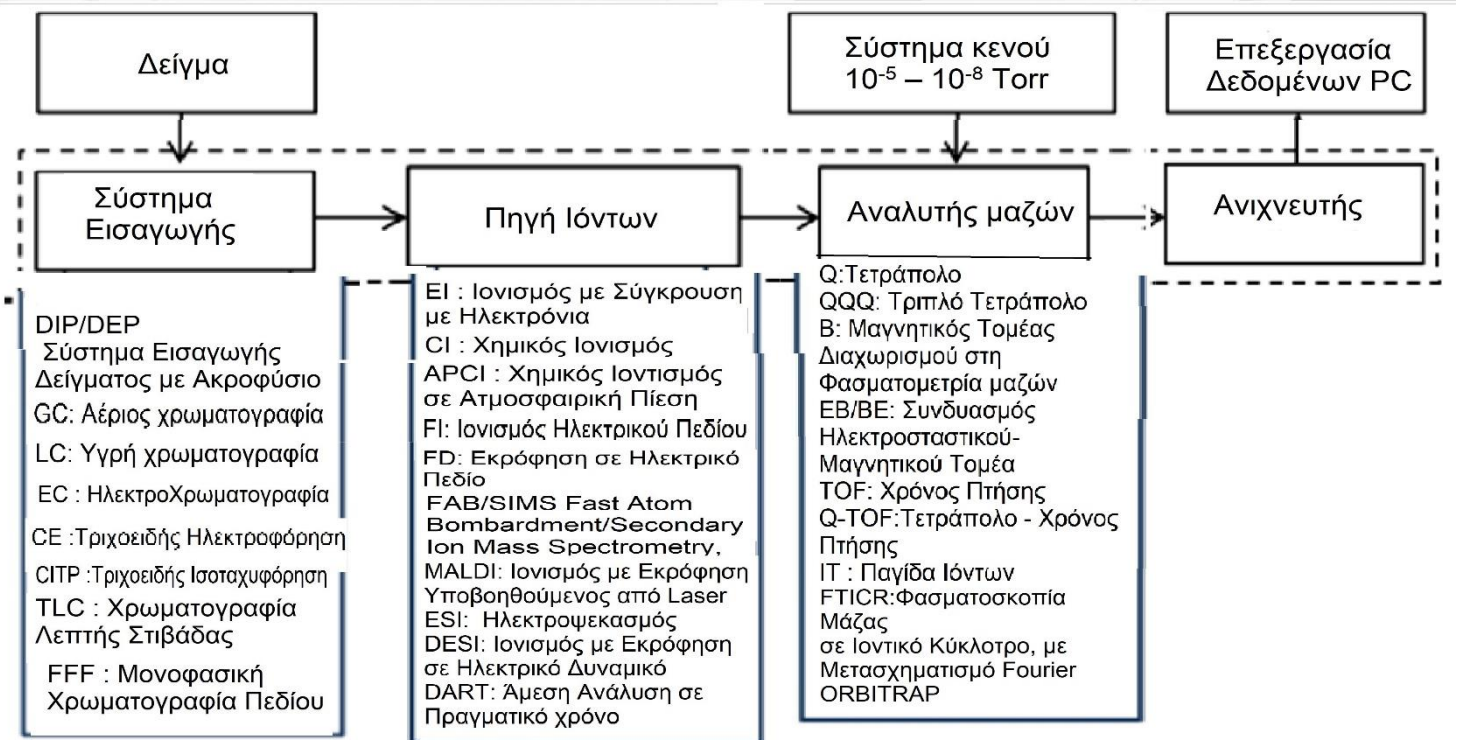
2) Την πηγή ιόντων, όπου τα εισερχόμενα συστατικά μετατρέπονται σε ιόντα. Αν πρόκειται για πτητική ένωση, το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιονίζεται. Αν το δείγμα είναι σε στερεή ή υγρή κατάσταση, μετατρέπεται σε ιόντα σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης.

3) Τον αναλυτή μαζών. Τα ιόντα επιταχύνονται με τη βοήθεια ισχυρού ηλεκτρικού ή μαγνητικού πεδίου και διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο m/z .

4) Τον ανιχνευτή που συλλαμβάνει τα διαχωριζόμενα ιόντα και τα μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα.

5) Το σύστημα κενού. Ο φασματογράφος βρίσκεται υπό κενό το οποίο δημιουργείται από εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες κενού.

6) Τον ηλεκτρονικό υπολογιστή με κατάλληλο λογισμικό [113].



Σχήμα 3: Τμήματα φασματογράφου μαζών με τις κυριότερες τεχνικές κάθε σταδίου

[113]

4.3.2. Πηγές ιοντισμού

Η επιλογή της τεχνικής ιοντισμού είναι πολύ σημαντική διότι, αν εφαρμοστούν διαφορετικές τεχνικές και συνθήκες ιοντισμού για την ίδια ένωση, τα φάσματα που λαμβάνονται μπορεί να είναι εντελώς διαφορετικά. Οι τεχνικές ιοντισμού μπορούν να ταξινομηθούν σε "σκληρές" και "μαλακές". Στις "σκληρές" τεχνικές ιοντισμού χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια με την οποία προκαλείται διάσπαση (θραύση) της ένωσης σε θυγατρικά ιόντα. Από τα θραύσματα μπορούν να συλλεχθούν χρήσιμες πληροφορίες για τα είδη των δραστικών ομάδων και τη δομή. "Μαλακές" καλούνται οι τεχνικές στις οποίες ο ιοντισμός πραγματοποιείται σε λιγότερο έντονες συνθήκες, με μικρή ή μηδαμινή θραύση, και από αυτές προκύπτουν πληροφορίες για το μοριακό βάρος της ένωσης.

Όταν οι προς ανάλυση ενώσεις είναι αέρια ή πτητικά υγρά, οι τεχνικές ιοντισμού που προτιμώνται είναι ο ιοντισμός με πρόσκρουση e⁻ (Electron Impact- EI), ο χημικός ιοντισμός (Chemical Ionization – CI) και ο Ιοντισμός Ηλεκτρικού Πεδίου (Field Ionisation – FI). Όταν είναι στερεά ή υγρά χρησιμοποιούνται Ψεκασμός σε Ηλεκτρικό Πεδίο ή Ηλεκτροψεκασμός (Electrospray - ESI), Χημικός Ιοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization – APCI) και Ιοντισμός με Εκρόφηση Υποβοηθούμενος από Laser σε

Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric Pressure Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – AP-MALDI). Στην περίπτωση που είναι στερεά, χρησιμοποιείται ιοντισμός με Εκρόφηση Υποβοηθούμενος από Laser (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – MALDI) και ιοντισμός σε φασματομετρία μάζας υγρού δευτερογενούς ιόντος (liquid secondary ion mass spectrometry – LSIMS) [114].

Στον Πίνακα 5 δίνονται οι κύριες τεχνικές ιοντισμού που εφαρμόζονται, οι διατάξεις με τις οποίες συνδυάζονται, τα είδη των ιόντων που παράγονται καθώς και οι κατηγορίες των αναλυόμενων ενώσεων για τις οποίες ενδείκνυνται.

Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των κυριότερων τεχνικών ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας.

Πίνακας 5: Κύριες τεχνικές ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας [113]

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

Πίνακας 6: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των κυριότερων τεχνικών ιοντισμού στη φασματομετρία μάζας

[83]

Τεχνικές ιοντισμού	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Πρόσκρουση ηλεκτρονίων (EI)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Μεγάλη ευαισθησία 2. Δυνατότητα δημιουργίας βάσης δεδομένων για τον προσδιορισμό άγνωστων δειγμάτων 3. Συμβατό με αέρια χρωματογραφία 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Περιορισμένο εύρος ανίχνευσης μαζών 2. Πιθανότητα καταστροφής δειγμάτων λόγω υψηλής θερμοκρασίας πριν την εξάτμιση 3. Υψηλή θραυσματοποίηση, ανικανότητα προσδιορισμού μοριακού ιόντος σε μερικές περιπτώσεις
Ιοντισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 300000 Da 2. Μεγάλη ευαισθησία 3. Τεχνική ήπιου ιοντισμού 4. Ανεκτικότητα σε ύπαρξη αλάτων, συγκέντρωσης τάξης mmole 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Χαμηλή ανάλυση 2. Πιθανότητα χημικής αποικοδόμησης ουσία λόγω ακτινοβολίας 3. Υψηλός θόρυβος μήτρας που μπορεί να προκαλέσει πρόβλημα σε ανίχνευση μαζών μικρότερων από 1000 Da
Χημικός ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (APCI)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 2000 Da 2. Μεγάλη ευαισθησία 3. Τεχνική πολύ ήπιου ιοντισμού 4. Συμβατό με υγρή χρωματογραφία 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Πιθανότητα χημικής αποικοδόμησης ουσίας λόγω θερμότητας 2. Η ευαισθησία ποικίλει ανάλογα με την ουσία που μελετάται
Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Εύρος ανίχνευσης μαζών μέχρι 700000 Da 2. Μεγάλη ευαισθησία 3. Τεχνική πολύ ήπιου ιοντισμού 4. Κατάλληλο για υγρή χρωματογραφία 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Μη ανεκτικότητα σε ύπαρξη αλάτων 2. Η καθαρότητα των ουσιών που εισέρχονται στην πηγή είναι σημαντική

4.3.3. Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Ο Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία και είναι η σημαντικότερη μέθοδος σύζευξης της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών. Το έκλουσμα της στήλης εισέρχεται μέσω ανοξειδωτου τριχοειδούς σωλήνα ή βελόνας μέσα σε δυναμικό 3-5kV. Παράλληλα με τον τριχοειδή, διαβιβάζεται

αδρανές αέριο για δημιουργία εκνεφώματος. Το υγρό διασπείρεται σε νέφος από μικρές φορτισμένες σταγόνες και καθώς ο διαλύτης εξατμίζεται η διάμετρος της σταγόνας μειώνεται, και η πυκνότητα του φορτίου αυξάνει, ιοντίζοντας έτσι τις αναλυόμενες ενώσεις. Το φαινόμενο ονομάζεται εξάτμιση με ιοντισμό (ion evaporation) και εντάσσεται στις μαλακές (ήπιες) τεχνικές ιοντισμού.

Ανάλογα με τις συνθήκες θερμοκρασίας καθώς και το δυναμικό που εφαρμόζεται, μπορεί να λαμβάνει ή να μη λαμβάνει χώρα θραύση των μορίων, οπότε το φάσμα ενδέχεται να διαφέρει πολύ.

Ο ESI χρησιμοποιείται με όργανα LC-MS για την ανάλυση και τον προσδιορισμό μορίων μεγάλου εύρους μαζών από μικρά πολικά μόρια έως μεγάλα βιομόρια διότι επιτυγχάνει τον ιονισμό πολλών κατηγοριών τους, όπως πεπτίδια, πρωτεΐνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, νουκλεοτίδια, σάκχαρα, βιταμίνες, και σχεδόν όλες τις κατηγορίες δευτερογενών μεταβολιτών (αλκαλοειδή, φαινόλες, τερπενοειδή, γλυκοζίτες κλπ.) [113].

Στα πλεονεκτήματα της τεχνικής περιλαμβάνονται τα εξής: α) Προσδιορίζει το μοριακό βάρος χωρίς περιορισμούς στη μάζα β) Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποικίλα μετρίως πολικά και πολικά μόρια γ) Είναι δυνατή η μελέτη θερμικά ασταθών μορίων λόγω των σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών ιοντισμού δ) Έχει καλή ευαισθησία και εύκολη ποσοτικοποίηση ε) Μπορεί να συνδυαστεί με LC και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση.

Στα μειονεκτήματα ανήκουν α) Χρειάζεται απαραίτητα χαμηλή ροή κινητής φάσης β) Τα ιόντα της προς ανάλυση ουσίας δημιουργούνται στην υγρή φάση γ) Υπάρχει απόσβεση σήματος σε διαλύματα με άλατα, ανταγωνιστικό υπόστρωμα και στην έλλειψη πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων δ) Σχηματίζονται ιόντα προσθήκης (adduct ions).

4.3.4. Αναλυτές μαζών

Ο κάθε αναλυτής μαζών έχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τον διαφοροποιούν από τους υπόλοιπους και κρίνουν την εφαρμογή για την οποία είναι κατάλληλος. Ο ιδανικός αναλυτής θα πρέπει να έχει τη δυνατότητα διαχωρισμού όσο το δυνατόν μικρότερων διαφορών m/z , να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, ώστε να έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος, και ιοντισμού [113].

Διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R) ενός αναλυτή μαζών είναι η ικανότητά του να διακρίνει μεταξύ δύο κορυφών m και Δm :

$$R = m/\Delta m \quad \text{Εξίσωση 4}$$

όπου: Δm η διαφορά μαζών δύο διαδοχικών κορυφών και m η μάζα της πρώτης κορυφής. Δύο κορυφές (m/z) ίσης έντασης, θεωρείται ότι διαχωρίζονται όταν η επικάλυψή τους είναι μικρότερη από το 10% του ύψους τους.

Επειδή αυτός ο ορισμός εφαρμόζεται δύσκολα, η διαχωριστική ικανότητα μπορεί να υπολογιστεί, από μία μόνο κορυφή, όπου ως Δm χρησιμοποιείται το πλάτος που βρίσκεται στα μισά του μεγίστου της κορυφής (Full Width at Half Maximum - FWHM).

Διακριτική ικανότητα (ή ακρίβεια) είναι η διαφορά δύο γειτονικών τιμών m/z ($m_2 - m_1$) κι εκφράζεται σε ppm [114]:

$$\text{Διακριτική ικανότητα} = \Delta m/m_1 \quad \text{Εξίσωση 5}$$

Η διακριτική ικανότητα ενός φασματογράφου μαζών κατατάσσει τα όργανα σε χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας.

Οι αναλυτές μαζών διακρίνονται σε:

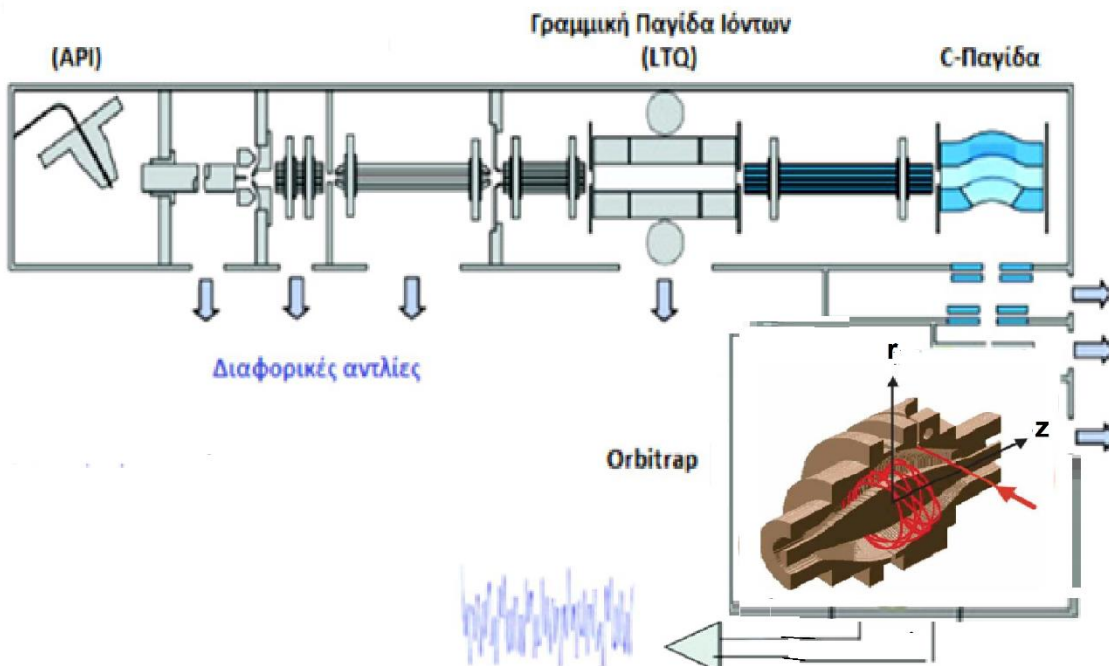
- Συνεχείς αναλυτές (ή αναλυτές σάρωσης), όπως ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (Q) και οι αναλυτές μαγνητικού τομέα.
- Παλμικούς αναλυτές μαζών, όπως η τετραπολική παγίδα ιόντων (Ion trap, IT), οι αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF) και ο αναλυτής κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (FTICR).
- Υβριδικούς αναλυτές που περιλαμβάνουν συνδυασμό αναλυτών σε σειρά, όπως LTQ - Orbitrap και Q-TOF.

Τα τετράπολα και οι παγίδες ιόντων έχουν σταθερό FWHM σε όλο το εύρος μαζών. Επομένως το R μεταβάλλεται ανάλογα με το m/z . Αυτά είναι όργανα χαμηλής διακριτικής ικανότητας. Τα φασματόμετρα TOF και οι μαγνητικοί αναλυτές έχουν σταθερό R σε όλο το εύρος μαζών. Αν π.χ. $R=2000$ σε $m/z = 200$, τότε $\Delta m = 0,1u$ (50 ppm). Τα FTICR έχουν R αντιστρόφως ανάλογο του m/z σε σταθερό χρόνο ανίχνευσης.

