



**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ,
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

Πτυχιακή μελέτη

**«Προσδιορισμός Υπολειμμάτων Οργανοφωσφορικών
εντομοκτόνων σε οίνους»**

ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΜΙΣΙΧΡΟΝΗ ΓΕΩΡΓΙΑ,

ΑΡΙΘΜΟΣ ΜΗΤΡΩΟΥ: 2012054

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΠΟΛΟΣ ΙΩΑΝΝΗΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, 2017

Περίληψη

Η αλόγιστη χρήση των φυτοφαρμάκων στη γεωργία τα τελευταία 20 χρόνια με σκοπό την αύξηση της παραγωγής των φυτικών προϊόντων, έχει αυξήσει την ανησυχία των καταναλωτών, οι οποίοι επιθυμούν την κατανάλωση ποιοτικών προϊόντων και ασφαλών για την υγείας τους. Για αυτό το λόγο κρίνεται αναγκαίος ο αποτελεσματικός προσδιορισμός των υπολειμματικών επιπέδων των φυτοφαρμάκων στα γεωργικά προϊόντα ώστε να διασφαλίζεται η υγεία των καταναλωτών και να αποφεύγεται η εμπορία των μη ασφαλών προϊόντων.

Μεταξύ των συχνότερων εφαρμοζόμενων γεωργικών φαρμάκων είναι τα οργανοφωσφορικά που εφαρμόζονται στην αμπελοκαλλιέργεια, από την οποία παράγονται ποικίλα οινικά προϊόντα. Λαμβάνοντας υπόψη την υψηλή επικινδυνότητα για την ανθρωπινή υγεία των υπολειμμάτων των οργανοφωσφορικών στα οινικά προϊόντα η περούσα εργασία επικεντρώνεται στον προσδιορισμό των υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε οίνους».

Για την πραγματοποίηση του ανώτερου σκοπού η παρούσα εργασία δομείται από τέσσερα κεφάλαια. Ειδικότερα, το πρώτο κεφάλαιο αναφέρεται στα τα οινικά προϊόντα ως πηγή έκθεσης του ανθρώπου στα φυτοφάρμακα. Στο πρώτο μέρος παρουσιάζονται στοιχεία για τη συμβολή των οινικών προϊόντων στη μεσογειακή διατροφή και εν συνεχεία πληροφορίες για τα εφαρμοζόμενα φυτοπροστατευτικά στην αμπελοκαλλιέργεια. Σε αυτή την υποενότητα το επιστημονικό ενδιαφέρον επικεντρώνεται στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, στον τρόπο δράσης και τη δράση και τοξικότητα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

Το δεύτερο κεφάλαιο πραγματεύεται τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα παρουσιάζονται οι αρχές εργασίας για τον ποιοτικό έλεγχο των αναλύσεων υπολειμμάτων ΦΠΠ σύμφωνα με την Ορθή Εργαστηριακή Πρακτική (ΟΕΠ) ή (GLP), η τεχνική της δειγματοληψίας, ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων. Στη τελευταία υποενότητα αναλύονται οι εφαρμοζόμενες αναλυτικές μέθοδοι για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων παρουσιάζοντας στοιχεία σχετικά με τα κριτήρια επιλογή μιας μεθόδου, την εκχύλιση, τον καθαρισμό (cleanup) την ανάλυση των δειγμάτων για υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων και την επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας.

Στο τρίτο κεφάλαιο περιγράφονται οι μεθοδολογίες εκχύλισης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε οινικά προϊόντα και οι μεθοδολογίες

προσδιορισμού των ουσιών αυτών. Το τέταρτο κεφάλαιο επικεντρώνεται στα υπολειμματικά επίπεδα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε οινικά προϊόντα. Η εργασία κλείνει με τα συμπεράσματα όπως αυτά προέκυψαν κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.ΤΑ ΟΙΝΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΩΣ ΠΗΓΗ ΕΚΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	5
1.1 Τα οινικά προϊόντα και η συμμετοχή τους στη μεσογειακή διατροφή.....	5
1.1.1 Μεσογειακή διατροφή	5
1.2 Προϊόντα φυτοπροστασίας της αμπελοκαλλιέργειας	8
1.2.1 Εισαγωγή	8
1.2.2 Φυτοπροστασία αμπελοκαλλιέργειας	11
1.2.3 Κατηγορίες φυτοφαρμάκων	12
1.2.3.1 Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.....	14
1.2.4 Τρόπος δράσης και τοξικότητα των εντομοκτόνων	18
1.2.4.1 Εισαγωγή	18
1.2.4.2 Δράση και τοξικότητα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.....	19
1.2.5 Συντονισμένα προγράμματα της ευρωπαϊκής ένωσης για τον έλεγχο των φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα	21
1.2.5.1 Εισαγωγή	21
1.2.5.2 Τοξικολογικός Έλεγχος Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων και Προστασία Καταναλωτή.....	21
1.2.5.3 Αγροτικά Προϊόντα και Ανώτατα Επιτρεπτά Επίπεδα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων.....	23
2.ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ	28
2.1. Εγκατάσταση πειραμάτων και δειγματοληψία	28
2.2. Αρχές εργασίας για τον ποιοτικό έλεγχο των αναλύσεων υπολειμμάτων ΦΠΠ σύμφωνα με την Ορθή Εργαστηριακή Πρακτική (ΟΕΠ) ή (GLP).....	28
2.3. Δειγματοληψία.....	29
2.4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων	30
2.5. Αναλυτικές μέθοδοι για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων.....	32
2.5.1. Πολύ-υπολειμματικές μέθοδοι(multi residue methods)(MRMs)	32
2.5.2. Απλές μέθοδοι.....	33
2.6. Ποσοτικές μέθοδοι	34
2.6.1 Γενικά.....	34
2.6.2. Επιλογή μιας μεθόδου.....	34
2.7. Εκχύλιση	35
2.8. Καθαρισμός (cleanup)	36