Έτσι αν $R=10^7$ σε $m/z = 100$, τότε $R=10^6$ σε $m/z = 1000$

4.3.5. Υβριδικός αναλυτής μαζών γραμμικής-τροχιακής παγίδας ιόντων (LTQ-Orbitrap)

Ο αναλυτής μαζών LQT - Orbitrap είναι ένα υβριδικό σύστημα που συνδυάζει τη γραμμική παγίδα ιόντων LTQ με την τροχιακή παγίδα μαζών Orbitrap.



Σχήμα 4: Σχηματική απεικόνιση του υβριδικού φασματογράφου μάζας LTQ-Orbitrap

(τροποποίηση από [134], [135])

Τα ιόντα που παράγονται στην πηγή ιοντισμού ατμοσφαιρικής πίεσης (API) παγιδεύονται στην LTQ και αναλύονται με τη χρήση μεθόδων σαρώσεως MS και MSⁿ (n=1-10). Ακολούθως, τα ιόντα επιταχύνονται ευθύγραμμα και συλλέγονται στην παγίδα ιόντων σχήματος C (C-Trap), όπου συσσωρεύονται δημιουργώντας ένα μικρό νέφος ιόντων και στη συνέχεια εισάγονται στον Orbitrap.

Ο αναλυτής Orbitrap είναι ένας αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων. Δίνει τη δυνατότητα ανίχνευσης σε μεγάλο εύρος μαζών (έως 2000 Da), με υψηλή διακριτική ικανότητα (έως και 150.000 FWHM), ακρίβεια μάζας (τέσσερα ή πέντε δεκαδικά ψηφία) και δυναμικό εύρος (> 4.000 σε μία σάρωση). Το σχετικό σφάλμα μάζας είναι μικρότερο από 5 ppm, προσδίδοντας υψηλή αξιοπιστία στην ταυτοποίηση.

Αποτελείται από δύο ειδικά διαμορφωμένα ηλεκτρόδια, το κεντρικό και το εξωτερικό ηλεκτρόδιο [83]. Τα συμμετρικά αξονικά ηλεκτρόδια του Orbitrap δημιουργούν ένα ηλεκτροστατικό δυναμικό που περιγράφεται από την εξίσωση 6:

$$U_{(r,z)} = k/2 (z^2 - r^2/2) + k/2 (R_m)^2 \ln[r/R_m] + C \quad \text{Εξίσωση 6}$$

Όπου: r , z οι κυλινδρικές συντεταγμένες, k η σταθερά καμπυλότητας του πεδίου και R_m η χαρακτηριστική ακτίνα καμπυλότητας.

Τα ηλεκτρόνια παγιδεύονται με την ξαφνική άνοδο του δυναμικού στο κεντρικό ηλεκτρόδιο του Orbitrap. Τα εγχέομενα ιόντα πραγματοποιούν περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο (r , ϕ , όπου ϕ η γωνιακή συντεταγμένη) και ταυτόχρονα ταλαντώνονται στην κατεύθυνση του οριζόντιου άξονα (z). Η ταλάντωση θεωρείται αρμονική και είναι ανεξάρτητη από τις παραμέτρους r , ϕ της κίνησης [115]. Τα ιόντα τα οποία διαφέρουν ως προς το λόγο m/z έχουν διαφορά και ως προς την περιστροφή και την αξονική ταλάντωση, με συνέπεια να παράγουν διαφορετικά τελικά σήματα. Το περιοδικό σήμα στα εξωτερικά ηλεκτρόδια, ανιχνεύεται ως αποτυπωμένο ρεύμα (image current).

Τα σήματα του αποτυπωμένου ρεύματος ενισχύονται και στη συνέχεια μετατρέπονται σε φάσμα συχνοτήτων με χρήση του αλγορίθμου μετατροπής Fourier

Ο λόγος m/z του κάθε ιόντος έχει άμεση σχέση με τη συχνότητα ταλάντωσης (ω) του ιόντος όπως φαίνεται στην Εξίσωση 7, με αποτέλεσμα, το φάσμα συχνοτήτων να μετατρέπεται σε φάσμα μαζών.

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}} \quad \text{Εξίσωση 7}$$

Πίνακας 7: Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα διαφόρων ειδών φασματογράφων μάζας [114]

Φασματογράφος	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Τετράπολα	<ul style="list-style-type: none"> • Οι πιο αξιόπιστοι και διαδεδομένοι • Κατάλληλοι για ποσοτική ανάλυση • Κατάλληλοι ανιχνευτές χρωματογραφίας • Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($>1000m/z$)s^{-1} • Φθηνοί, με μικρό μέγεθος και εύχρηστοι • Μέτριες απαιτήσεις κενού (10^{-5} Torr) και τάσης λειτουργίας • Δυνατότητα MS/MS (τριπλό τετράπολο) • Ιδανικό για σύζευξη με πηγές ιοντισμού AP 	<ul style="list-style-type: none"> • Χαμηλή διακριτική ικανότητα (FWHM: 0,5u, R: 1000-2000) • Περιορισμένο εύρος m/z (μέγιστο 4000 u) • Μειωμένη ευαισθησία σε υψηλή R
Αναλυτές μαγνητικού τομέα	<ul style="list-style-type: none"> • Υψηλή διακριτική ικανότητα (διπλής εστίασης) • Προσδιορισμός μοριακών μαζών • Δυνατότητα προσδιορισμού ισοτόπων • Πολύ καλή ευαισθησία σε χαμηλή R • Δυνατότητα MS/MS • Εφαρμογή στον προσδιορισμό διοξινών, ουσιών doping 	<ul style="list-style-type: none"> • Ογκώδη όργανα • Υψηλό κόστος αγοράς και συντήρησης • Απαιτούν υψηλό κενό και υψηλές τάσεις λειτουργίας • Μειωμένη ευαισθησία σε υψηλή R • Προβληματική σύζευξη με πηγές ιοντισμού AP (ESI) • Χρειάζεται ειδικά εκπαιδευμένο προσωπικό
Τετραπολική παγίδα ιόντων	<ul style="list-style-type: none"> • Φθηνοί, με μικρό μέγεθος • Μεγάλη ταχύτητα σάρωσης ($>1000m/z$)s^{-1} • Χαμηλές απαιτήσεις κενού (10^{-3} Torr) • Δυνατότητα MS/MS και MSⁿ (ταυτοποίηση δομής) • Υψηλή ευαισθησία • Κατάλληλοι ανιχνευτές χρωματογραφίας • Μεταβολίτες φαρμάκων, μελέτη δομής πρωτεϊνών 	<ul style="list-style-type: none"> • Χαμηλή διακριτική ικανότητα (FWHM: 0,1u , R: 4000) • Περιορισμένο εύρος m/z (μέγιστο 6000 u) • Περίπλοκη λειτουργία (παλμική) • Ανεπιθύμητη θραυσματοποίηση • Μικρή ακρίβεια ποσοτικοποίησης
Αναλυτές χρόνου πτήσης	<ul style="list-style-type: none"> • Απλότητα λειτουργίας • Θεωρητικά απεριόριστο εύρος μαζών • Τη μεγαλύτερη ταχύτητα σάρωσης ($10^6m/z$)s^{-1} • Υψηλή διακριτική ικανότητα(R: 20000) • Δυνατότητα MS/MS • Βιομόρια, μελέτη δομής πρωτεϊνών 	<ul style="list-style-type: none"> • Περιορισμένη δυναμική περιοχή σε ποσοτική ανάλυση • Χρειάζονται ακριβά και ταχύτατα ηλεκτρονικά • Περιορισμένη ευαισθησία • Παλμική πηγή συντονισμού (MALDI) • Υψηλές απαιτήσεις κενού
FTICR	<ul style="list-style-type: none"> • Την υψηλότερη διακριτική ικανότητα (R: 1.000.000) • Θεωρητικά ο καλύτερος αναλυτής μαζών • Ακρίβεια στον προσδιορισμό > 5ppm • Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων • Δυνατότητα MS/MS • Ανάλυση εξαιρετικά περίπλοκων μιγμάτων • Βιομόρια, περιβαλλοντικές μελέτες, ισοτοπική ανάλυση, προσδιορισμός λεπτής δομής, πρωτεΐνες, πεπτίδια 	<ul style="list-style-type: none"> • Ιδιαίτερα ακριβό όργανο - Πολύπλοκη λειτουργία • Ογκώδες, ειδικές εργαστηριακές εγκαταστάσεις • Υψηλές απαιτήσεις κενού (10^{-8} Torr)
Orbitrap	<ul style="list-style-type: none"> • Διακριτική ικανότητα R=10.000-140.000 μέχρι m/z = 4.000 • Ακρίβεια προσδιορισμού μαζών < 5 ppm • Μεγαλύτερη χωρητικότητα από τις ιονικές παγίδες • Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων • Δυνατότητα MS/MS (σε συνδυασμό με ιοντική παγίδα) • Ανάλυση εξαιρετικά περίπλοκων μιγμάτων • Προσδιορισμός από μικρά μόρια ως μεγαλομόρια - Βιομόρια, περιβάλλον κ.α. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ακριβό όργανο (ειδικά τα υβριδικά) - Περίπλοκη λειτουργία • Σχετικά αργή σάρωση για εφαρμογές UPLC • Υψηλές απαιτήσεις κενού (10^{-8} Torr)

4.4. Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (UHPLC-hybrid LTQ/Orbitrap)

Στις συνήθεις χρωματογραφικές τεχνικές τα συστατικά ταυτοποιούνται συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης των υπό μελέτη ενώσεων στο δείγμα, με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης σε ένα πρότυπο διάλυμα των ίδιων ενώσεων, στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Η ανίχνευση των ενώσεων γίνεται με την εκμετάλλευση κάποιας χαρακτηριστικής τους ιδιότητας, όπως ο φθορισμός ή η ηλεκτρική αγωγιμότητα η οποία μετρείται με τον κατάλληλο ανιχνευτή.

Η UHPLC είναι πολύ αποτελεσματική στον διαχωρισμό θερμοευαίσθητων, μη πτητικών ενώσεων. Στα δείγματα όμως που προέρχονται από πολύπλοκα υποστρώματα, υπάρχουν συχνά, συστατικά που παρουσιάζουν παρόμοιους χρόνους κατακράτησης με τις υπό μελέτη χημικές ενώσεις. Ως εκ τούτου, δεν είναι εύκολη η ακριβής ταυτοποίηση τους, και ο ποσοτικός προσδιορισμός δεν είναι πάντα αξιόπιστος, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις είναι μέχρι και ανέφικτος.

Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι αναγκαία η σύζευξη της UHPLC με τη φασματομετρία μάζας, η οποία παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης με ακρίβεια καθώς για πολλές ενώσεις τα φάσματα των μαζών είναι μοναδικά. Ωστόσο, ο διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων ενώσεων του μείγματος πριν την εισαγωγή τους στο φασματόμετρο μάζας είναι αναγκαίος, ώστε το φάσμα να μην περιέχει τα ιόντα άλλων συστατικών και παρεμποδίζεται η ταυτοποίηση αν και ακόμα και όταν ο διαχωρισμός δεν είναι πλήρης, ενώσεις με διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μαζών [115].

Στη σύζευξη, πρέπει να ληφθούν υπ' όψιν

- α) Η ασυμβατότητα μεταξύ των μεγάλων όγκων διαλυτών της HPLC και του κενού που απαιτείται από το MS.
- β) Η ασυμβατότητα με τα μη πτητικά ρυθμιστικά διαλύματα της κινητής φάσης.
- γ) Ο προβληματικός ιοντισμός μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ενώσεων.

Για να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω απαιτούνται :

- α) Στήλες μικρής διαμέτρου και μήκους και ελαχιστοποίηση του νεκρού όγκου.

β) Διαχωρισμός της κινητής φάσης, έτσι ώστε ένα μικρό κλάσμα να εισάγεται στη στήλη.

γ) Χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων της κινητής φάσης.

δ) Χρήση διάταξης σύζευξης (interface) μιας και το ζητούμενο είναι η σύζευξη δύο ασύμβατων τεχνικών. Χαρακτηριστικές διατάξεις είναι οι ESI, APCI, APPI, MALDI [112]

4.5. Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)

Ως επίδραση υποστρώματος μπορούμε να ορίσουμε τη μεταβολή (θετική ή αρνητική) στην απόκριση της αναλυόμενης ένωσης στην LC-MS, όταν εκχέεται μετά την απομόνωσή της από το προς ανάλυση υλικό, σε σχέση με την απόκριση ενός πρότυπου δείγματος. Η μεταβολή αυτή, οφείλεται στη συνέκλουση της αναλυόμενης ένωσης με συστατικά του υποστρώματος [116].

Η επίδραση του υποστρώματος εξαρτάται από τη φύση των ενώσεων (μοριακό μέγεθος, πολικότητα, θερμική σταθερότητα, πτητικότητα κλπ.) και τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας. Έχουν προταθεί πολυάριθμες μέθοδοι για τη διόρθωση των επιπτώσεών του, όπως συντελεστές αντιστάθμισης, διαφορετικές τεχνικές έγχυσης, αραίωση, εσωτερικά πρότυπα, εκτενής καθαρισμός των δειγμάτων και άλλες, αλλά συνήθως χρησιμοποιούνται καμπύλες βαθμονόμησης του υποστρώματος [117].

Τα βότανα και ειδικά τα αποξηραμένα, εμφανίζουν υψηλή ποσότητα συνεκχυλισμάτων από το υπόστρωμα. Περιέχουν ένα ευρύ φάσμα αιθέριων ελαίων, φλαβονοειδών, φαινολικών, λιπιδίων, φυσικών χρωστικών και σακχάρων τα οποία παρουσιάζουν συμπεριφορά καταμερισμού και χρωματογραφικά χαρακτηριστικά παρόμοια με ορισμένα φυτοφάρμακα. Μπορούν επίσης να προκαλέσουν έντονη επίδραση υποστρώματος και σημαντική παρεμβολή στην ανάλυση με φασματομετρίας μάζας [118].

5. Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε αποξηραμένη λεβάντα

5.1. Πρότυπες ουσίες - διαλύτες - αντιδραστήρια - υλικά - όργανα – συσκευές

5.1.1. Πρότυπες ενώσεις παρασιτοκτόνων

Τα πυκνά πρότυπα διαλύματα αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, είχαν παρασκευαστεί από στερεές ουσίες καθαρότητας > 99% οι οποίες προμηθεύτηκαν από την εταιρία Sigma - Aldrich (Steinheim, Germany). Τα παρασιτοκτόνα (Azoxystrobin, Benalaxyl, Bupirimate, Cyprodinil, Diazinon, Iprovalicarb, Metalaxyl, Pendimethalin, Pyriproxifen, Tebuconazole) είχαν διαλυθεί σε μεθανόλη υψηλής καθαρότητας (Pestiscan), σε συγκεντρώσεις 800-2000 µg/kg και τα διαλύματα είχαν φυλαχτεί σε γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 10 ml στους -20 °C. Πρότυπα διαλύματα μείγματος παρασιτοκτόνων παρασκευάστηκαν έπειτα από τις κατάλληλες αραιώσεις των πυκνών προτύπων σε διαλύτη μεθανόλη [83].

5.1.2. Διαλύτες

- Ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και νερό LC-MS-grade, του οίκου Fisher Scientific (Leicestershire, UK).

5.1.3. Αντιδραστήρια

- Άνυδρο θειικό μαγνήσιο, (καθαρότητας 99,5% % σκόνη), του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).
- Χλωριούχο νάτριο (καθαρότητας 100%), του οίκου Riedel-de Haën (Hannover, Germany).
- Πρωτοταγής-δευτεροταγής αμίνη (PSA; 40 µm) (PSA) του οίκου Agilent Technologies (Waldbronn, Germany).

5.1.4. Υλικά

- Φιαλίδια 61x16.6 mm, clear glass, του οίκου Lab Logistics Group GmbH-Meckenheim.
- Φιαλίδια 32x11.6 mm, clear glass, του οίκου Target Analysis A.E Kinesis.
- Πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου 50 ml, 28mm ,του οίκου Millipore (Cork, Ireland).
- Πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου 15 ml, 17mm ,του οίκου Millipore (Cork,Ireland).

- Σύριγγες όγκου 5 mL, του οίκου Softcare laboratory series.
- Σύριγγες 1 mL, του οίκου Softcare laboratory series.
- Φίλτρα 13mm 0,22μm PTFE with Luer lock, του οίκου Target analysis s.a.

5.1.5. Όργανα – συσκευές

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

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένο με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany).
- Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 4 δεκαδικών ψηφίων (Denver Instrument Company, AA-160, Göttingen, Germany).
- Συσκευή απόσταξης νερού.
- Μικροπιπέτα μηχανική του 0,5-10 μl του οίκου Brand.
- Μικροπιπέτα μηχανική του 10-100 μl του οίκου Eppendorf Research.
- Μικροπιπέτα μηχανική του 100-1000 μl του οίκου Eppendorf Research.
- Στήλη χρωματογραφίας C18 (Restek), 150 x 4.6 mm με 5μm μέγεθος σωματιδίων (Restek, USA).
- Πορσελάνινο γουδί του οίκου Haldenwanger (Berlin)
- Vortex του οίκου Velp scientifica, μοντέλο Zx³.
- Φυγόκεντρος του οίκου Thermo Scientific μοντέλο Heraeus Megafuge 8.

5.2. Προετοιμασία υποστρώματος λεβάντας

Χρησιμοποιήθηκαν αποξηραμένα άνθη λεβάντας με σκοπό να εμβολιαστούν με το μείγμα πρότυπων φυτοφαρμάκων και στη συνέχεια να γίνει μελέτη ανάκτησης και προσδιορισμού τους. Για να διευκολυνθεί η διαδικασία ανάκτησης, τα άνθη λεβάντας λειοτριβήθηκαν σε πορσελάνινο γουδί.

5.3. Εκχύλιση φυτοφαρμάκων από αποξηραμένη λεβάντα με τη μέθοδο QuEChERS

Μίγμα πρότυπων φυτοφαρμάκων προστέθηκε σε 2g αποξηραμένων και λειοτριβημένων ανθών λεβάντας ώστε τα τελικά επίπεδα συγκέντρωσης φυτοφαρμάκων στα δείγματα να είναι 50 µg/kg και 100 µg/kg. Τα δείγματα αφέθηκαν 30 min ώστε να απορροφηθούν τα φυτοφάρμακα και στη συνέχεια, το κάθε δείγμα τοποθετήθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρωσης 50 ml. Στο σωλήνα προστέθηκαν 10 ml υπερκάθαρου H₂O και αναμείναμε 10 min για να εξασθενήσουν οι αλληλεπιδράσεις των φυτοφαρμάκων με το υπόστρωμα, σύμφωνα με την μελέτη των Mohamed S. Abbas, et al. [119], πάνω στο αποξηραμένο χαμομήλι και τον μαϊντανό. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 10 ml MeCN και ο σωλήνας αναταράχτηκε έντονα με το χέρι και κατόπιν με vortex για 1 min.

Αμέσως μετά προστέθηκαν 4 g MgSO₄ και 1 g NaCl, για τον διαχωρισμό της υδατικής και της οργανικής φάσης και το μίγμα ανακινήθηκε εκ νέου έντονα χειροκίνητα και κατόπιν με vortex για 1min. Ο διαχωρισμός των φάσεων πραγματοποιήθηκε με φυγοκέντρωση στους 3500 rpm για 10 min.

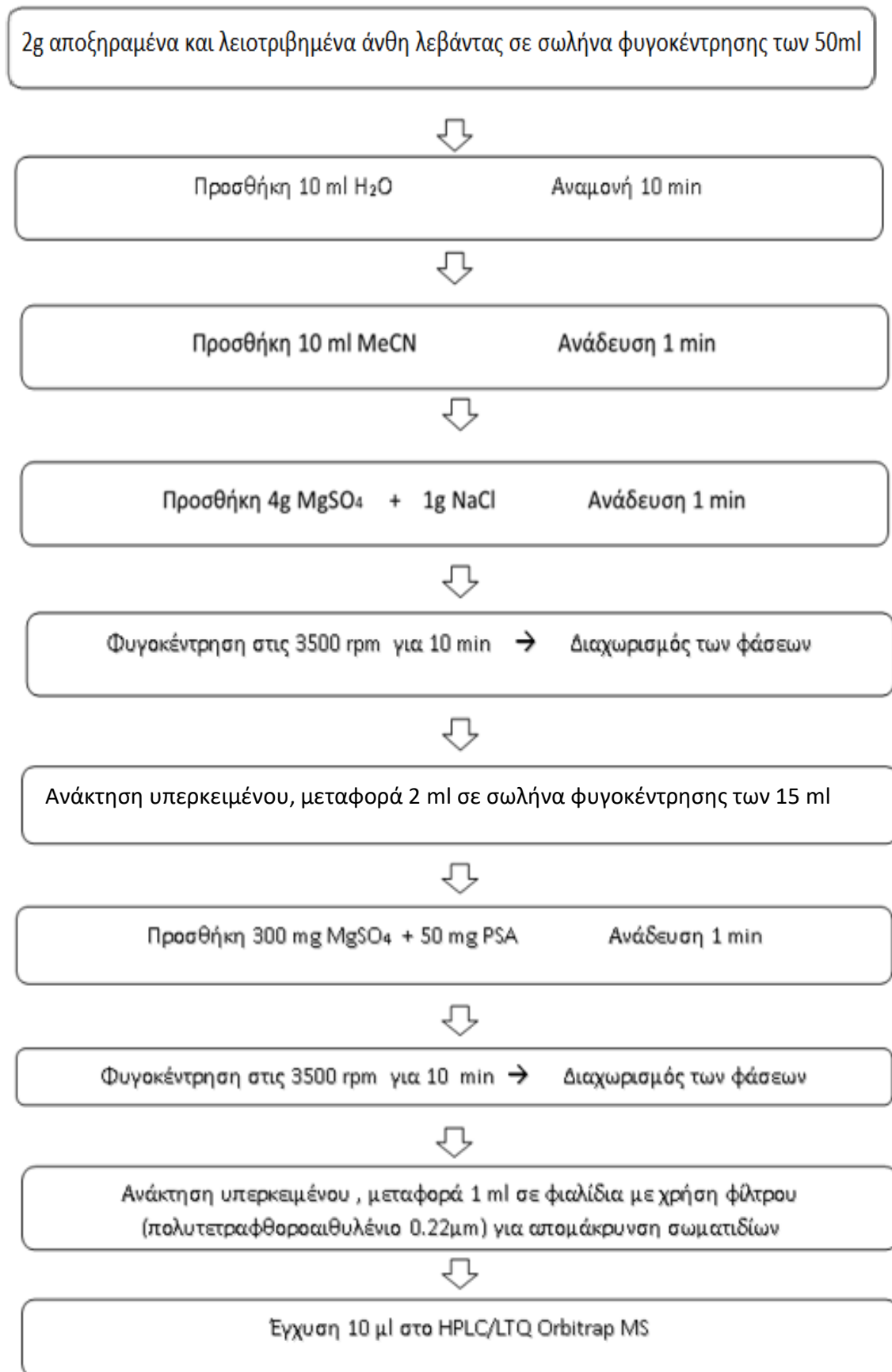
Παραλείφθηκαν 2 ml υπερκείμενου και μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρωσης των 15 ml ο οποίος περιείχε 300 mg MgSO₄ και 50 mg PSA (προσοροφητικά άλατα, για τον καθαρισμό). Το μίγμα ανακινήθηκε με το χέρι και κατόπιν με vortex για 1 min και φυγοκεντρήθηκε για 10 min σε 3500 rpm. Μετά τον διαχωρισμό των φάσεων, 1 ml υπερκείμενου διαλύματος, διηθήθηκε με χρήση φίλτρου σύριγγας (πολυτετραφθοροαιθυλένιο, 0.22 µm) ώστε να απομακρυνθούν τυχόν σωματίδια και μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη για περαιτέρω ανάλυση.



Εικόνα 19: Διαχωρισμός της οργανικής φάσης, που περιέχει τις φυτοπροστατευτικές ουσίες, από την υδατική



Εικόνα 20: Καθαρισμός της οργανικής φάσης από τα πολικά συστατικά του υποστρώματος



Σχήμα 5: Διαδικασία εκχύλισης φυτοφαρμάκων από δείγματα αποξηραμένης λεβάντας με την μέθοδο QuEChERS

5.4. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης UHPLC (LTQ) Orbitrap

Για την χρωματογραφική ανάλυση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης UHPLC, συζευγμένο με γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) και αναλυτή τροχιακής παγίδας Orbitrap της εταιρίας Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany). Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας περιελάμβανε αντλία (Accela Pump Ser. No 750157) καθώς και θερμοστατούμενο σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη (AccelaAS) και χρησιμοποιήθηκε στήλη Fortis C-18 50 x 2,1 mm, 1,7μm, η οποία χρησιμοποιείται για χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Η κινητή φάση αποτελούνταν από τους πολικούς διαλύτες (A) H₂O (LC-MS)+ 0.1% FA και (B) MeOH (LC-MS) + 0.1% FA. Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης το οποίο συνολικά διήρκησε 10 min . Αρχικά, το μίγμα των διαλυτών είχε σύσταση 95% (A) και 5% (B). Η σύνθεση της κινητής φάσης έχει στενή σχέση με τη χρωματογραφική ανάλυση και την αποτελεσματικότητα του ιοντισμού των ενώσεων - στόχων. Η προσθήκη κατά 0,1% φορμικό οξύ στους διαλύτες έκλουσης μεθανόλη και νερό έγινε ώστε να παραχθεί σήμα καλύτερης έντασης. Η σύσταση αυτή μεταβλήθηκε μετά από 1 min με αύξηση του ποσοστού της μεθανόλης το οποίο έφτασε στο 70% στα 2 min. Ακολούθως, το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε ξανά και έφτασε το 100% στα 5 min, όπου και παρέμεινε σταθερό για 2 min. Τελικά, το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες (επαναεξισορρόπηση). Η ταχύτητα ροής ήταν σταθερή στα 250 μL min⁻¹ , ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) ήταν 10 μL και η θερμοκρασία του φούρνου ρυθμίστηκε στους 35 °C.

Πίνακας 8: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης του συστήματος UHPLC/LTQ-ORBITRAP

Χρόνος (min)	Διαλύτες έκλουσης	
	Νερό (LC-MS) + 0,1% φορμικό οξύ	Μεθανόλη (LC-MS) + 0,1% φορμικό οξύ
0	95	5
1	95	5
2	30	70
5	0	100
7	0	100
7,1	95	5
10	95	5

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI) σε θετικό ιοντισμό. Η αντλία παραγωγής αζώτου ήταν της εταιρίας Brezza-Claind (NiGen LCMS 40-1). Η ροή αερίου (sheath gas) είχε τιμή 35 au και η θερμοκρασία του τριχοειδούς σωλήνα μεταφοράς ρυθμίστηκε στους 320° C.

Για να καθοριστεί τόσο ο χρόνος κατακράτησης των προς ανάλυση ενώσεων όσο και η επιλογή των ιόντων (m/z) για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, η ανάλυση έλαβε χώρα αρχικά σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan) στη μέθοδο θετικού ιοντισμού (positive ion mode) και για εύρος μαζών από 120-1000 Da. Για την ταυτοποίηση, επιλέχθηκαν και καταγράφηκαν τα ψευδο-μοριακά ιόντα [M+H]⁺ για όλες τις ενώσεις. Λήφθηκαν υπ' όψιν η υπολογιζόμενη ακριβής μάζα, με σφάλμα μάζας < 5 ppm καθώς και ο χρόνος κατακράτησης της προς ανάλυση ουσίας στο εκχύλισμα και στο πρότυπο με ανοχή ± 0,1 λεπτά. Για επιπλέον επιβεβαίωση, καταγράφηκαν τα χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα θραυσματοποίησης των ψευδομοριακών ιοντών με ακρίβεια μάζας τεσσάρων δεκαδικών και σχετικό σφάλμα μάζας <5 ppm

Πίνακας 9 : Οι συνθήκες των παραμέτρων των συστημάτων ESI και LTQ-ORBITRAP XL

Παράμετροι	Τιμές
Πλήρης σάρωση (Full scan)	Εύρος μαζών 120-1000 Da
Δυναμικό εκνέφωσης (Spray voltage)	4,0 kV
Διακριτική ικανότητα (Resolution)	60.000 FWHM
Ροή αερίου (sheath gas)	35 au
Ροή βοηθητικού αερίου αποδιαλύτωσης (auxiliary gas flow)	10 au
Θερμοκρασία τριχοειδούς σωλήνα μεταφοράς ιόντων (capillary temperature)	320 °C
Δυναμικό πρόσκρουσης (collision energy)	35 Ev
Σχετικό σφάλμα μάζας m/z (mass tolerance)	< 5 ppm
Λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων	Thermo Xcalibur 2.1

5.5. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε αποξηραμένη λεβάντα

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοπροστατευτικών ουσιών στην αποξηραμένη λεβάντα, οι οποίες προσδιορίστηκαν στο UHPLC/LTQ ORBITRAP επιτεύχθηκε με βάση :

α) Τους χρόνους κατακράτησης (Rt) των πρότυπων ουσιών, οι οποίοι συγκρίθηκαν με τους χρόνους κατακράτησης των ουσιών που προσδιορίστηκαν στο εκάστοτε δείγμα ($\pm 2,5\%$).

β) Τις ακριβείς μάζες των ψευδομοριακών ιόντων, σε σχέση με αυτά της εκάστοτε πρότυπης ουσίας με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και σχετικό σφάλμα μάζας $< 5\text{ppm}$.

γ) Τις ακριβείς μάζες των θυγατρικών ιόντων MS^2 συγκρινόμενες με αυτές που προέκυψαν από τις πρότυπες ουσίες, με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και σχετικό σφάλμα μάζας $< 5\text{ppm}$ (Πίνακας 12).

Δημιουργήθηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, οι οποίες συσχέτισαν τη συγκέντρωση της εκάστοτε ουσίας με το αναλυτικό σήμα και υπολογίστηκε ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 της κάθε ευθείας, ο οποίος αποτελεί κριτήριο για την καλή προσαρμογή μεταξύ της ανεξάρτητης και της εξαρτημένης μεταβλητής.

Για να επικυρωθεί η μέθοδος προσδιορισμού των φυτοπροστατευτικών ουσιών μελετήθηκαν οι παρακάτω παράγοντες ποιότητας της μεθόδου: α) γραμμικότητα (linearity), β) ορθότητα, γ) πιστότητα (precision) υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (repeatability) και αναπαραγωγιμότητας (reproducibility), δ) ακρίβεια (accuracy), ε) όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD), στ) όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) και ζ) επίδραση υποστρώματος. Αυτό έγινε σύμφωνα με τις οριζόμενες από τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης διαδικασίες ποιοτικού ελέγχου (quality control), όπως περιγράφονται στην Κοινοτική Απόφαση SANTE/11813/2017 και SANTE/12682/2019.

5.6. Επίδραση υποστρώματος αποξηραμένης λεβάντας

Για να μελετηθεί η επίδραση υποστρώματος παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα φυτοπροστατευτικών ουσιών σε MeCN σε συγκεντρώσεις 2.5-250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και δημιουργήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης. Παρασκευάστηκαν επίσης διαλύματα ίδιων συγκεντρώσεων σε

εκχύλισμα αποξηραμένης λεβάντας, όπως αυτό προέκυψε με τη διαδικασία εκχύλισης και δημιουργήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης και αυτών .

Η επίδραση υποστρώματος (Μ.Ε.) υπολογίστηκε με βάση τη σχέση

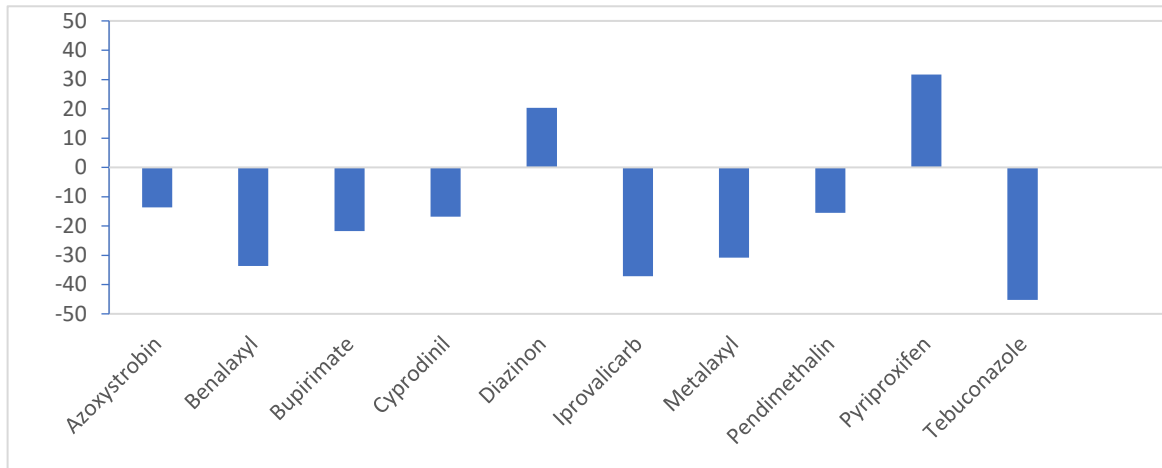
$$ME (\%) = \left(\frac{\text{κλίση ευθείας στο διαλύτη}}{\text{κλίση ευθείας στο εκχύλισμα}} - 1 \right) * 100 \quad \text{Εξίσωση 8}$$

Τιμές της ΜΕ μεταξύ 20% και -20% αντιστοιχούν σε χαμηλή επίδραση υποστρώματος, τιμές μεταξύ -50% και -20% ή μεταξύ 20% και 50% αντιστοιχούν σε μία μέση επίδραση υποστρώματος, και τιμές μικρότερες από -50% ή υψηλότερες από 50% αντιστοιχούν σε υψηλή επίδραση υποστρώματος [120].