2.8.1. Παραδοσιακές μέθοδοι	36
2.8.2 Εναλλακτικές τεχνικές καθαρισμού.....	37
2.9. Ανάλυση των δειγμάτων για υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων ..	38
2.10 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας.....	39
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΟΙΝΟΥΣ	43
3.1 Μεθοδολογίες εκχύλισης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε οινικά προϊόντα.....	43
3.1.1 Υγρή-υγρή εκχύλιση (LIQUID-LIQUIDEXTRACTION- LLE).....	43
3.1.2 Υγρή στερεή εκχύλιση (SOLID PHASE EXTRACTION-SPE).....	46
3.1.3Μικροεκχύλιση δια της στερεής φάσης (SOLID PHASE MICROEXTRACTION -SPME).....	49
3.1.4 Εκχύλιση στερεής φάσης με διασπορά, MSPD (MATRIX SOLID PHASE DISPERSION).....	51
3.1.5 Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (Single drop microextraction, SDME)	54
3.1.6 QuEChERS	54
3.2 Μεθοδολογίες προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων.....	60
3.2.1 Αέρια χρωματογραφία (gaschromatography).....	60
3.3.2 Αέρια χρωματογραφία φασματομετρία μάζας (gaschromatography/mass) ..	63
3.2.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC).....	66
4. ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΟΙΝΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	70
4.1 Εισαγωγή	70
4.2 Υπολείμματα οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε μεσογειακά οινικά προϊόντα.....	71
Συμπεράσματα	78
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	79

1.ΤΑ ΟΙΝΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΩΣ ΠΗΓΗ ΕΚΘΕΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ ΣΤΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

1.1 Τα οινικά προϊόντα και η συμμετοχή τους στη μεσογειακή διατροφή

1.1.1 Μεσογειακή διατροφή

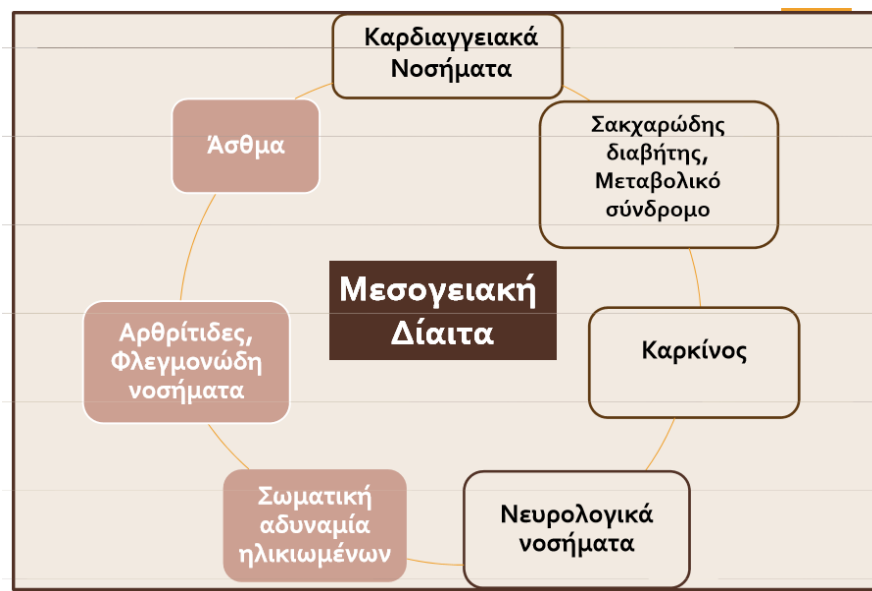
Τα ευεργετικά αποτελέσματα της πρόσληψης αντιοξειδωτικών μέσω της διατροφής και ειδικά μέσω της κατανάλωσης ποσότητας οίνου έγιναν ευρέως γνωστά όταν προβλήθηκε το πρότυπο της μεσογειακής διατροφής και οι ευεργετικές επιδράσεις που έχει στον ανθρώπινο οργανισμό. Επίσης, προς αυτή την ιατρική κατεύθυνση κινείται και η ύπαρξη του «γαλλικού παραδόξου» (Κοντογιάννη, 2011).

Πιο συγκεκριμένα η μεσογειακή διατροφή στηρίζεται κυρίως στις διατροφικές συνήθειες των κατοίκων της Κρήτης καθώς και αυτών της Νότιας Ιταλίας που αναπτύχθηκαν κατά τη δεκαετία του 1970. Πιο αναλυτικά οι κυριότερες διατροφικές συνήθειες που προσδιορίζουν τη μεσογειακή διατροφή είναι η συχνή κατανάλωση ελαιόλαδου, φρούτων, λαχανικών και δημητριακών, ο περιορισμός της κατανάλωσης κρέατος, η μέτρια κατανάλωση αυγών και γαλακτοκομικών και η είσοδος στο διαιτολόγιο των ψαριών (Εικόνα 1.1).



Εικόνα 1.1 Πυραμίδα της Μεσογειακής Διατροφής

Πολλοί ερευνητές συσχετίζουν την υιοθέτηση του συγκεκριμένου διατροφικού μοντέλου με την πρόληψη πληθώρας ασθενειών, όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις και ο καρκίνος (Brill, 2009) (Εικόνα 1.2).



Εικόνα 1.1 Επιπτώσεις της μεσογειακής διατροφής στην υγεία

Πιο συγκεκριμένα μελέτες έδειξαν ότι παρόλο που το σύστημα περίθαλψης σε πολλές από αυτές τις χώρες είναι κατώτερο από αυτό της Βόρειας Ευρώπης και της Βόρειας Αμερικής και το ποσοστό των καπνιστών είναι υψηλό, τα ποσοστά θνησιμότητας στην περιοχή της Μεσογείου είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχα των οικονομικά ανεπτυγμένων χωρών της Βόρειας Ευρώπης και Βόρειας Αμερικής, ειδικά στους άντρες. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και στην περίπτωση του γαλλικού παράδοξου ερμηνεύονται όμως με διαφορετικό τρόπο.

Η μακροζωία των ανθρώπων που εφαρμόζουν αυτό το μοντέλο διατροφής οφείλεται αφενός στην κατανάλωση φρούτων, λαχανικών, δημητριακών, ελαιόλαδου και ποσοτήτων οίνου και αφετέρου στην αποφυγή των κορεσμένων λιπών και του κρέατος, τα οποία αυξάνουν την LDL χοληστερόλη (κακή χοληστερόλη), ενώ μειώνουν την HDL (καλή χοληστερόλη). Ειδικά στη μεσογειακή διατροφή κυριαρχεί η κατανάλωση ποσότητας ερυθρού οίνου μεταξύ των γευμάτων.

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η κατανάλωση οίνου κατά τη διάρκεια των γευμάτων είναι μακρά παράδοση της διατροφής των μεσογειακών λαών.

Στη Γαλλία παρατηρήθηκε ότι οι θάνατοι από καρδιαγγειακές νόσους είναι λιγότεροι από τις ΗΠΑ (κατά 57%) και τη Βρετανία (κατά 79% της Γλασκόβης).

Αναλυτικότερα η περιοχή της Τουλούζης στη Νότια Γαλλία έχει πολύ μικρή συχνότητα εμφάνισης στεφανιαίας καρδιακής νόσου, παρά την υψηλή κατανάλωση λιπαρών τροφίμων και τα υψηλά ποσοστά καπνίσματος που παρατηρούνται. Επιπλέον, φαίνεται οι Γάλλοι να έχουν περισσότερες πιθανότητες για μια αίσια εξέλιξη μετά την εμφάνιση καρδιαγγειακού επεισοδίου σε σχέση με τους υπόλοιπους Ευρωπαίους (<http://www.oiv.int/>.)

Αυτό έχει κυρίως αποδοθεί στην κατανάλωση ποσότητας ερυθρών οίνων μαζί με τα γεύματα, κάτι το οποίο αποτελεί καθημερινή συνήθεια των Γάλλων. Οι ερυθροί οίνοι περιέχουν υψηλές ποσότητες φαινολικών παραγώγων, ουσίες που όπως θα μελετήσουμε στη συνέχεια παρουσιάζουν υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Sunetal., 2002).

Σύμφωνα με έρευνες έγινε προσπάθεια να εντοπιστεί και ο πιθανός ρόλος του αλκοόλ στο φαινόμενο αυτό. Η κατανάλωση μη αλκοολούχων ποτών δεν επέφερε καμία μεταβολή στα λιπίδια, στις λιποπρωτεΐνες, την ινσουλίνη και τη γλυκόζη στα οποία οφείλονται τα φαινόμενα καρδιοπάθειας. Αντίθετα, όσοι κατανάλωσαν οίνο σημείωσαν σημαντικές αλλαγές, με κύριες τη μείωση της - LDL και την αύξηση της HDL. Βέβαια αυτό δε σημαίνει απαραίτητα ότι το αλκοόλ είναι υπεύθυνο για κάποια προστατευτική δράση. Είναι πιθανό το αλκοόλ να δρα σε συνεργασία με τις πολυφαινόλες του ερυθρού οίνου, διευκολύνοντας για παράδειγμα την απορρόφησή τους από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Η κατανάλωση ερυθρού και λευκού οίνου στη Γαλλία (πληθυσμός περίπου 61 εκατομμύρια) ανέρχεται στην ποσότητα των 55,85 λίτρων ανά ενήλικο αποτελώντας την τρίτη παγκοσμίως χώρα μετά το Βατικανό και την Ανδόρα χώρες με σαφώς μικρότερο πληθυσμό. Επίσης η Γαλλία είναι η δεύτερη χώρα στην παραγωγή οίνου μετά την Ιταλία στην Ευρώπη (<http://www.oiv.int/>).