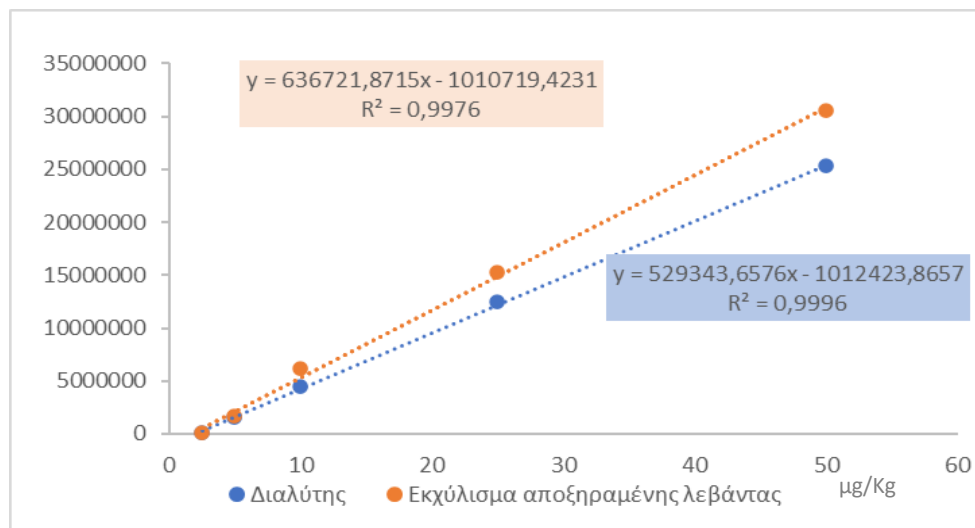
Πίνακας 10: Επίδραση υποστρώματος εκχυλίσματος αποξηραμένης λεβάντας

Φυτοπροστατευτικό	Εύρος συγκέντρωσης (μg/Kg)	Καμπύλη βαθμονόμησης σε καθαρό διαλύτη	Καμπύλη βαθμονόμησης σε υπόστρωμα εκχύλισμα λεβάντας	Μ.Ε.%
Azoxystrobin	5-50	$y=36596x - 103301$	$y= 31590x - 163254$	-13,7
Benalaxyl	5-50	$y = 97646x + 103640$	$y = 64815x - 317218$	-33,6
Bupirimate	5-50	$y = 233173x - 1047300$	$y = 182668x - 603060$	-21,7
Cyprodinil	5-50	$y = 182668x - 603060$	$y = 178434x - 719169$	-16,8
Diazinon	2,5 -50	$y = 529343x - 1012423$	$y = 636721x - 1010719$	20,3
Iprovalicarb	10-250	$y = 69146x + 253516$	$y = 43510x - 369356$	-37,1
Metalaxyl	2,5-50	$y = 69146x + 253516$	$y = 37716x - 96103$	-30,8
Pendimethalin	5-250	$y = 4656,4x - 20464$	$y = 3936,5x - 36339$	-15,5
Pyriproxifen	2,5-50	$y = 37716x - 96103$	$y = 199097x - 589667$	31,7
Tebuconazole	5-100	$y = 199097x - 589667$	$y = 56390x + 229259$	-45,2

Η σύσταση του υποστρώματος είχε χαμηλή επίδραση στην απόκριση του 30% των φυτοπροστατευτικών ουσιών, και μέση επίδραση στο 70% . Στα φυτοφάρμακα με τη χαμηλή επίδραση υποστρώματος, αυτή ήταν αρνητική, ενώ στα φυτοφάρμακα που δέχτηκαν μέτρια επίδραση υποστρώματος, για το 29% αυτή ήταν θετική , δηλαδή εμφάνισαν αύξηση του σήματος απόκρισης, ενώ το 71% αρνητική δηλαδή το σήμα απόκρισης εμφανίστηκε ελαττωμένο σε σχέση με αυτό που εμφάνιζαν στον καθαρό διαλύτη. Κατά συνέπεια, είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθούν καμπύλες βαθμονόμησης που αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο υπόστρωμα ώστε να ακολουθήσει η ποσοτικοποίηση.



Σχήμα 6: Επίδραση υποστρώματος εκχυλίσματος αποξηραμένης λεβάντας



Σχήμα 7: Παράδειγμα επίδρασης υποστρώματος εκχυλίσματος σε MeCN αποξηραμένης λεβάντας στο diazinon

5.7. Στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου

5.7.1. Γραμμικότητα

Για να ελεγχθεί η γραμμικότητα του οργάνου, χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν με εμβολιασμό του υποστρώματος με πρότυπο διάλυμα μίγματος όλων των φυτοφαρμάκων, προκειμένου να κατασκευασθούν οι καμπύλες βαθμονόμησης.

Το πρότυπο διάλυμα μίγματος φυτοφαρμάκων είχε παρασκευαστεί σε διαλύτη MeOH.

Η καμπύλη εμβολιασμένων προτύπων έγινε με συγκεντρώσεις 2.5, 5, 10, 25, 50, 100, 250 µg/kg μίγματος παρασιτοκτόνων. Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προσομοίωσης του

υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 2.5-250 µg/kg. Για τη γραμμικότητα του οργάνου ισχύει $r^2 > 0,99$ για όλες τις ενώσεις των φυτοφαρμάκων (Πίνακας 11).

5.7.2. Ορθότητα -Πιστότητα

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

Οι ανακτήσεις για επίπεδα συγκέντρωσης 50 µg/kg κυμαίνονταν μεταξύ 51,2% για το benalaxyl ως 78,9% για το pendimethalin και για επίπεδα συγκέντρωσης 100 µg/kg κυμαίνονταν μεταξύ 56,1 % για το tebuconazole και 106,6 % για το remdimethalin.

Γενικά, στο δείγμα που τα τελικά επίπεδα συγκέντρωσης ήταν 50 µg/kg, 30 % από το σύνολο των φυτοπροστατευτικών ουσιών εμφάνισαν ανακτήσεις $<60\%$, το 30% εμφάνισαν ανακτήσεις 60-70%, ενώ το υπόλοιπο 40% παρουσίασε ανακτήσεις 70-80% . Στο δείγμα που τα τελικά επίπεδα συγκέντρωσης ήταν 100 µg/kg, 10% από το σύνολο των φυτοπροστατευτικών ουσιών εμφάνισαν ανακτήσεις $<60\%$, το 20% εμφάνισαν ανακτήσεις 60-70% και το υπόλοιπο 70% παρουσίασε ανακτήσεις 70-110%.

Η πιστότητα είναι μέτρο της εγγύτητας της συμφωνίας μεταξύ των επαναλαμβανομένων αποτελεσμάτων της μεθόδου. Μετρά τη διασπορά των αποτελεσμάτων τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, όσο και υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.

Η επαναληψιμότητα ορίζεται ως το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από διαδοχικούς ελέγχους στο ίδιο δείγμα, οι οποίοι πραγματοποιούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες όταν η μέθοδος της ανάλυσης επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η δε αναπαραγωγιμότητα ορίζεται ως το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα, κάτω από διαφορετικές συνθήκες.

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν δείγματα που είχαν εμβολιαστεί σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, 50 και 100 µg/kg. Υπολογίστηκε η % ανάκτηση για κάθε μέτρηση ($n=6$), ο μέσος όρος των ανακτήσεων ($M.O. Rec$) και η απόλυτη τιμή της τυπικής απόκλισης του κάθε δείγματος SDV. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση σύμφωνα με τη σχέση:

$$RSD\% = \frac{SDV}{M.O.Rec} * 100 \quad \text{Εξίσωση 9}$$

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας χρησιμοποιήθηκαν έξι επαναληπτικά δείγματα, τα οποία εγχύθηκαν στο LC-MS-Orbitrap σύστημα κατά την ίδια εργαστηριακή ημέρα. Για να υπολογιστεί η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα επαναλήφθηκε η διαδικασία για έξι δείγματα, τα οποία αναλύθηκαν σε διαφορετικές ημέρες (SANTE, 2019).

Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD_r) των δειγμάτων, που αναλύθηκαν την ίδια μέρα και αποτελούν μέτρο της επαναληψιμότητας, κυμάνθηκαν από 2,7% για το pyriproxyfen ως 19,6% για το metalaxyl. Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD_R) των δειγμάτων που αναλύθηκαν σε διαφορετικές ημέρες, και αποτελούν μέτρο της αναπαραγωγικότητας, κυμάνθηκαν από 5,6% για το Bupirimate, ως 18,4% για το Cyprodinil. Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) πρέπει να έχει τιμές < 20% για όλες τις περιπτώσεις των ενώσεων που αναλύονται (SANTE 2019).

5.7.3. Προσδιορισμός ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Η ανιχνευσιμότητα εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις της προς ανάλυση ουσίας. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκε από την σχέση: $LOQ = 10 * SD/b$ και το όριο ανίχνευσης υπολογίζεται από τον τύπο: $LOD = 3.3 * SD/b$, όπου SD η τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης (response) και b η κλίση (slope) της καμπύλης απόκρισης. Ο συντελεστής 3,3 διασφαλίζει ότι υπάρχει μόνο 0,05% πιθανότητα σφάλματος πρώτου είδους, δηλαδή να αποφασισθεί ότι υπάρχει αναλύτης χωρίς να υπάρχει.

Η τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης εξήχθη από την τυπική απόκλιση των υπολοίπων ($S_{y/x}$) της καμπύλης αναφοράς.

Η γραμμικότητα (r^2) της μεθόδου ήταν σε όλες τις περιπτώσεις > 0,9924.

Τα LOD κυμαίνονταν μεταξύ 2,6 µg/Kg για azoxystrobin και 5,4 µg/Kg για tebucazole, ενώ τα LOQ κυμάνθηκαν μεταξύ 7,9 µg/Kg για το azoxystrobin και 16,4 µg/Kg για το tebuconazole.

Πίνακας 11: Παράμετροι επικύρωσης μεθόδου: Γραμμικότητα (Linearity r^2) Όρια ανίχνευσης (LODs), όρια ποσοτικοποίησης (LOQs), μέσες ανακτήσεις (REC) (%) και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) (%) δύο διαφορετικών επιπέδων ($n = 6$), για υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε αποξηραμένη λεβάντα.

Παρασιτοκτόνο	Γραμμικότητα (r^2)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	Ανακτήσεις και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (n=6)							
				Ενδοημερήσια				Διαημερήσια			
				50 μg/Kg		100 μg/kg		50 μg/Kg		100 μg/kg	
Μέσος όρος ανάκτησης % M.O. _{Rec}	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD _r)	Μέσος όρος ανάκτησης % M.O. _{Rec}	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD _r)	Μέσος όρος ανάκτησης % M.O. _{Rec}	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD _r)	Μέσος όρος ανάκτησης % M.O. _{Rec}	Σχετική τυπική απόκλιση (RSD _r)				
Azoxystrobin	0,9990	2,6	7,9	61,8	12,9	69,6	13,7	59,4	10,5	69,4	11,7
Benalaxyl	0,9954	4,3	13	51,2	14,9	76,5	11,4	52,9	13,8	77,3	9,4
Bupirimate	0,9971	4,8	14,5	74,7	19,1	77,3	4,5	65,5	12,1	76,0	5,6
Cyprodinil	0,9985	3,5	10,8	67,8	14,2	72,2	16,8	70,5	12,2	67,0	18,4
Diazinon	0,9994	3,4	10,3	71,0	8,9	99,8	6,4	78,1	11,9	102,2	10,4
Iprovalicarb	0,9986	4,6	14	53,8	12,5	65,3	17,8	54,5	9,5	67,9	12,8
Metalaxyl	0,9924	4,8	14,6	78,4	17,0	78,6	19,6	83,7	14,0	82,4	15,6
Pendimethalin	0,9963	2,9	8,9	78,9	2,9	106,6	8,8	81,2	6,9	99,7	7,4
Pyriproxifen	0,9977	4,7	14,2	60,3	10,6	76,9	2,7	58,6	13,6	79,0	12,1
Tebuconazole	0,9987	5,4	16,4	51,5	8,5	56,1	13,2	53,9	8,7	61,2	9,8

5.8. Μελέτη προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε δείγματα αποξηραμένης λεβάντας του εμπορίου

Αναλύθηκαν δέκα δείγματα αποξηραμένης λεβάντας, εσοδείας 2022, που αγοράστηκαν από καταστήματα της πόλεως των Ιωαννίνων και της Θεσσαλονίκης.

Η ιχνηλάτιση του προϊόντος δεν ήταν πάντοτε εύκολη, καθώς η πλειοψηφία των καταστηματαρχών είτε δεν ήθελαν να αποκαλύψουν τους προμηθευτές τους είτε προμηθεύονταν το προϊόν από χονδρέμπορους .

Τα δείγματα μέχρι την ανάλυσή τους παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου, στους αρχικούς περιέκτες τους που ήταν θήκες βαμβακερές ή από πολυαιθυλένιο.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματα των δέκα φυτοφαρμάκων που αναφέρονται στον Πίνακα 11.

6. Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε αιθέριο έλαιο λεβάντας

6.1. Πρότυπες ουσίες - διαλύτες - αντιδραστήρια - υλικά - όργανα – συσκευές

6.1.1. Πρότυπες ενώσεις παρασιτοκτόνων

Τα πυκνά πρότυπα διαλύματα αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είχαν παρασκευαστεί από στερεές ουσίες καθαρότητας >99% τα οποία είχε προμηθευτεί το εργαστήριό μας από την εταιρία Sigma - Aldrich (Steinheim, Germany). Τα παρασιτοκτόνα (Azoxystrobin, Benalaxyl, Boscalid, Bupirimate, Carbaryl, Carbendazim, Cyprodynil, Diazinon, Dichlorvos, Dimethoate, Ethion, Fenbuconazole, Fenthion sulfoxide, Iprovalicarb, Metalaxyl, Myclobutanil, Pendimethalin, Pyriproxyfen, Tebuconazole, Thiacloprid) είχαν διαλυθεί σε μεθανόλη υψηλής καθαρότητας Pestiscan, σε συγκεντρώσεις 800-2000 µg/kg και τα διαλύματα είχαν φυλαχτεί σε γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 10 ml στους -20 °C. Πρότυπα διαλύματα μείγματος παρασιτοκτόνων παρασκευάστηκαν έπειτα από τις κατάλληλες αραιώσεις των πυκνών προτύπων σε διαλύτη μεθανόλη [83].

6.1.2. Διαλύτες

- Μεθανόλη LC-MS-grade, του οίκου Fisher Scientific (Leicestershire, UK).
- Οξικό οξύ.

6.1.3. Αντιδραστήρια

- Άνυδρο Na₂SO₄ (καθαρότητας > 99 %), του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany).

6.1.4. Υλικά

- Φιαλίδια 32x11.6 mm, clear glass, του οίκου Target Analysis A.E Kinesis.
- Σύριγγες 1 mL, του οίκου Softcare laboratory series.
- Φίλτρα 13mm 0,22µm PTFE with Luer lock, του οίκου Target analysis s.a.

6.1.5. Όργανα – συσκευές

- Στήλη χρωματογραφίας C18 (Restek), 150 x 4.6 mm με 5µm μέγεθος σωματιδίων (Restek, USA).

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένο με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany).
- Συσκευή Clevenger.
- Φιάλη Αζώτου
- Μικροπιπέτα μηχανική του 0,5-10 μl του οίκου Brand.
- Μικροπιπέτα μηχανική του 10-100 μl του οίκου Eppendorf Research.
- Μικροπιπέτα μηχανική του 100-1000 μl του οίκου Eppendorf Research.

6.2. Προετοιμασία για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε δείγματα αιθέριου ελαίου λεβάντας

Για να κατασκευαστούν οι πρότυπες καμπύλες προσομοίωσης του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε δείγμα αιθέριου ελαίου που αραιώθηκε σε αναλογία έλαιο : διαλύτης = 1:9. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε CH₃OH που περιείχε CH₃COOH 1%, σύμφωνα με την πρόταση των Fillâtre et al. [121].

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα μίγματος φυτοφαρμάκων με συγκεντρώσεις 0,25 - 100 μg/kg και ακολούθηθηκε περαιτέρω χρωματογραφική ανάλυση και ανίχνευση των προς ανάλυση ουσιών με τη μέθοδο του θετικού ιοντισμού.

Οι συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν οι ίδιες που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων αποξηραμένης λεβάντας και αναφέρονται στον Πίνακα 8.

Για την ανίχνευση των φυτοφαρμάκων, οι συνθήκες που εφαρμόστηκαν για το διαχωρισμό των ουσιών στο θετικό ιονισμό ήταν επίσης οι ίδιες που χρησιμοποιήθηκαν για τα δείγματα αποξηραμένης λεβάντας και αναφέρονται στον Πίνακα 9. Οι ίδιοι περιορισμοί χρησιμοποιήθηκαν και για την περαιτέρω επιβεβαίωση με καταγραφή των ψευδομοριακών ιόντων και των χαρακτηριστικών θυγατρικών ιόντων θραυσματοποίησης των ψευδομοριακών ιόντων, με ακρίβεια μάζας τεσσάρων δεκαδικών, όπως φαίνονται στον Πίνακα 13 (χρόνος κατακράτησης της προς ανάλυση ουσίας στα πρότυπα με ανοχή $\pm 0,1$ min, σφάλμα μάζας < 5 ppm) .