Από την περιγραφή του προτύπου της μεσογειακής διατροφής συμπεραίνεται ότι η υψηλή συγκέντρωση αντιοξειδωτικών, που περιλαμβάνουν οι συγκεκριμένες δίαιτες, λειτουργεί σαν ασπίδα ενάντια στις ελεύθερες ρίζες που υπάρχουν στον οργανισμό. Η ύπαρξη ελευθέρων ριζών προκαλεί σοβαρές βλάβες με κυριότερες την καρκινογένεση και την αθηροσκλήρωση.

Πρόσφατα υπήρξαν μελέτες που συσχέτισαν την αποτελεσματικότερη πρόληψη της νόσου Alzheimer με την υιοθέτηση της λεγόμενης Μεσογειακής διατροφής. Μάλιστα, σε μια αρκετά εκτεταμένη έρευνα που πραγματοποιήθηκε στη Νέα Υόρκη αποδείχτηκε σε παρακολούθηση αρκετών ετών ότι τα άτομα

ανεξαρτήτως οποιασδήποτε μεταβλητής) που ακολουθούσαν κάποια δίαιτα στα πρότυπα της Μεσογειακής Διατροφής είχαν 9 - 10 % χαμηλότερο κίνδυνο για εμφάνιση των ασθενειών σε σύγκριση με εκείνους που ακολουθούσαν οποιαδήποτε άλλη δίαιτα. Από τη μια μεριά, το αποτέλεσμα αυτό ήταν αναμενόμενο, τόσο γιατί επιδημιολογικές έρευνες στο παρελθόν κατέδειξαν τη χαμηλότερη εμφάνιση της νόσου Alzheimer στις Μεσογειακές χώρες και τη σχέση αυτού του φαινομένου με τη διατροφή τους, όσο και γιατί η Μεσογειακή διατροφή συνδυάζει πολλές από τις παραμέτρους, που επιμέρους είχαν κατά καιρούς εξεταστεί και έχουν αποδειχτεί χρήσιμοι στην πρόληψη κατά της νόσου Alzheimer (Scrameretal,2006). Πιο συγκεκριμένα μελέτες έδειξαν ότι η ημερήσια κατανάλωση 1 έως 3 ποτηριών οίνου σχετίζεται με χαμηλότερο κίνδυνο ανάπτυξης νόσου Alzheimer Αντίθετα, η κατανάλωση λικέρ, μπίρας και άλλων ποτών εκτός του οίνου δε βρέθηκε να δρα προστατευτικά προς την εμφάνιση της άνοιας γενικότερα(Letenneur,2006).

1.2 Προϊόντα φυτοπροστασίας της αμπελοκαλλιέργειας

1.2.1 Εισαγωγή

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες στη διαδικασία της γεωργικής παραγωγής είναι και η φυτοπροστασία η οποία, όπως δηλώνει και ο όρος, έχει σκοπό την προστασία της γεωργικής παραγωγής από εχθρούς, ζιζάνια και ασθένειες. Από τότε που ο άνθρωπος καλλιεργεί τα φυτά για την εξασφάλιση της τροφής του έπρεπε και να τα προστατεύει από τον ανταγωνισμό των χιλιάδων ειδών ζιζανίων, εντόμων, μυκητολογικών ασθενειών και νηματωδών. Στη συνεχή προσπάθειά του να ελέγχει το φυσικό του περιβάλλον με σκοπό τη βελτίωση των συνθηκών επιβίωσης, το ανθρώπινο είδος οδηγήθηκε στην ανακάλυψη πολλών φυσικών και συνθετικών ουσιών για την καταπολέμηση των εχθρών και ασθενειών των καλλιεργούμενων φυτών.

Η χρήση χημικών ουσιών για την καταπολέμηση των ζιζανίων χρονολογείται από την εποχή της κλασσικής αρχαιότητας στην Ελλάδα και στη Ρώμη. Ο Όμηρος ανέφερε την καπνογόνο δράση του καιόμενου θείου, ενώ οι Pliny και Elder υπέδειξαν την εντομοκτόνο δράση του αρσενικού και αναφέρθηκαν στη χρήση της σόδας και του ελαιολάδου για την επεξεργασία των σπόρων των οσπρίων.

Οι Κινέζοι εφάρμοζαν περιορισμένες ποσότητες αρσενικούχων ως εντομοκτόνων τον 16ο αιώνα, ενώ λίγο αργότερα χρησιμοποιήθηκε η νικοτίνη με τη μορφή αποσταγμάτων καπνού και πριν το 1800 ακόμη, οι Καυκάσιοι γνώριζαν τις εντομοκτόνες δράσεις του πύρεθρου.

Τον 17ο-18ο αιώνα αρχίζει η επιστημονική μελέτη του θέματος όπου η ανάγκη αντιμετώπισης των εντομολογικών κυρίως προσβολών αυξάνεται λόγω ανταλλαγής πληθυσμών εντόμων μεταξύ του παλαιού και νέου κόσμου. Τη δεκαετία του 1840 γίνεται συστηματική προσπάθεια αντιμετώπισης του ωιδίου με ψεκάσμο των καλλιεργειών με θειασβέστιο και αργότερα με επίπαση αυτών με θειάφι. Το 1877 γίνεται προσπάθεια ελέγχου του δορυφόρου της πατάτας με ψεκάσμο με μη υδατοδιαλυτά χημικά όπως το Londonpurple και το Parisgreen (Μίγμα Cu-As) καθώς και με μείγματα Ca, Pb και αρσενικούχων αλάτων (Μουρκίδης, 1974).

Από το τέλος του 1880 έως και τα τέλη του 19ου αιώνα, αρχίζει πλέον ο ουσιαστικός έλεγχος των εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών. Συγκεκριμένα το 1882 ανακαλύπτεται ο βορδιγάλειος πολτός ο οποίος χρησιμοποιείται ευρέως για την καταπολέμηση του περονόσπορου των αμπελώνων. Στο τέλος του 19ου αιώνα νέα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αναπτύχθηκαν όπως η νικοτίνη, το πύρεθρο, η κάσσια και τα ορυκτέλαια(Μαχαίρα, 2001).

Το τέλος του 19ου αιώνα και η αρχή του 20ου, χαρακτηρίζεται από την αυξημένη προσοχή των καλλιεργητών για την αποφυγή απωλειών της σοδειάς τους, λόγω ασθενειών και εντομολογικών προσβολών, ενώ παράλληλα αναπτύσσεται βιομηχανία παραγωγής φυτοπροστατευτικών προϊόντων και βελτιώνονται τα μέσα εφαρμογής τους. Το πρώτο οργανικό φυτοφάρμακο που εφαρμόστηκε στη γεωργία και άνοιξε το δρόμο σε μια ισχυρή γενιά εντομοκτόνων ήταν το DDT (χλωροδιφαινυλο-τριχλωροαιθάνιο). Ο συγκεκριμένος υδρογονάνθρακας παρασκευάστηκε το 1873 από το Γερμανό Zeidler. Η ιδιότητα του όμως ως εντομοκτόνο ανακαλύφθηκε το 1939 από τον Ελβετό Müller που πήρε και το βραβείο Νόμπελ (Matolcsy, 1988).

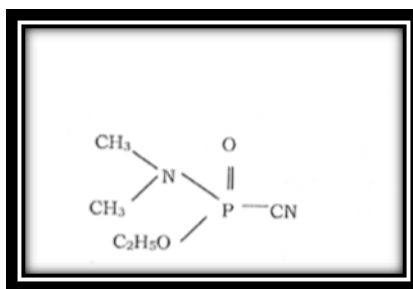
Μετά το DDT παρασκευάστηκαν και τέθηκαν σε κυκλοφορία πολλά άλλα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα όπως το Aldrin, Dieldrin, Chlordane, Endrin, Heptachlor, Methoxychlor και Toxaphene. Στη ραγδαία ανάπτυξη της βιομηχανίας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων συνέβαλε και η πολεμική βιομηχανία.

Έως το 1962 τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα θεωρήθηκαν πανάκεια για την αντιμετώπιση των εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών. Η συμβολή των

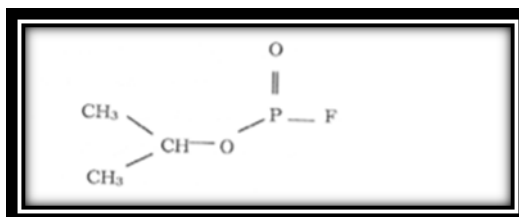
οργανοχλωριωμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αύξηση της γεωργικής παραγωγής ήταν ιδιαίτερα καθοριστική. Αποτέλεσμα της εκτεταμένης χρήσης αυτών ήταν η ανίχνευση υπολειμματικών συγκεντρώσεων τους σε επιφανειακά και υπόγεια νερά, στο έδαφος, σε στελέχη φυτών, σε ανώτερους θαλάσσιους οργανισμούς, σε πουλιά, σε ερπετά, σε θηλαστικά και τέλος στον ίδιο τον άνθρωπο (Karadanelli et al., 1998; Golfinoopoulos et al., 2003, Ribeiro et al., 2005).

Μετά τη διαπίστωση των αρνητικών πλευρών της αλόγιστης χρήσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε παγκόσμιο επίπεδο, πάρθηκαν μέτρα για τη μείωση των επιπτώσεων. Στις Η.Π.Α. το 1969 και στη χώρα μας το 1972, απαγορεύθηκε η χρήση της πλειοψηφίας των ενώσεων αυτών. Παράλληλα διεθνείς οργανισμοί όπως οι FAO, UNEP (United Nations Environmental Programme), USEPA (United States Environmental Protection Agency), WHO, δραστηριοποιούνται με σκοπό την ενημέρωση των υπηρεσιών, των καταναλωτών και των εργαζομένων για τις επικίνδυνες αυτές χημικές ενώσεις κατά τη χρήση τους. Οι επιστήμονες οδηγήθηκαν στη σύνθεση ενώσεων νέας γενιάς, όπως τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Πατέρας της οργανικής χημείας του φωσφόρου θεωρείται ο Lassaigne, ο οποίος το 1820 μελέτησε για πρώτη φορά τις αντιδράσεις της αλκοόλης με το φωσφορικό οξύ. Την ίδια χρονιά (1820) ο Thénard παρασκεύασε σειρά ενώσεων της φωσφίνης οι οποίες αποτέλεσαν και τις πρώτες οργανοφωσφορικές ενώσεις.