Πίνακας 12 : Χρόνοι κατακράτησης (R_t), θεωρητικές και πειραματικές μάζες και σχετικό σφάλμα μαζών (Mass Accuracy) των ψευδο-μοριακών ιόντων και θυγατρικά ιόντα (Frangmentation ions) κατά τον θετικό ιοντισμό των παρασιτοκτόνων στο σύστημα UHPLC/LTQ-ORBITRAP

Παρασιτοκτόνο	R_t	Μοριακός τύπος [M+H] ⁺	Θεωρητική μάζα (m/z)	Πειραματική μάζα (m/z)	Σχετικό σφάλμα μαζών (Δppm)	Θυγατρικά ιόντα 45 % NCE
Azoxystrobin	4,25	C ₂₂ H ₁₈ N ₃ O ₅	404,1240	404,1245	0,997	372,0974
Benalaxyl	5,04	C ₂₀ H ₂₄ NO ₃	326,1751	326,1751	0,092	148,1119/ 208,1331
Boscalid	4,39	C ₁₈ H ₁₃ Cl ₂ N ₂ O	343,0399	343,0401	0,452	307,0626/ 139,9898
Bupirimate	4,45	C ₁₃ H ₂₅ N ₄ O ₃ S	317,1642	317,1644	0,669	166,0973/ 237,2070
Carbaryl	3,9	C ₁₂ H ₁₂ NO ₂	202,0863	202,0867	2,350	145,0650
Carbendazim	3,13	C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₂	192,0767	192,0768	0,244	160,0505/ 132,0556
Cyprodinil	4,73	C ₁₄ H ₁₆ N ₃	226,1339	226,1342	1,441	210,1024/ 185,1074/ 144,0806/133,0757/ 108,0802
Diazinon	5,87	C ₁₂ H ₂₂ N ₂ O ₃ PS	305,1083	305,1084	0,086	169,0789/ 153,1021
Dichlorvos	3,85	C ₄ H ₈ Cl ₂ O ₄ P	220,9532	220,9533	0,556	144,9813/ 127,0151/ 109,0045
Dimethoate	3,45	C ₅ H ₁₃ NO ₃ PS ₂	230,0069	230,0067	-0,859	170,9697
Ethion	5,73	C ₉ H ₂₃ O ₄ P ₂ S ₄	384,9949	384,9949	0,022	215,0324/199,0013/ 170,9747/142,9386/ 97,8836
Fenbuconazole	4,78	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₄	337,1215	337,1216	0,442	194,0476/ 125,0149
Fenthion sulfoxide	3,89	C ₁₀ H ₁₆ O ₄ PS ₂	295,0222	295,0223	0,294	264,0033/ 201,0400/ 279,9983
Iprovalicarb	4,54	C ₁₈ H ₂₉ N ₂ O ₃	321,2172	321,2174	0,407	119,0851
Metalaxyl	4,13	C ₁₅ H ₂₂ NO ₄	280,1543	280,1544	0,233	248,1281/ 220,1332
Myclobutanil	4,52	C ₁₅ H ₁₈ ClN ₄	289,1215	289,1217	0,862	220,0882/ 125,0148
Pendimethalin	5,99	C ₁₃ H ₂₀ N ₃ O ₄	282,1448	282,1447	0,435	148,0625/178,0655/ 163,0483
Pyriproxyfen	5,84	C ₂₀ H ₂₀ NO ₃	322,1438	322,1441	1,024	227,1064/ 185,0591
Tebuconazole	5,84	C ₁₆ H ₂₃ ClN ₃ O	308,1524	308,1523	-0,378	151,0306/ 290,1402
Thiacloprid	3,58	C ₁₀ H ₁₀ ClN ₄ S	253,0309	253,0309	-0,084	126,0102

6.3. Επίδραση υποστρώματος αιθέριου ελαίου λεβάντας

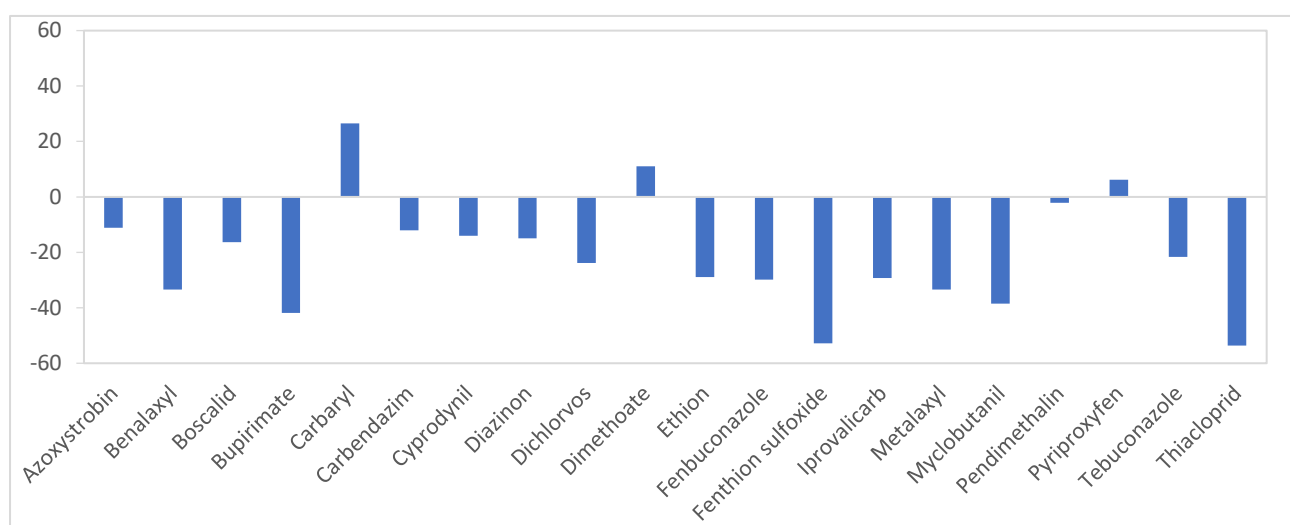
Για να μελετηθεί η επίδραση υποστρώματος παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα φυτοπροστατευτικών ουσιών σε MeOH που περιείχε CH₃COOH 1%, σε συγκεντρώσεις 0,25-100 μg/kg και δημιουργήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης. Παρασκευάστηκαν επίσης διαλύματα ίδιων συγκεντρώσεων σε αιθέριο έλαιο λεβάντας, αραιωμένο με διαλύτη CH₃OH που περιείχε CH₃COOH 1% σε αναλογία έλαιο : διαλύτης = 1:9 και δημιουργήθηκε η καμπύλη βαθμονόμησης και αυτών.

Η επίδραση υποστρώματος (Μ.Ε.) υπολογίστηκε με βάση την εξίσωση 1 και φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 13.

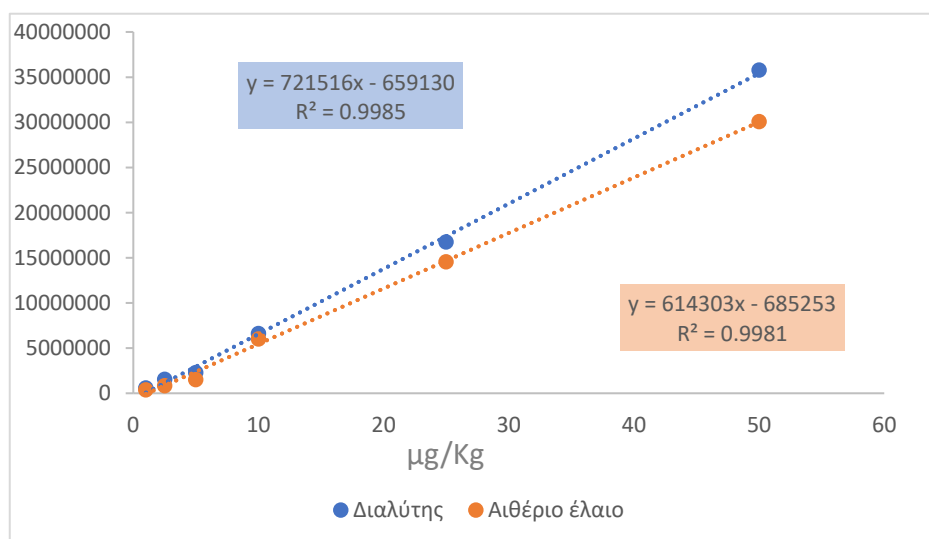
Πίνακας 13: Επίδραση υποστρώματος αιθέριου ελαίου λεβάντας

Φυτοπροστατευτικό	Εύρος συγκέντρωσης (μg/Kg)	Καμπύλη βαθμονόμησης σε καθαρό διαλύτη	Καμπύλη βαθμονόμησης σε αιθέριο έλαιο λεβάντας	ΜΕ
Azoxystrobin	1-50	$y = 38423x - 100591$	$y = 34163x - 87673$	-11,1
Benalaxyl	1-50	$y = 34163x - 87673$	$y = 112112x - 263640$	-33,4
Boscalid	2,5-50	$y = 10841x - 14737$	$y = 9069,7x - 24284$	-16,3
Bupirimate	0,5-25	$y = 271145x - 180191$	$y = 157819x - 223976$	-41,8
Carbaryl	5-50	$y = 7726,5x - 46662$	$y = 9775,7x - 34243$	26,5
Carbendazim	2,5-50	$y = 17597x - 42258$	$y = 15471x - 41935$	-12,1
Cyprodynil	0,5-50	$y = 1162432x - 172727$	$y = 999493x - 733242$	-14,0
Diazinon	1-50	$y = 721516x - 659130$	$y = 614303x - 685253$	-14,9
Dichlorvos	1-25	$y = 37718x - 36057$	$y = 28756x - 39474$	-23,8
Dimethoate	1-50	$y = 45776x - 100221$	$y = 50873x - 85511$	11,1
Ethion	2,5-25	$y = 25911x - 42570$	$y = 25911x - 42570$	-28,9
Fenbuconazole	1-50	$y = 119296x - 273451$	$y = 83796x - 208908$	-29,8
Fenthion sulfoxide	2,5-25	$y = 50010x - 93243$	$y = 23626x - 53632$	-52,8
Iprovalicarb	0,5-25	$y = 142688x - 52573$	$y = 100970x - 133341$	-29,2
Metalaxyl	1-25	$y = 130175x - 27468$	$y = 86754x - 118690$	-33,4
Myclobutanil	1-25	$y = 142552x - 180976$	$y = 87648x - 116709$	-38,5
Pendimethalin	2,5-50	$y = 14844x - 29032$	$y = 12571x - 43905$	-2,1
Pyriproxyfen	0,25-50	$y = 833041x - 380908$	$y = 885083x - 617201$	6,2
Tebuconazole	1-100	$y = 369773x - 804962$	$y = 289994x - 895802$	-21,6
Thiacloprid	2,5-50	$y = 42858x - 123704$	$y = 19885x - 62576$	-53,6

Η σύσταση του υποστρώματος είχε χαμηλή επίδραση στην απόκριση του 40% των φυτοπροστατευτικών ουσιών, μέση επίδραση στο 50% και υψηλή επίδραση στο 10%. Στα φυτοφάρμακα με τη χαμηλή επίδραση υποστρώματος στο 25% ήταν θετική, ενώ στα φυτοφάρμακα που δέχτηκαν μέτρια επίδραση υποστρώματος, για το 12,5% αυτή ήταν θετική, ενώ το 85,5% αρνητική. Τέλος, στα φυτοφάρμακα με υψηλή επίδραση υποστρώματος αυτή ήταν σε όλα αρνητική. Κατά συνέπεια, είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθούν καμπύλες βαθμονόμησης που αντιστοιχούν στο συγκεκριμένο υπόστρωμα ώστε να ακολουθήσει η ποσοτικοποίηση.



Σχήμα 8: Επίδραση υποστρώματος αιθέριου ελαίου λεβάντας



Σχήμα 9 : Παράδειγμα επίδρασης υποστρώματος αιθέριου ελαίου λεβάντας αραιωμένο με διαλύτη CH_3OH που περιείχε CH_3COOH 1% σε αναλογία έλαιο : διαλύτης = 1:9, στο diazinon

6.4. Στοιχεία επικύρωσης της μεθόδου

6.4.1. Γραμμικότητα - μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση

Για τον έλεγχο της γραμμικότητας του οργάνου χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν με εμβολιασμό του αιθέριου ελαίου με πρότυπο διάλυμα μίγματος όλων των φυτοφαρμάκων προκειμένου να κατασκευασθούν οι καμπύλες βαθμονόμησης και στη συνέχεια αραιώθηκαν με διαλύτη CH_3OH που περιείχε CH_3COOH 1% σε αναλογία έλαιο : διαλύτης = 1:9 έτσι ώστε τα διαλύματα που παρασκευάστηκαν είχαν συγκέντρωση μίγματος παρασιτοκτόνων 0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Το πρότυπο διάλυμα μίγματος φυτοφαρμάκων είχε παρασκευαστεί σε διαλύτη MeOH .

Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προσομοίωσης του υποστρώματος σε συγκεντρώσεις 0.25-100.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Για τη γραμμικότητα του οργάνου ισχύει $r^2 > 0,99$ για όλες τις ενώσεις των παρασιτοκτόνων .

Για κάθε συγκέντρωση λήφθηκαν έξι μετρήσεις και υπολογίστηκε η σχετική τυπική απόκλιση από την τυπική απόκλιση των υπολοίπων (Sy/x) της καμπύλης αναφοράς. Η μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση για κάθε φυτοπροστατευτική ουσία είναι μικρότερη από 20% (Πίνακας 14). Συγκεκριμένα, οι τιμές της μέγιστης σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD_{MAX}) κυμάνθηκαν από 5,6 % για το tebuconazole ως 19,2% για το azoxystrobin.

6.4.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (LOD-LOQ)

Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) υπολογίστηκε από την σχέση: $\text{LOQ} = 10 * \text{SD}/b$ και το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε από τη σχέση: $\text{LOD} = 3.3 * \text{SD}/b$, όπου SD η τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης (response) και b η κλίση (slope) της καμπύλης απόκρισης.

Τα LOD κυμαίνονταν μεταξύ 1,4 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ για thiacloprid και 6,5 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ για pendimethalin, ενώ τα LOQ κυμάνθηκαν μεταξύ 4,3 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για το thiacloprid και 19,7 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ για το pendimethalin.

Όσον αφορά την επικινδυνότητα των αιθέριων ελαίων λόγω της ποσότητας υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων που μπορεί να περιέχουν, γενικά, θεωρείται ασφαλής η χρήση τους καθώς περιορίζεται σε πολύ μικρές ποσότητες. Επίσης, τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων που ανιχνεύονται στο αιθέριο έλαιο, εξαρτώνται από τον τρόπο παραγωγής του. Εκείνα που παράγονται με ψυχρή έκθλιψη έχουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες υπολειμμάτων από εκείνα που παράγονται με απόσταξη [122].

Πίνακας 14: Εξίσωση ευθείας βαθμονόμησης φυτοφαρμάκου σε υπόστρωμα αιθέριο έλαιο λεβάντας, γραμμικότητα (Linearity r^2), όριο ανίχνευσης, όριο ποσοτικοποίησης και μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση

Φυτοπροστατευτικό	Rt	Εύρος γραμμικότητας (μg/Kg)	Εξίσωση ευθείας βαθμονόμησης	r^2	LOD (μg/L)	LOQ (μg/L)	μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση % (n=6)
Azoxystrobin	4,25	1-50	$y = 39590x - 165029$	0,9908	5,1	15,6	19,2
Benalaxyl	5,04	1-50	$y = 116887x - 318648$	0,9971	2,4	7,3	11,5
Boscalid	4,39	2,5-25	$y = 11409x - 51606$	0,9919	4,8	14,6	18,9
Bupirimate	4,45	0,5-25	$y = 213847x - 572165$	0,9966	2,8	8,4	12,8
Carbaryl	3,9	1-25	$y = 10928x - 46744$	0,9907	2,4	7,2	12,9
Carbendazim	3,13	2,5-25	$y = 13873x - 39857$	0,9987	3,6	11,0	14,4
Cyprodynil	4,73	0,5-50	$y = 1116601x - 1982977$	0,9955	2,8	8,4	9,0
Diazinon	5,87	1-50	$y = 712885x - 2072271$	0,9927	3,0	9,2	6,5
Dichlorvos	3,85	1-25	$y = 34214x - 107303$	0,9929	2,5	7,7	13,1
Dimethoate	3,45	1-50	$y = 59000x - 170918$	0,9967	4,2	12,6	13,3
Ethion	5,73	2,5-25	$y = 27205x - 117881$	0,9953	2,5	7,7	8,9
Fenbuconazole	4,78	1-100	$y = 85626x - 270684$	0,9968	4,6	14,0	13,6
Fenthion sulfoxide	3,89	2,5-50	$y = 31286x - 160539$	0,9915	3,4	10,2	6,0
Iprovalicarb	4,54	0,5-25	$y = 118756x - 343090$	0,9950	3,0	9,2	17,4
Metalaxyl	4,13	1-50	$y = 104831x - 365498$	0,9936	5,5	16,7	8,7
Myclobutanil	4,52	1-25	$y = 108654x - 306566$	0,9976	3,7	11,1	8,1
Pendimethalin	5,99	2,5-50	$y = 13989x - 68997$	0,9944	6,5	19,7	5,9
Pyriproxyfen	5,84	0,25-50	$y = 886761x - 779807$	0,9990	2,7	8,1	7,6
Tebuconazole	5,84	1-25	$y = 277434x - 812223$	0,9960	3,6	11,0	5,6
Thiacloprid	3,58	1-25	$y = 20912x - 71082$	0,9944	1,4	4,3	7,1

6.5. Παρασκευή δειγμάτων αιθέριου ελαίου λεβάντας από φυτικό υλικό

Σε 100 g αποξηραμένων και λειοτριβημένων ανθών λεβάντας προστέθηκε μίγμα πρότυπων φυτοφαρμάκων έτσι ώστε τα τελικά επίπεδα συγκέντρωσή τους να είναι 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Το δείγμα αφέθηκε 30 min ώστε να απορροφήσει τα φυτοφάρμακα, και στη συνέχεια έγινε υδραπόσταξη του σε συσκευή τύπου Clevenger. Τοποθετήθηκε σε σφαιρική φιάλη των 2 lt στην οποία προστέθηκε 1 lt νερό και ο συνολικός χρόνος που διήρκεσε η απόσταξη ήταν 2 h. Στο σωλήνα της συσκευής, ο οποίος είναι διαβαθμισμένος ανά 0,01 mL μετρήθηκε η ποσότητα αιθέριου ελαίου που παραλήφθηκε. Η απόδοση ήταν 1,5 %.



Εικόνα 21: Πειραματική διάταξη υδραπόσταξης λεβάντας

Η απόσταξη επαναλήφθηκε σε δύο ακόμη δείγματα φυτικού υλικού εμβολιασμένα με μίγμα πρότυπων φυτοφαρμάκων ώστε τα τελικά επίπεδα συγκέντρωσής των φυτοφαρμάκων να είναι 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ τα οποία αμφότερα, απέδωσαν αιθέριο έλαιο σε ποσοστό 1,8% . Από το αιθέριο έλαιο που συλλέχθηκε σε κάθε περίπτωση, απομακρύνθηκε η πιθανή υγρασία με χρήση μικρής ποσότητας θειικού νατρίου (Na_2SO_4). Στη συνέχεια, αποθηκεύτηκε σε γυάλινο φιαλίδιο από το οποίο απομακρύνθηκε το οξυγόνο πριν σφραγιστεί με τη διοχέτευση αζώτου (N_2) ώστε να προφυλαχθούν τα ευαίσθητα συστατικά του από την οξείδωση. Στην αποφυγή της αλλοίωσής του συνετέλεσε και η φύλαξή του στους 4 °C μέχρι να αναλυθεί. Συλλέχθηκαν επίσης τρία δείγματα υδρολύματος, ένα από κάθε δείγμα φυτικού υλικού, τα οποία επίσης αποθηκεύτηκαν σε γυάλινα φιαλίδια και φυλάχθηκαν στους 4 °C μέχρι την ανάλυσή τους.

6.6. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα δείγματα αιθέριου ελαίου που παρασκευάστηκαν με υδραπόσταξη

Για να πραγματοποιηθεί ο ποιοτικός κι ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοπροστατευτικών ουσιών που πιθανόν μεταφέρθηκαν με τη διαδικασία της υδραπόσταξης στα δείγματα του αιθέριου ελαίου, χρησιμοποιήθηκε το σύστημα UHPLC/LTQ ORBITRAP, διατηρώντας τις παραμέτρους που αναφέρονται στους πίνακες 8 και 9. Συνυπολογίσθηκαν:

α) Ο χρόνος κατακράτησης (R_t) των ουσιών που προσδιορίστηκαν στα διαλύματα που παρασκευάστηκαν από τα δείγματα τα οποία προήλθαν από τη διαδικασία της υδραπόσταξης, συγκρινόμενος με το χρόνο κατακράτησης των φυτοπροστατευτικών ουσιών σε πρότυπα διαλύματα που παρασκευάστηκαν με εμβολιασμό των παρασιτοκτόνων σε διάλυμα αιθέριου ελαίου λεβάντας ($\pm 2,5\%$).

β) Η ακριβής μάζα των ψευδομοριακών ιόντων, σε σχέση με αυτών της πρότυπης ουσίας με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και σχετικό σφάλμα μάζας $< 5\text{ppm}$.

γ) Οι ακριβείς μάζες των θυγατρικών ιόντων MS^2 συγκρινόμενες με αυτές που προέκυψαν από τις πρότυπες ουσίες με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και σχετικό σφάλμα μάζας $< 5\text{ppm}$ (Πίνακας 12)

Σύμφωνα με τους Fillatre et al. [123], η διαδικασία παραγωγής αιθέριων ελαίων οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης διάφορων συστατικών, κατ' επέκταση και των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Για παράδειγμα, φτάνουν ακόμα και σε 100πλάσιες ποσότητες στο αιθέριο έλαιο πορτοκαλιού που εξάγεται με συμπίεση εν ψυχρώ από το φλοιό του πορτοκαλιού, όπως υποστηρίζουν οι Mahmoud S. Elshabrawya et al. [124].

Επειδή δεν γνωρίζαμε εκ των προτέρων τα επίπεδα συγκέντρωσης των φυτοπροστατευτικών ουσιών που ίσως περνούσαν στο αιθέριο έλαιο, οι μέγιστες συγκεντρώσεις υπολογίστηκαν θεωρώντας ότι η συνολική ποσότητα των παρασιτοκτόνων θα περνούσε στο έλαιο και βρέθηκαν ως εξής :

α) 667 $\mu\text{g/L}$ για το έλαιο που προέκυψε από το φυτικό υλικού που εμβολιάστηκε σε συγκεντρώσεις 10 $\mu\text{g/Kg}$.

β) 2778 $\mu\text{g/L}$ για το έλαιο που προέκυψε από το φυτικό υλικού που εμβολιάστηκε σε συγκεντρώσεις 50 $\mu\text{g/Kg}$.

γ) 5556 $\mu\text{g/L}$ για το έλαιο που προέκυψε από το φυτικό υλικού που εμβολιάστηκε σε συγκεντρώσεις 100 $\mu\text{g/Kg}$.

Από κάθε δείγμα αιθέριου ελαίου, παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα με διαλύτη CH₃OH που περιείχε CH₃COOH 1%, ένα με αναλογία έλαιο : διαλύτης 1:9 και ένα δεύτερο, με αναλογία έλαιο : διαλύτης 1:99. Αυτό έγινε ώστε να διασφαλιστεί ότι η περιεκτικότητα του δείγματος θα ήταν εντός του εύρους των συγκεντρώσεων που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία των καμπυλών αναφοράς, καθώς οι θεωρητικά υπολογισμένες μέγιστες συγκεντρώσεις όπως αναφέρονται παραπάνω, με την αραιώση 1:9 θα οδηγούσαν σε συγκεντρώσεις δείγματος 67 , 278 και 556 µg/L.

Για να δημιουργηθεί η πρώτη καμπύλη βαθμονόμησης, το αιθέριο έλαιο λεβάντας αραιώθηκε με διαλύτη CH₃OH που περιείχε CH₃COOH 1% σε αναλογία έλαιο : διαλύτης 1:9 και προστέθηκαν πρότυπα διαλύματα φυτοφαρμάκων, ώστε να δημιουργηθούν διαλύματα σε συγκεντρώσεις 0.25, 0.5 , 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 και 100.0 µg/kg.

Για να δημιουργηθεί η δεύτερη καμπύλη βαθμονόμησης, το αιθέριο έλαιο λεβάντας αραιώθηκε με διαλύτη CH₃OH που περιείχε CH₃COOH 1% σε αναλογία έλαιο : διαλύτης 1:99 και προστέθηκαν πρότυπα διαλύματα φυτοφαρμάκων, ώστε να δημιουργηθούν διαλύματα σε συγκεντρώσεις 0.25, 0.5 , 1.0, 2.5, 5.0, 10.0, 25.0, 50.0 και 100.0 µg/kg.

Η δεύτερη καμπύλη αναφοράς δημιουργήθηκε, αν και είχε τις ίδιες συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών ουσιών με την πρώτη, για να εμφανίζουν τα πρότυπα διαλύματα συγκρίσιμη επίδραση υποστρώματος με τα δείγματα αντίστοιχης αραιώσης.

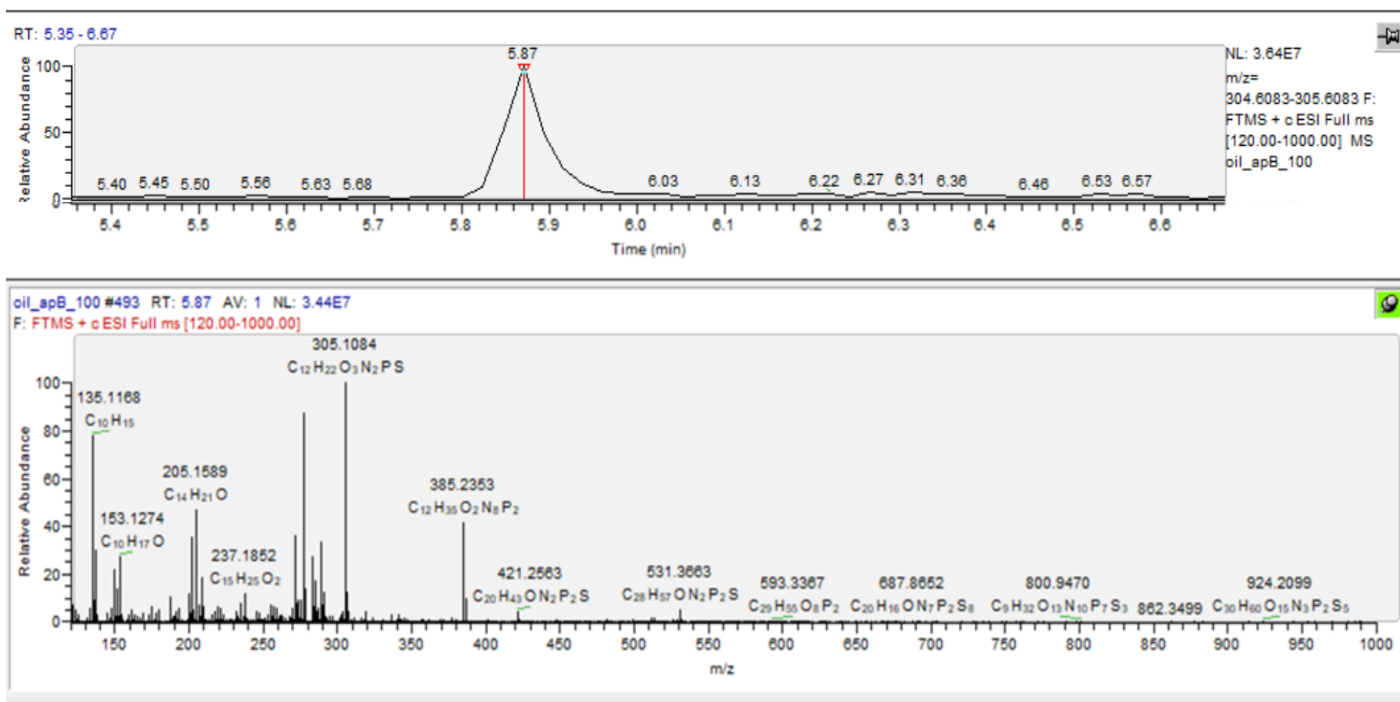
Στις καμπύλες αναφοράς που δημιουργήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων, συσχετίστηκαν η συγκέντρωση της ουσίας με το αναλυτικό σήμα και υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης της κάθε ευθείας, ο οποίος σε κάθε περίπτωση βρέθηκε $r^2 \geq 0.99$.

Κάθε δείγμα μετρήθηκε τρεις φορές για να υπολογιστεί ο μέσος όρος του % ποσοστού των φυτοπροστατευτικών ουσιών που πέρασαν από την αποξηραμένη λεβάντα στο έλαιο και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD).

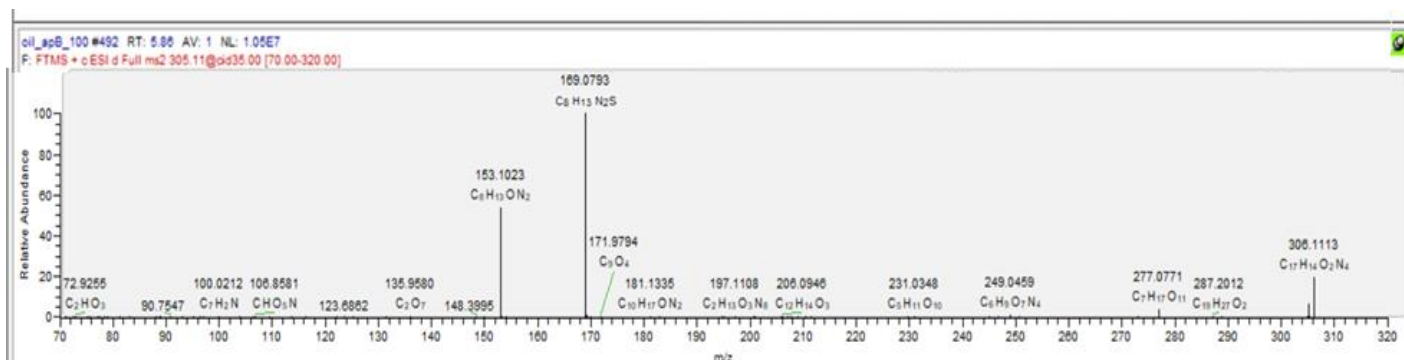
Η μοναδική φυτοπροστατευτική ουσία που ανιχνεύθηκε να μεταφέρεται από το αποξηραμένο φυτικό υλικό στο αιθέριο έλαιο ήταν το Diazinon.

Στην εικόνα 22 φαίνεται η κορυφή του χρωματογραφήματος που οφείλεται στην ουσία και το ψευδομοριακό ιόν C₁₂H₂₂N₂O₃PS⁺, ενώ στην εικόνα 23 φαίνονται τα δύο κύρια θυγατρικά ιόντα α) Το ιόν με σχετική μοριακή μάζα 169.0793 με σχετική αφθονία 100, για το οποίο προτείνεται ο μοριακός τύπος C₈H₁₃N₂S

β) Το ιόν με σχετική μοριακή μάζα 153.1023, με σχετική αφθονία 58 , για το οποίο προτείνεται ο μοριακός τύπος $C_8H_{13}ON_2$



Εικόνα 22 :Ανίχνευση του ψευδομοριακού ιόντος $C_{12}H_{22}N_2O_3PS^+$ που αντιστοιχεί στο Diazinon



Εικόνα 23: Ανίχνευση των θυγατρικών ιόντων που προκύπτουν από τη διάσπαση του Diazinon

Με βάση τα παραπάνω, υπολογίστηκε το ποσοστό του diazinon που μεταφέρθηκε στο έλαιο ως εξής :

α) Στο έλαιο που προέκυψε από το δείγμα που εμβολιάστηκε σε συγκέντρωση 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ο μέσος όρος του ποσοστού μεταφοράς ήταν 20.4% με RSD_r 5.4% και αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση 136 $\mu\text{g}/\text{L}$ ελαίου.

β) Στο έλαιο που προέκυψε από το δείγμα που εμβολιάστηκε σε συγκέντρωση 50 µg/kg, ο μέσος όρος του ποσοστού μεταφοράς ήταν 21.6 % με RSD_r 9.9% και αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση 600 µg/L ελαίου

γ) Στο έλαιο που προέκυψε από το δείγμα που εμβολιάστηκε σε συγκέντρωση 100 µg/kg, ο μέσος όρος του ποσοστού μεταφοράς ήταν 22.9% με RSD_r 10.1%, και αντιστοιχούσε σε συγκέντρωση 1270 µg/L ελαίου.

Στον πίνακα 15 παρουσιάζονται τα παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν, η διαλυτότητά τους στο νερό, η τάση ατμών που συσχετίζεται με την πτητικότητα, και ο λογάριθμος του συντελεστής κατανομής n-οκτανόλης-νερού ($\log K_{ow}$). Όλες οι φυτοπροστατευτικές ουσίες εκτός από το Dichlorvos (2,2-Διχλωροαιθενυλοδιμεθυλοφωσφορικός εστέρας) έχουν κατά μέγιστο υποδεκαπλάσια τάση ατμών από το Diazinon. Αυτό θα μπορούσε να δώσει μια εξήγηση για το γεγονός ότι δεν αποστάζουν μαζί με το αιθέριο έλαιο. Ενδεικτικά, η τάση ατμών της καμφοράς, της λιναλουόλης και της 1,8 κινεόλης, που είναι χαρακτηριστικά συστατικά του αιθέριου ελαίου, είναι 0.2, 0.17 και 1.9 mmHg αντίστοιχα.

Το Dichlorvos, έχει μεγαλύτερη τάση ατμών από το Diazinon, και πολύ μεγαλύτερη διαλυτότητα στο νερό (1889 mg/L) η οποία είναι μάλιστα συγκρίσιμη με αυτή της καμφοράς, της λιναλουόλης και της 1,8 κινεόλης (1600, 1590 και 3500 mg/L αντίστοιχα). Ωστόσο, δεν ανιχνεύθηκε στο έλαιο, καθώς η επαφή του με το νερό, στη θερμοκρασία που γίνεται η απόσταξη και για το χρονικό διάστημα που διαρκεί, οδηγεί στην υδρόλυσή του και την παραγωγή διμεθυλοφωσφορικού εστέρα και διχλωροακεταλδεΐδης [125].

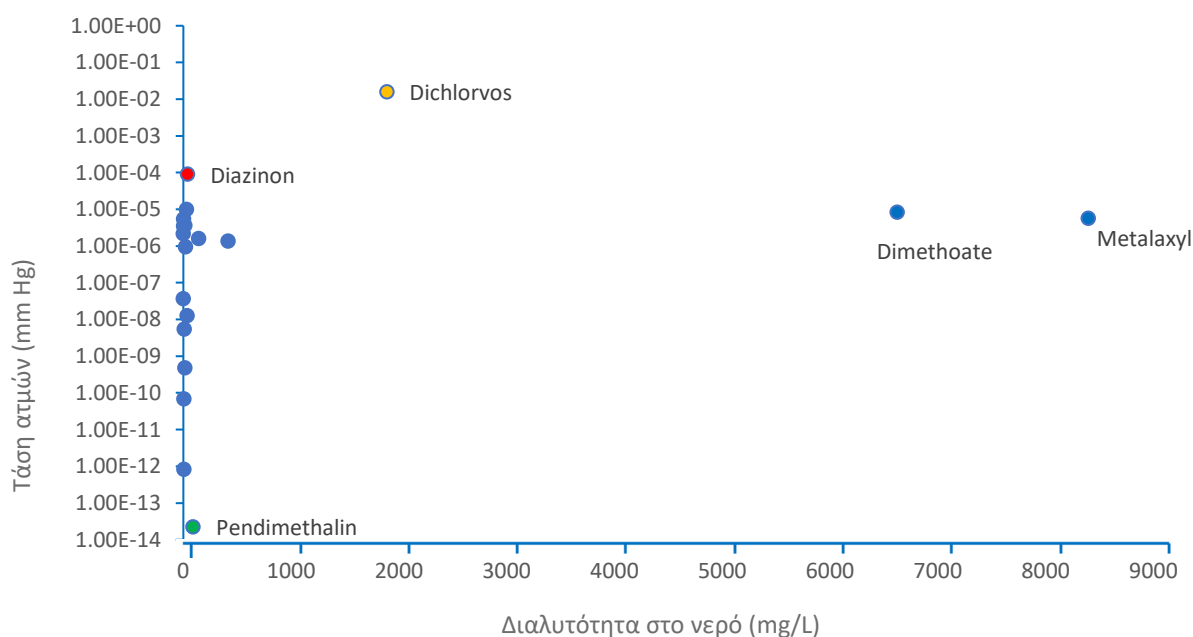
6.7. Ποιοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα δείγματα υδρολύματος που παρασκευάστηκαν με υδραπόσταξη

Τα δείγματα υδρολύματος δεν υποβλήθηκαν σε καμία περεταίρω διαδικασία πριν την έκχυση τους στο σύστημα UHPLC/LTQ ORBITRAP και σε αυτά δεν ανιχνεύθηκε καμία από τις φυτοπροστατευτικές ουσίες που μελετήθηκαν.