Το 1854 ο Clermont παρασκεύασε το τετρααιθυλο-πυροφωσφορικό παράγωγο (TEFP) με την επίδραση άλατος του αργύρου του πυροφωσφορικού οξέος σε αιθυλοχλωρίδιο, όμως η ισχυρή εντομοκτόνος δράση του προϊόντος έγινε γνωστή 80 χρόνια αργότερα. Η εντατική έρευνα για τη σύνθεση οργανοφωσφορικών ενώσεων διεξήχθη κατά τη διάρκεια του Δευτέρου Παγκοσμίου Πολέμου. Ο Saunders και οι συνεργάτες του μελέτησαν τις ενώσεις του αλκυλο-φθοροφωσφορικού οξέος, όπως για παράδειγμα το φθορο-διαμίδιο του τετραμεθυλοφωσφορικού οξέος, γνωστό με το όνομα Dimefox, ενώ στην Γερμανία ο Schrader (1936) συνέθεσε τα πολύ τοξικά για το νευρικό σύστημα Tabun και Sarin (Σχήμα 1.1).



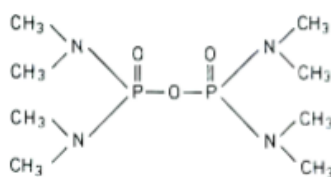
(α) Tabun



(β) Sarin

Σχήμα 1.1: Χημικές δομές των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (α) Tabun και (β) Sarin (Matolcsy et al., 1988).

Ο Schrader, το 1941, παρασκεύασε το Schradan (Σχήμα 1.2), το οποίο ήταν η πρώτη οργανοφωσφορική ένωση που αναγνωρίστηκε ως ισχυρό εντομοκτόνο παρότι το Dimefox είχε τις ίδιες ιδιότητες οι οποίες όμως δεν ήταν ακόμη γνωστές (Cremlyn, 1991).



Σχήμα 1.2: Χημική δομή του οργανοφωσφορικού εντομοκτόνου Schradan (Matolcsy et al., 1988).

1.2.2 Φυτοπροστασία αμπελοκαλλιέργειας

Μια από τις σημαντικότερες καλλιεργητικές πρακτικές στη συμβατική γεωργία είναι η φυτοπροστασία της καλλιέργειας η οποία βασίζεται στην εφαρμογή

εγκεκριμένων φυτοφαρμάκων από το Υπουργείο Γεωργίας (http://www.minagric.gr/syspest/syspest_crops.aspx). Σκοπός της πρακτικής αυτής όπως έχει ήδη αναφερθεί είναι αρχικά η προληπτική φυτοπροστασία του αμπελώνα και επιπροσθέτως η αποτελεσματική καταπολέμηση των εχθρών και η αντιμετώπιση των ασθενειών όταν εμφανιστούν χαρακτηριστικές προσβολές στα διάφορα φυτικά μέρη της αμπέλου.

Στην παρούσα πτυχιακή εργασία ιδιαίτερη μνεία γίνεται για τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των εντομολογικών εχθρών της αμπέλου, οι κυριότεροι εκ των οποίων είναι οι εξής:

- Ευδεμίδα
- Ψευδόκοκκος
- Τζιτζικάκι
- Θρίπας Καλιφόρνιας
- Μύγα μεσογείου
- Θρίπες αμπελιού
- Σφήκες

Αναλυτικά δεδομένα για τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται στη συμβατική γεωργία παρουσιάζονται στις ακόλουθες υποενότητες.

1.2.3Κατηγορίες φυτοφαρμάκων

Η γνώση της ταξινόμησης των γεωργικών φαρμάκων είναι ιδιαίτερης σημασίας, καθώς ανάλογα με την κατηγορία μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τον τρόπο δράσης, αλλά και για τις διάφορες φυσικοχημικές ιδιότητες ενός γεωργικού φαρμάκου (Γιαννοπολίτης, 2006). Παράλληλα συμβάλλει στο σωστό σχεδιασμό και εφαρμογή του προγράμματος ψεκασμών, στην αποφυγή ζημιάς στη φυτική παραγωγή λόγω ανεπιτυχούς αντιμετώπισης του προβλήματος ή από φυτοτοξικότητα λόγω λανθασμένης επιλογής γεωργικού φαρμάκου, όπως επίσης και στην σωστή ενημέρωση σχετικά με τις νέες μεθόδους φυτοπροστασίας. Γενικά τα φυτοφάρμακα μπορούν να ταξινομηθούν με διάφορους τρόπους, όπως:

- Με βάση τον Οργανισμό στόχο: Ανάλογα με τον οργανισμό στόχο οι κυριότερες κατηγορίες στις οποίες ταξινομούνται τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα

είναι οι εξής: α) Εντομοκτόνα (Insecticides), β) Ζιζανιοκτόνα (Herbicides), γ) Μυκητοκτόνα (Fungicides), δ) Ακαρεοκτόνα (Acaricides), ε) Νηματωδοκτόνα (Nematicides) και στ) Τρωκτικοκτόνα (Rodenticides). Οι κυριότερες κατηγορίες που περιλαμβάνονται στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι τα εντομοκτόνα, τα μυκητοκτόνα και τα ζιζανιοκτόνα. Τα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο εντόμων όπως αφίδες ή λεπιδόπτερα. Τα μυκητοκτόνα χρησιμοποιούνται εναντίον μυκήτων όπως ωιδίου και περονόσποροι οι οποίοι γενικά επηρεάζουν την ανάπτυξη των φυτών, καθώς και την ποσότητα και την ποιότητα της παραγωγής. Με τα ζιζανιοκτόνα ελέγχονται ζιζάνια, όπως είναι ο βέλιουρας, ο τάτουλας και η αγριάδα, τα οποία ανταγωνίζονται τα καλλιεργούμενα φυτά σε φως, νερό και τροφή (ΕΣΥΦ, 2006).