Οι τιμές της κατανομής οκτανόλης - νερού δείχνουν πως η φυτοπροστατευτική ουσία κατανέμεται μεταξύ οργανικής και υδατικής φάσης. Με $\log K_{ow} = 3.81$ το Diazinon κατανέμεται τόσο περισσότερο στην οργανική φάση, που εξηγείται η αδυναμία να ανιχνευθεί στο υδρόλυμα, αν και ανιχνεύθηκε στο έλαιο.

Πίνακας 15 : Διαλυτότητα, τάση ατμών και log Kow των παρασιτοκτόνων [137], [136]

Παρασιτοκτόνο	Διαλυτότητα στο νερό (mg/L)	Τάση ατμών (mm Hg σε 25 °C)	log Kow
Azoxystrobin	6.0	8.25×10^{-13}	2.50
Benalaxyl	28.6	1.00×10^{-5}	3.40
Boscalid	4.6	6.89×10^{-11}	2.96
Bupirimate	22	9.5×10^{-7}	2.70
Carbaryl	416	1.36×10^{-6}	2.35
Carbendazim	29	5.44×10^{-9}	1.55
Cyprodinil	15	3.68×10^{-6}	3.59
Diazinon	40	9.01×10^{-5}	3.81
Dichlorvos	1889	1.58×10^{-2}	1.43
Dimethoate	6626	8.25×10^{-6}	0.78
Ethion	2	3.54×10^{-6}	5.07
Fenbuconazole	0.2	0.37×10^{-7}	3.23
Fenthion sulfoxide	3.72	5.51×10^{-6}	1.92
Iprovalicarb	13.22	4.8×10^{-10}	3.33
Metalaxyl	8400	5.62×10^{-6}	1.65
Myclobutanil	142	1.6×10^{-6}	2.94
Pendimethalin	89.68	2.22×10^{-14}	2.62
Pyriproxyfen	0.1685	2.18×10^{-6}	5.55
Tebuconazole	36	1.28×10^{-8}	3.89
Thiacloprid	231.9	1.13×10^{-6}	2.33



Σχήμα 10: Φυτοπροστατευτικές ουσίες σε σχέση με τη διαλυτότητα και την τάση ατμών

Συμπεράσματα

Η μέθοδος QuEChERS, είναι πλέον η πιο χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκχύλισης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε διάφορα υποστρώματα, τροποποιημένη ανάλογα με το υπόστρωμα και τις ενώσεις που πρόκειται να απομονωθούν. Στην παρούσα εργασία το υπόστρωμα ήταν αποξηραμένη λεβάντα.

Μετά την απομόνωση των φυτοπροστατευτικών ουσιών, χρησιμοποιήθηκε για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους, τόσο στο εκχύλισμα που προέκυψε από την μέθοδο QuEChERS όσο και σε αιθέριο έλαιο λεβάντας, σύστημα χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης UHPLC συζευγμένο με σύστημα φασματομετρίας μάζας με θετικό ιονισμό, που αποτελούνταν από γραμμική παγίδα ιόντων (LTQ) και αναλυτή τροχιακής παγίδας Orbitrap. Η σύζευξη των δύο τεχνικών κρίθηκε απαραίτητη για να δώσει στη μέθοδο την απαραίτητη ακρίβεια και διακριτική ικανότητα, καθώς το εκχύλισμα του φυτικού υποστρώματος και το αιθέριο έλαιο περιέχουν πλήθος ουσιών που εκλούονται σε παρόμοιους χρόνους.

Μελετήθηκε η επίδραση υποστρώματος και βρέθηκε μεταξύ -45,2 και 31,7 για τη λεβάντα και -53,6 ως 26,5 για το αιθέριο έλαιο. Συμπερασματικά, πρέπει να λαμβάνεται υπ' όψιν η επίδραση του υποστρώματος στον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Συνεπώς, δημιουργήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης του υποστρώματος και υπολογίστηκαν η γραμμικότητα της μεθόδου και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης. Για την αποξηραμένη λεβάντα, η γραμμικότητα ήταν $r^2 \geq 0,9924$ για τα παρασιτοκτόνα που μελετήθηκαν, ενώ για το αιθέριο έλαιο $r^2 \geq 0,9908$.

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης βρέθηκαν για τη λεβάντα μεταξύ 2,6 - 4,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και 7,9 -16,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ αντίστοιχα. Για το αιθέριο έλαιο ομοίως μεταξύ 1,4-6,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και 4,3-19,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Ελέγχθηκε η ορθότητα της μεθόδου για την αποξηραμένη λεβάντα με τον υπολογισμό των μέσων ανακτήσεων, σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$, (n=6). Οι τιμές των μέσων ανακτήσεων ήταν από 51,2% ως 106,6%. Η ακρίβεια της μεθόδου, ελέγχθηκε ως προς την επαναληψιμότητα (RSD_r) και την αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) που βρέθηκαν $\leq 19,6$ και $\leq 18,4$ αντίστοιχα, σε κάθε περίπτωση.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε η μέθοδος για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των συγκεκριμένων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε δέκα δείγματα αποξηραμένης λεβάντας που προμηθευτήκαμε από το εμπόριο. Δεν ανιχνεύθηκε κανένα από τα προς μελέτη

παρασιτοκτόνα. Αυτό, έρχεται σε συμφωνία α) με το γεγονός ότι στην βιολογική καλλιέργεια της λεβάντας δεν χρησιμοποιείται κανένα παρασιτοκτόνο, στη δε συμβατική, μόνο ένα, το pendimethalin και β) με τα αποτελέσματα των M. Knodler et. al. [127] οι οποίοι βρήκαν υπολείμματα του pendimethalin στο 1,9 % των δειγμάτων αποξηραμένης λεβάντας που μελέτησαν , και των υπόλοιπων φυτοπροστατευτικών ουσιών, με την εξαίρεση των Chlorpyrifos (-ethyl) και Cypermethrin , σε λιγότερο από το 5% των δειγμάτων.

Ακολούθως, παρασκευάστηκαν με τη μέθοδο της υδραπόσταξης τρία δείγματα αιθέριου ελαίου από ισάριθμα δείγματα αποξηραμένης λεβάντας που εμβολιάστηκαν με παρασιτοκτόνα σε συγκεντρώσεις 10, 50 και 100 μg/Kg αντίστοιχα και μελετήθηκε η μεταφορά των παρασιτοκτόνων από τη λεβάντα στο αιθέριο έλαιο και στο υδρόλυμα.

Μόνο μία από τις φυτοπροστατευτικές ουσίες που μελετήθηκαν βρέθηκε να μεταφέρεται στο αιθέριο έλαιο, το Diazinon, και το ποσοστό μεταφοράς ήταν 20,4% στο αιθέριο έλαιο που προέκυψε από εμβολιασμό του φυτικού υλικού σε συγκέντρωση 10 μg/Kg, 21,6 % στο αιθέριο έλαιο που προέκυψε από εμβολιασμό του φυτικού υλικού σε συγκέντρωση 50 μg/Kg και 22,9% στο αιθέριο έλαιο που προέκυψε από εμβολιασμό του φυτικού υλικού σε συγκέντρωση 100 μg/Kg, ενώ καμία δεν μεταφέρθηκε στο υδρόλυμα.

Αναφορές

- [1] Δημόπουλος Π. Δ. (2018) «Η Χλωρίδα της Ελλάδας σε αριθμούς » Ελληνική Βοτανική Εταιρεία, Τεύχος 4, σελ. 1-5.
- [2] Δημητρέλλος Γ. Ν. (2020) «Τα αρωματικά & Φαρμακευτικά Φυτά και Περιβάλλον», Πανεπιστήμιο Πατρών
- [3] Wells Rebecca, Truong Felisha, Adal Ayelign M., Sarker Lukman S. and Mahmoud Soheil S. (2018) «Lavandula Essential Oils: A Current Review of Applications in Medicinal, Food, and Cosmetic Industries of Lavender» Natural Product Communications, Vol.13(10) p.1403-1417
- [4] Balchin Maria-Lis (2002) «lavander-The genus lavandula » London and N. York: Taylor & Francis.
- [5] Τσούμπα Ε. (2012) «Μελέτη των ποσοτικών και ποιοτικών χαρακτηριστικών του αρωματικού φυτού Λεβάντα, στην Ηπειρο», Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- [6] Δάρρα Αναστάσιος Ι. (2022) «Γενική Ανθοκομία» [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις
- [7] <https://www.kew.org/RoyalBotanicGardens> [Ηλεκτρονικό]. [Πρόσβαση 10 1 2023].
- [8] <https://www.wikiwand.com/el/> [Ηλεκτρονικό]. [Πρόσβαση 15 1 2023].
- [9] Chu Catherine J. and Kemper Kathi J. (2001) «Lavender», Longwood Herbal Task Force
- [10] Σκαλτσά Ελένη Δ. (2022) « Φυσικά προϊόντα στην Κοσμητολογία και Φαρμακολογία του δέρματος» , Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις
- [11] Κατσιμπίρη Φωτεινή Κ. (2010)«Εγκλεισμός συστατικών αιθερίου ελαίου λεβάντας σε β-κυκλοδεξτρίνη» Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
- [12] Χαμηλάκης Στυλιανός Ν. «Φυσικά Προϊόντα» (2022) Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
- [13] Ανδρέου Ασπασία , Μακρή Μαριάμ-Νεφέλη, «Άγριο τριαντάφυλλο, λεβάντα, πράσινο τσάι: χημική σύσταση, αντοξειδωτική και βιολογική δράση» (2021) Πτυχιακή εργασία Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.
- [14] Domingues Joana et al, «Essential Oils of Lavandula stoechas subsp. luisieri as Antifungal Agent against Fungi from Strawberry Tree Fruit» (2021) Journal of Pharmacy and Pharmacology, Vol. 9, p.98-106
- [15] Prusinowska Renata et al, «Hydrolates from lavender (Lavandula angustifolia) – their chemical composition as well as aromatic, antimicrobial and antioxidant properties» (2016) Natural Product Research, Vol 30 (4), p. 386-393.
- [16] Mihai Elena et al, «Composition, Antioxidant, and Antifungal Properties of Lavender Floral Waters» (2022) Chemistry proceedings, Vol.7(1).
- [17] <https://cymitquimica.com>.
- [18] <https://www.tcichemicals.com/TH/en/p/C0934>.
- [19] <https://www.sigmaaldrich.com>.

- [20] <http://9dmarketresearchreports.blogspot.com/2016/01/global-caffeic-acid-market-2015-2019.html>.
- [21] <https://www.researchgate.net>.
- [22] Jianu Călin et al, (2013) «Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils of Lavender (*Lavandula angustifolia*) and Lavandin (*Lavandula x intermedia*) Grown in Western Romania» *International Journal of Agriculture & Biology*, Vol 15, No. 4.
- [23] Despinasse Yolande et al, (2021) «Structure of the Chemical and Genetic Diversity of the True Lavender over Its Natural Range» *Plants*, Vol.10, No. 5.
- [24] Salehi Bahare, (2019) «Therapeutic Potential of α - and β -Pinene: A Miracle Gift of Nature » *Biomolecules* Vol. 9, No. 11
- [25] El Hachlafi Naoufal et al, (2021) «In Vitro and in Vivo Biological Investigations of Camphene and Its Mechanism Insights: A Review » *Food Reviews International*, 39(4), Pages 1799-1826.
- [26] Van Vuuren S. F, Viljoen A. M., (2007) «Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1,8-cineole alone and in combination» *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 22 No.6 p. 540–544.
- [27] Valente J. et al, (2013) « Antifungal, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Oenanthe crocata* L. essential oil » *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 62, p. 349-354.
- [28] Sato Kei, Krist Sabine, Buchbauer Gerhard, (2007) «Antimicrobial effect of vapours of geraniol, (R)-(-)-linalool, terpineol, γ -terpinene and 1,8-cineole on airborne microbes using an airwasher » *Flavour and Gragrance Journal*, Vol. 22, No. 5, p. 435-437
- [29] Liu Songyu et al, (2021) «Borneol in cardio-cerebrovascular diseases: Pharmacological actions, mechanisms, and therapeutics. Pharmacological actions, mechanisms, and therapeutics » *Pharmacological Research*, Vol. 169.
- [30] Ciołak Kornelia., (2014) «Lavandulol – biological activity and synthesis » *Biotechnology and Food Sciences*, Vol. 78, No. 2.
- [31] Li Aoxin et al, (2020) «A strategy of rapidly screening out herbicidal chemicals from Eucalyptus essential oils » *Pest Management Science*, Vol. 76, No. 3.
- [32] Omari Zineb et al, (2021) «Dietary administration of cumin-derived cuminaldehyde induce neuroprotective and learning and memory enhancement effects to aging mice » *Aging*, Vol. 13, No. 2.
- [33] Murata Soichiro, et al (2013) «Antitumor effect of 1, 8-cineole against colon cancer» *Oncology Reports*, Vol. 30, No. 6.
- [34] Bouyahya Abdelhakim, et al, (2021) «Health Benefits and Pharmacological Properties of Carvone» *Biomolecules*, Vol. 11, No. 12.
- [35] Elaissi Ameer, et al (2011) «Antibacterial activity and chemical composition of 20 Eucalyptus species» *Food Chemistry*, Vol. 129, p. 1427-1434.
- [36] Keskin I., et al (2017) «Effects of *Foeniculum vulgare* essential oil compounds, fenchone and limonene, on experimental wound healing» *Biotechnic & Histochemistry*, Vol. 92, No. 4, p. 274-282.

- [37] Kannissery Pramod, et al, (2010) «Eugenol: A Natural Compound with Versatile Pharmacological Actions» *Natural Product Communications*, Vol. 5, No. 12, p. 1999-2006.
- [38] Egan Denise, et al, (1990) «The Pharmacology, Metabolism, Analysis, and Applications of Coumarin and Coumarin-Related Compounds» *Drug Metabolism Reviews*, Vol. 22, No. 5.
- [39] Sharifi-Rad Mehdi, et al, (2018) «Carvacrol and human health: A comprehensive review» *Phytotherapy Research*, Vol. 32, No. 9.
- [40] Luo Chunxu, et al (2020) «A Review of the Anti-Inflammatory Effects of Rosmarinic Acid on Inflammatory Diseases» *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 11, No. 153.
- [41] Nagoor Meeran Mohamed Fizur, et al, (2017) «Pharmacological Properties and Molecular Mechanisms of Thymol: Prospects for Its Therapeutic Potential and Pharmaceutical Development» *Frontiers in Pharmacology*, Vol. 8, No. 380.
- [42] Fidyk Klaudyna, et al (2016) «β-caryophyllene and β-caryophyllene oxide, natural compounds of anticancer and analgesic properties» *Cancer Medicine*, Vol 5, No. 10.
- [43] Turek Claudia, Stintzing Florian C. (2013) «Stability of Essential Oils: A Review» *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, Vol. 12, No. 1.
- [44] Franz Chlodwig, Novak Johannes, (2020), «Sources of Essential Oils », *Handbook of Essential Oils 3rd Edition - Science, Technology, and Applications*, CRC Press
- [45] Λαμπούση Νικολέττα (2022) «Μέθοδοι εκχύλισης και βιολογικές ιδιότητες αιθέριων ελαίων και βιοδραστικών ουσιών από παραπροϊόντα αρωματικών φυτών», Πτυχιακή εργασία, Τμήμα επιστήμης και τεχνολογίας τροφίμων, Πανεπιστήμιο Δυτικής Αττικής.
- [46] Rehman Rafia, et al (2016) «Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: A review » *Food Reviews International*, Vol. 32, No. 2.
- [47] Zhang Jiong, et al (2023) «Advances in efficient extraction of essential oils from spices and its application in food industry: A critical review» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, Vol 63, No 33.
- [48] Sipper Khan, Amna Sahar, Tayyaba Tariq, Aysha Sameen, Farwa Tariq «Chapter 1 - Essential oils in plants: Plant physiology, the chemical composition of the oil, and natural variation of the oils (chemotaxonomy and environmental effects, etc.) », *Essential Oils, Extraction, Characterization and Applications*, Academic Press, 2023.
- [49] Τζαλάλη Σοφία, (2015) «Αιθέρια έλαια και αρωματικά φυτά στην κτηνοτροφία : η χρήση της ρίγανης στη ζωική παραγωγή», *Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων*
- [50] Sukhdev Swami Handa, Suman Preet Singh Khanuja, Gennaro Longo, Dev Dutt Rakesh (2008), « Extraction technologies for medicinal and aromatic plants», *United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology*
- [51] Beniaich Ghada, et al (2023) «Chemical Characterization, Antioxidant, Insecticidal and Anti-Cholinesterase Activity of Essential Oils Extracted from *Cinnamomum verum L*» *Separations*, Vol. 10, No. 6.
- [52] Pan Zhongli, Zhang Ruihong, Zicari Steven, (2019) «Chapter 10 - Leafy Vegetables», *Integrated Processing Technologies for Food and Agricultural By-Products*, Academic press