- Τρόπος εφαρμογής: Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ανάλογα με το εάν εφαρμόζονται πριν ή μετά τη σπορά και την καλλιέργεια, διακρίνονται γενικά σε προφυτευτικά, προφυτρωτικά και μεταφυτρωτικά, αντίστοιχα.

- Τρόπος δράσης: Ανάλογα με τη συμπεριφορά τους προς τα φυτά στα οποία εφαρμόζονται, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα διακρίνονται σε:

- ⇒ Επιφανειακής ή προστατευτικής δράσης, τα οποία παραμένουν τελείως στην επιφάνεια των ψεκαζόμενων οργάνων και δρουν με επαφή όταν τα ευαίσθητα όργανα των ζιζανίων έρθουν σε επαφή με αυτά.

- ⇒ Διεσδυτικής (τοπικής) δράσης, για τα οποία μία μικρή ή μεγάλη ποσότητα διαπερνά τα επιδερμικά φυτικά κύτταρα, και τα οποία δεν έχουν ικανότητα κυκλοφορίας στο εσωτερικό του φυτού, εκτός από το σημείο διείσδυσής τους. Ορισμένα από αυτά δύνανται να επεκτείνουν τη δράση τους και σε άλλα σημεία του ίδιου πάντα οργάνου (συνήθως στο φύλλωμα).

- ⇒ Διασυστημικής δράσης, τα οποία έχουν ικανότητα διείσδυσης στο εσωτερικό του φυτού μέσα από φυσικά ανοίγματα (στομάτια, φακίδια κ.α.) ή από την επιδερμίδα των φυτών και με τον τρόπο αυτό μεταφέρονται με τους χυμούς σε διαφορετικά όργανα του φυτού. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αυτής της κατηγορίας είναι γενικά ενώσεις με μακράνυπολειμματική δραστηριότητα, ώστε να μπορούν να δράσουν και σε όργανα στα οποία δεν ψεκάστηκαν.

- Εκλεκτικότητα: Εκλεκτικά, δηλαδή φυτοπροστατευτικά προϊόντα που επιτυγχάνουν δραστηριότητα παρεμπόδιση ή αναστολή της ανάπτυξης ή αναπαραγωγής ενός ή οπωσδήποτε λίγων και μάλιστα συγγενών παρασίτων, χωρίς να παρατηρούνται

δυσμενείς επιδράσεις στο φυτό ή σε άλλους οργανισμούς. Μη εκλεκτικά, δηλαδή φυτοπροστατευτικά προϊόντα τα οποία είναι δραστικά απέναντι σε ένα μεγάλο αριθμό παρασίτων, πολλά από τα οποία είναι δυνατό να έχουν και κάποιες ανεπιθύμητες επιδράσεις πάνω στο φυτό ή και έναντι σε άλλους φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς.

- Χημική ομάδα: Το πλήθος των φυτοπροστατευτικών προϊόντων μπορεί να καταταχθεί σε διάφορες χημικές ομάδες, ανάλογα με τη χημική ομάδα της δραστικής ουσίας που αυτά περιέχουν. Οι βασικές κατηγορίες είναι οι εξής: α) χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, β) οργανοφωσφορικοί εστέρες, γ) καρβαμιδικές και θειοκαρβαμιδικές ενώσεις, δ) τριαζίνες, ε) ουρίες, στ) ανιλίδια, ζ) πυρεθρίνες και η) διάφορες ανόργανες ενώσεις.(Παπαδοπούλου-Μουρκίδου , 1991).

Στον Πίνακα 1 του παραρτήματος (1.1) παρατίθενται οι κυριότερες κατηγορίες των φυτοπροστατευτικών προϊόντων καθώς και ο τρόπος δράσης τους, ο οποίος όπως φαίνεται διαφέρει από κατηγορία σε κατηγορία.

1.2.3.1 Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα

Οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα ονομάζονται οι τοξικές οργανοφωσφορούχες ενώσεις, η πλειονότητα των οποίων είναι εστέρες του φωσφορικού, θειοφωσφορικού και φωσφονικού οξέος ή ανυδρικά αλογονούχα και αμιδικά παράγωγα των παραπάνω οξέων (Μουρκίδης, 1974 και 1978).

Κάθε χρόνο στις ΗΠΑ χρησιμοποιούνται γύρω στα 500 g δραστικές οργανοφωσφορικές ουσίες εντομοκτόνων ανά στρέμμα καλλιεργήσιμης γης. Η μεγάλη χρήση των οργανοφωσφορικών εξηγείται ως εξής:

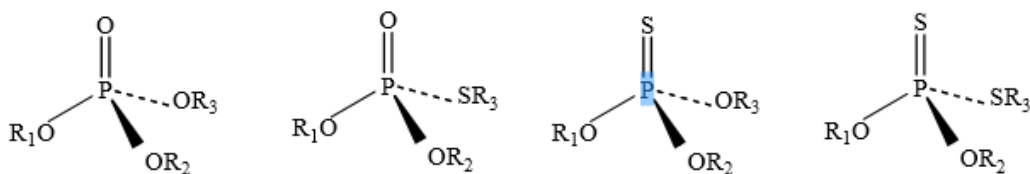
- Είναι σχετικά φθηνά
- Έχουν μεγάλο φάσμα δράσης (τα περισσότερα από τα οργανοφωσφορικά χρησιμοποιούνται σε σημαντικές καλλιέργειες για τον έλεγχο ποικιλίας εντόμων).
- Επειδή τα φυτοφάρμακα αυτά έχουν μεγάλο φάσμα δράσης ένα οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο μπορεί να ελέγξει τα έντομα που ίσως θα χρειαζόταν 3 ή 4 μη οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα.
- Γενικά τα έντομα δεν αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στα οργανοφωσφορικά όσο αναπτύσσουν με μερικά άλλα φυτοφάρμακα.