- [53] Burger Pauline, et al, (2019), «Extraction of Natural Fragrance Ingredients: History Overview and Future Trends», Chemistry and Biodiversity, Vol.16.
- [54] Božović Mijat, et al, (2018) «Essential oils extraction: a 24-hour steam distillation systematic methodology» Natural Product Research, Vol. 31, No. 20.
- [55] Κανατά Μαρία - Χριστίνα, (2017) «Ανάπτυξη νέων αφεψημάτων με βάση βότανα της Κρήτης και αξιολόγηση της αντιοξειδωτικής ικανότητάς τους», πτυχιακή εργασία, Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπιο Πανεπιστήμιο, Αθήνα.
- [56] <https://albrigiinherba.com/eenfleurage-ancient-technique-to-extract-essences-from-flower-petals/> (2014) «Enfleurage: Ancient Technique to Extract Essences from Flower Petals».
- [57] Rakthaworn P., et al, (2009) «Extraction Methods for Tuberose Oil and Their Chemical Components» Agriculture and Natural Resources, Vol. 43, No. 5.
- [58] Παπαϊκονόμου Λυγερή Κ. (2016) «Εκχύλιση Φαινολικών Συστατικών από Φλοιούς Ροδιού με τη Μέθοδο των Μικροκυμάτων», Πτυχιακή εργασία, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- [59] Abubakar Yusuf, Tijjani Habibu, Egbuna Chukwuebuka, Oluwaseun Charles Adetunji, Kala Smriti, Kryeziu Toskë L., Ifemeje Jonathan C., Patrick-Iwuanyanwu Kingsley C., (2020) «Chapter 3-Pesticides, History, and Classification», Natural Remedies for Pest, Disease and Weed Control, Academic Press
- [60] Tudi Muyesaier et al, (2021) «Agriculture Development, Pesticide Application and Its Impact on the Environment » International Journal of Environmental Research and Public Health, Vol. 18, No. 3.
- [61] Kang Jasit, et al (1995) «The Organophosphate Pesticides» Journal of Nutritional & Environmental Medicine, Vol. 5, p. 325-339.
- [62] Padilla Stephanie (2005) «Carbamate Pesticides» Encyclopedia of Toxicology 2nd Edition, Academic Press.
- [63] World Health Organization, 1986.
<https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc64.htm#SubSectionNumber:1.1.1>.
- [64] <https://www.alphapestcontrol.gr>
- [65] Jeschke Peter, Nauen Ralf (2008) «Review Neonicotinoids – from zero to hero in insecticide chemistry» Pest Management Science, Vol. 64 (11), p. 1084-1098
- [66] McAfee A., (2017) «A brief history of pesticides» American Bee Journal, Vol. 157(7), p.781-783.
- [67] Pereira N. C., Diniz T. O., Ruvolo-Takasusuki M. C. C. (2020) «Sublethal effects of neonicotinoids in bees: a review», Scientific Electronic Archives, Vol. 13, No. 7.
- [68] Abdollahdokht Danial, et al, (2022), «Conventional agrochemicals towards nano-biopesticides: an overview on recent advances» Chemical and Biological Technologies in Agriculture, Vol. 9, No. 13.
- [69] Chaud Marco, et al, (2021), «Nanopesticides in Agriculture: Benefits and Challenge in Agricultural Productivity, Toxicological Risks to Human Health and Environment» Toxics, Vol. 9, No. 6.

- [70] Nikolic Nikola, Höferl Martina, Buchbauer Gerhard (2018) «Pesticides in essential oils and selected fragrance extracts. Some examples. A review » *Flavour and Fragrance Journal*, Vol. 33, p.373–384.
- [71] George J. L., Frear D. E. H. (1966) «Pesticides in the Antarctic» *Journal of Applied Ecology*, Vol. 3, p. 155-167.
- [72] Πατακιούτας Γεώργιος, (2000) «Μελέτη της Διάσπασης, Κατανομής και Μεταφοράς των υπολειμάτων Νέων Φυτοφαρμάκων σε Υδατικά και Εδαφικά Συστήματα», Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- [73] «Οδηγός για τα Υπολείμματα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων στα Προϊόντα Φυτικής Προέλευσης,» Ελληνικός Σύνδεσμος Φυτοπροστασίας (ΕΛ.ΣΥ.Φ).
- [74] <https://eur-lex.europa.eu/EN/legal-content/summary/pesticide-residues-in-food-and-animal-feed.html>.C. «Pesticide residues in food and animal feed»
- [75] Srivastava Abhinav, et al, (2022) «Analysis of Common Culinary Spices to Observe Multiclass Pesticides Residue Levels» *Research Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 13, No. 3.
- [76] European Pharmacopoeia 10h Edition, 2019.
- [77] Falleh Hanen et al, (2020) «Essential oils: A promising eco-friendly food preservative» *Food Chemistry*, Vol. 330, No. 127268.
- [78] Fillatre Yoann, Gray Francois-Xavier, Roy Celine, (2017) «Pesticides in essential oils: Occurrence and concentration in organic and conventional orange essential oils from eleven geographical origins» *Analytica Chimica Acta*, Vol. 992, No. 55-66.
- [79] <https://1click.minagric.gr/oneClickUI/frmFytoPro.zul> «Κατάλογος Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων κατά Καλλιέργεια » Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων
- [80] https://www.minagric.gr/images/stories/docs/ktiniatrika_Themata/Themata_dimosias_Ygeias/entyo_epek2015_220316.pdf
«Εγχειρίδιο για την Εφαρμογή του Εθνικού Προγράμματος Ελέγχου Καταλοίπων (ΕΠΕΚ)» 2015. Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων
- [81] Nichols Lisa, College Butte ,« Overview of Extraction» <https://chem.libretexts.org>
- [82] Anastasssiades Michelangelo, Lehotay Steven J, Štajnbaher Darinka, Schenck Frank, (2003), «Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce», *Journal of AOAC international*, vol. 86, No 2 p. 412–431.
- [83] Κολόκα Ουρανία Λ., (2021) «Προσδιορισμός υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε οίνους με εκχύλιση QuEChERS και χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας» *Μεταπτυχιακή Διατριβή, ΔΠΜΣ αγροχημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.*
- [84] Ντουρτόγλου Βασίλειος, Χατζηλαζάρου Αρχοντούλα, Ντουρτόγλου Ευθαλία, (2014), «Σύγχρονες μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης», *ΤΕΙ Αθήνας - Τμήμα Οινολογίας και Τεχνολογίας Ποτών.*
- [85] <https://www.specartridge.com/the-concept-and-basic-principles-of-solid-phase-extraction>
Hawach Scientific

- [86] Semih Ötles, Canan Kartal, (2016), «Solid-Phase Extraction (SPE): Principles and Applications in Food Samples», *Acta Scientarum Polonorum Technologia Alimentaria*, Vol. 15, No. 1.
- [87] Shi Min-Zhen, et al, (2023), «Latest Development of Matrix Solid Phase Dispersion Extraction and Microextraction for Natural Products from 2015-2021 » *Separation & Purification Reviews*, Vol. 52, No. 3.
- [88] Χριστογώργος Χρήστος Ιωάννης, (2015) «Ανάπτυξη μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μελαμίνης και κυρομαζίνης μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά με προσροφητικά υλικά QuEChERS και εφαρμογές στον προσδιορισμό της κυρομαζίνης σε ζωοτροφές», *Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*.
- [89] Barker S., (2000) «Solid-Phase Matrix Dispersion: Extraction», *Encyclopedia of Separation Science*, Macclesfield, UK, Academic Press.
- [90] Stefano Dugheri, et al (2022), «Advanced Solid-Phase Microextraction Techniques and Related Automation: A Review of Commercially Available Technologies» *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, Vol.2022, No 8690569
- [91] Weggler Benedikt A., et al, (2020) «Inlets and sampling» *Separation Science and Technology*, Vol. 12 p. 141-203.
- [92] Xu Jianqiao, Ouyang Gangfeng (2019) «Extraction | Solid-Phase Microextraction» *Encyclopedia of Analytical Science (Third Edition)*, Elsevier Ltd
- [93] Rahman Matiur et al, (2021) «Monitoring of pesticide residues from fish feed, fish and vegetables in Bangladesh by GC-MS using the QuEChERS method» *Heliyon*, Vol. 7, No 06390
- [94] Kang Hye Soon, et al, (2020) «Determination of 66 pesticide residues in livestock products using QuEChERS and GC-MS/MS» *Food Science and Biotechnology*, Vol. 29, p. 1573–1586
- [95] Koesukwiwat Urairat, et al, (2010) «Extension of the QuEChERS Method for Pesticide Residues in Cereals to Flaxseeds, Peanuts, and Doughs » *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 58, No. 10.
- [96] Iosif Konstantina, Konstantinou Ioannis, (2023) «Determination of Pesticide Residues in Olive Oil Using QuEChERS Extraction and Liquid Chromatography–Orbitrap High-Resolution Mass Spectrometry: Comparison of Different Clean-Up Sorbents and Validation Study» *Sustainability*, Vol. 15, No. 11
- [97] Enia Mohamed Abdelnaby, et al (2022) «Optimisation and validation of a modified QuEChERS method for the determination of 222 pesticides in edible oils using GC-MS/MS: a case study on corn oil» *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*
- [98] Kosma Christina I, Koloka Ourania L., Albanis Triantafyllos A., Konstantinou Ioannis K. (2021) «Accurate mass screening of pesticide residues in wine by modified QuEChERS and LC-hybrid LTQ/Orbitrap-MS» *Food Chemistry*, Vol. 360, No 130008
- [99] Brondi SHG, et al, (2010) «Evaluation of the QuEChERS Method and Gas Chromatography–Mass Spectrometry for the Analysis Pesticide Residues in Water and Sediment» *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol. 86, p.18–22.
- [100] González-Jartín Jesús M., et al (2019) «A QuEChERS based extraction procedure coupled to UPLC-MS/MS detection for mycotoxins analysis in beer» *Food Chemistry*, Vol. 275, p.703-710

- [101] Kalogeropoulou Aggeliki G., Kosma Christina I., Albanis Triantafyllos A. (2021) «Simultaneous determination of pharmaceuticals and metabolites in fish tissue by QuEChERS extraction and UHPLC Q/Orbitrap MS analysis», *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, Vol. 413, p. 7129–7140.
- [102] Stubbings George, Bigwood Timothy (2009) «The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) procedure for the determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuEChERS (QUick, Easy, CHEap, Effective, Rugged and Safe) approach», *Analytica Chimica Acta*, Vol. 637, No 1-2.
- [103] De Oliveira Arias Jean Lucas, (2018) «Chitosan from shrimp shells: A renewable sorbent applied to the clean-up step of the QuEChERS method in order to determine multi-residues of veterinary drugs in different types of milk» *Food Chemistry*, Vol. 240. P. 1243-1253
- [104] Wang Lin, et al (2019) «Determination of lipophilic marine toxins in fresh and processed shellfish using modified QuEChERS and ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry» *Food Chemistry*, Vol. 272, p. 427-433
- [105] Sadowska-Rociek Anna, et al (2014) «Comparison of different modifications on QuEChERS sample preparation method for PAHs determination in black, green, red and white tea» *Environmental Science and Pollution Research*, τόμ. 21, p. 1326–1338
- [106] Valente Inês M., et al (2013) «New application of the QuEChERS methodology for the determination of volatile phenols in beverages by liquid chromatography » *Journal of Chromatography A*, Vol. 1271, No. 1.
- [107] <https://www.restek.com/row/video-library/what-is-quechers>
- [108] Łozowicka Bożena, Rutkowska Ewa, Jankowska Magdalena (2017) «Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD» *Environmental Science and Pollution Research*, Vol 24, p. 7124–7138.
- [109] Wingren C., U.-B. Hansson (2000) «Chromatography: Liquid | Partition Chromatography (Liquid–Liquid) », *Encyclopedia of Separation*, Academic press.
- [110] Κωστάκης Μ., (2021) «Υγροχρωματογραφία - HPLC» ΕΚΠΑ
https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM233/HPLC%20%20LCMS%20%CE%BC%CE%AD%CF%81%CE%BF%CF%82%201%CE%BF_master.pdf
- [111] Σαμανίδου Β., (2015) «Χρωματογραφικές Τεχνικές στη Βιοανάλυση» Βιοαναλυτική χημεία, Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
- [112] Κετσετζή Αναστασία, (2019), «Προσδιορισμός ενδογενών μεταβολιτών σε δείγματα σταφυλιού και γλεύκους ποικιλίας Μοσχάτου Αλεξανδρείας με την τεχνική UPLC (HILIC)-MS/MS», Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- [113] Θεοδωρίδης Γεώργιος, (2015) «Φασματομετρία Μάζας», Βιοαναλυτική χημεία, Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις.
- [114] https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/CHEM165/07-SAT_02_Mass_Spectrometry_pt1.pdf.
- [115] Καρβούνη-Καρατζά Αικατερίνη, (2022) «Προσδιορισμός φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας με εφαρμογή εκχύλισης QuEChERS και υγρής

χρωματογραφίας -φασματομετρίας μάζας», Μεταπτυχιακή Διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

[116] Patel Dharmendra (2011) « Matrix effect in a view of LC-MS/MS: an overview» International Journal of Pharma and Bio Sciences, Vol 2, No. 1

[117] Łozowicka Bożena, Rutkowska Ewa, Jankowska Magdalena (2017) «Influence of QuEChERS modifications on recovery and matrix effect during the multi-residue pesticide analysis in soil by GC/MS/MS and GC/ECD/NPD» Environmental Science and Pollution Research International, Vol. 24, No. 8

[118] Rutkowska Ewa, Łozowicka Bożena, Kaczynski Piotr, (2018) «Modification of Multiresidue QuEChERS Protocol to Minimize Matrix Effect and Improve Recoveries for Determination of Pesticide Residues in Dried Herbs Followed by GC-MS/MS», Food Analytical Methods, Vol 11, p. 709–724

[119] Abbas Mohamed S., et al, (2017) «Development and validation of a multiresidue method for the determination of 323 pesticide residues in dry herbs using QuEChERS method and LC-ESI-MS/MS» International Journal of Environmental Analytical Chemistry, Vol. 97, No. 11.

[120] Nannou Christina, Boti Vasiliki, Albanis Triantafyllos A., (2018) «Trace analysis of pesticide residues in sediments using liquid chromatography-high-resolution Orbitrap mass spectrometry» Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol 410 (7), p. 1977-1989.

[121] Fillatre Yoann, et al (2014) «Multiresidue determination of 256 pesticides in lavandin essential oil by LC/ESI/sSRM: advantages and drawbacks of a sampling method involving evaporation under nitrogen » Analytical and Bioanalytical Chemistry, Vol. 406, p. 1541–1550

[122] Klier B. et al, (2015), «Pesticide residues in essential oils: evaluation of a database» Pharmeuropa bio & scientific notes, Vol. 131, No. 49I.

[123] Fillatre Yoann, et al, (2011), «Multiresidue Analysis of Multiclass Pesticides in Lavandin Essential Oil by LC/MS/MS Using the Scheduled Selected Reaction Monitoring Mode» Analytical Chemistry, τόμ. 83, No. 1, p. 109–117.

[124] Elshabrawy Mahmoud S., et al, (2023) «Optimization and evaluation of four multi-residue methods for the determination of pesticide residues in orange oil using LC-MS/MS and GC-MS/MS: a comparative study» International Journal of Environmental Analytical Chemistry, Vol. 103, No. 16

[125] Agency for Toxic Substances and Disease Registry <https://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp88-c1.pdf>.

[126] <https://www.pubchem.com/>

[127] M. Knodler., et al (2021) «Evaluating a comprehensive database on pesticide residues in essential oils: An update» Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants, Vol. 20. No. 100283

[128] Ríos José-Luis (2016) «Chapter 1 - Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined» Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety, Academic Press.

[129] <https://gastroic.org/2020/06/08/blog5/>].

[130] Θανάσης Βαλαβανίδης, Κωνσταντίνος Ευσταθίου,(5ος 2014) «Η χημική ένωση του μήνα». http://195.134.76.37/chemicals/chem_carbondioxide.htm.

[131] European Commission <https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/start/screen/mrls/searchpr>

[132] <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003643en.pdf>.

[133] Bhavyasri K., Begum Samreen, Sumakanth Mogili, (2022) «2-Dimensional Gas Chromatography-Mass Spectroscopy: A Review», International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research, 76(1), No. 25, p.140-150

[134] Olsen J. V., et al, (2005) «Parts per Million Mass Accuracy on an Orbitrap Mass Spectrometer via Lock Mass Injection into a C-trap», Technology, Vol 4(12), p.2010-2021

[135] Grinfeld Dmitry, Monastyrskiy Mikhail, Makarov Alexander Microscopy and Microanalysis, (2015) «Control of Aberration and Space-charge Effects in the Orbitrap Mass Analyzer» Microscopy and Microanalysis, Vol.21, p.176-181

[136] <https://www.chemicalbook.com/>

[137] <https://www.chemspider.com/>