Τα οργανοφωσφορικά ήταν αναπτυγμένα από τις αρχές του 19ου αιώνα αλλά η δράση τους στα έντομα στα οποία η δράση τους μοιάζει με την δράση στους

ανθρώπους φάνηκε το 1932. Μερικά είναι πολύ τοξικά και χρησιμοποιήθηκαν στο 2^ο Παγκόσμιο Πόλεμο.

- Δεν παραμένουν σταθερά στο περιβάλλον.

Η γενική μορφή των οργανοφωσφορικώνφυτοπροστατευτικών προϊόντων δίνεται στο Σχήμα (1.1), όπου οι ομάδες R_1 και R_2 είναι αλκυλο-ομάδες και συνήθως $-CH_3$ ή $-C_2H_5$, ενώ η ομάδα R_3 είναι ισχυρά ηλεκτρονιόφιλη ομάδα στην οποία οφείλεται η βιολογική δράση των μορίων ως εντομοκτόνα (Schmidt, 1983).



Σχήμα 1.1: Γενικές δομές οργανοφωσφορικών εστέρων (Schwarzenbach et al., 2003; Pehkonen and Zhang, 2002).

Από τις παραπάνω δομές διακρίνεται ότι τα οργανοφωσφορικά προϊόντα περιέχουν ένα κεντρικό πεντασθενές άτομο φωσφόρου στο οποίο συνδέονται (WHO, 1986, Κουϊμτζής και συν., 1998):

1. ένα άτομο οξυγόνου ή θείου ενωμένο με διπλό δεσμό με το άτομο του φωσφόρου,
2. δύο μεθοξυ-, ή αιθοξυ-ομάδες ($-OCH_3$ ή $-OCH_2CH_3$) ($-OR_1$ και $-OR_2$) απλώς ενωμένες με το άτομο του φωσφόρου,
3. μία μακρύτερη, πιο πολύπλοκη ομάδα (R_3) απλώς ενωμένη με το άτομο του φωσφόρου διαμέσου ενός ατόμου οξυγόνου ή θείου.

Τα οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα, με βάση τη δομή τους και τους συνδυασμούς των ατόμων οξυγόνου, άνθρακα, θείου και αζώτου που ενώνονται με το κεντρικό άτομο φωσφόρου, διακρίνονται στις εξής παρακάτω ομάδες/κατηγορίες:

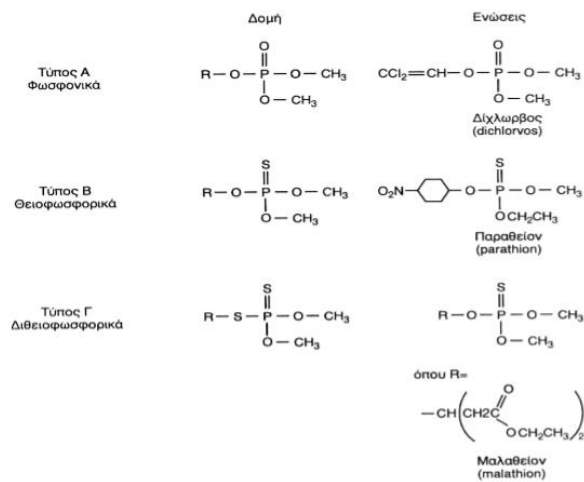
- α) Φωσφορικά (Phosphates),
- β) Θειονοφωσφορικά (Phosphorothionates),
- γ) Θειολοφωσφορικά (Phosphorothiolates),
- δ) Διθειονοφωσφορικά (Phosphorodithionates),
- ε) Φωσφονικά (Phosphonates),

- στ) Αμιδοφωσφορικά (Phosphoramidates),
- ζ) Διαμιδοφωσφορικά (Phosphorodiamidates),
- η) Πυροφωσφορικά (Pyrophosphates) και
- θ) Αμιδοπυροφωσφορικά (Pyrophosphoramides).

Από τις παραπάνω κατηγορίες τρεις είναι οι βασικότερες, οι οποίες αποδίδονται στο Σχήμα (1.2) και είναι οι εξής παρακάτω (WHO, 1986, Κουϊμτζής και συν., 1998):

- ✂ Φωσφορικά παράγωγα, τα οποία δεν περιέχουν άτομα θείου, π.χ. Dichlorvos,
- ✂ Θειοφωσφορικά παράγωγα, τα οποία περιέχουν ένα άτομο θείου, π.χ. Parathion,
- ✂ Διθειοφωσφορικά παράγωγα, τα οποία περιέχουν δύο άτομα θείου, π.χ. Malathion

Το μεγαλύτερο ποσοστό των εντομοκτόνων που περιέχουν φώσφορο δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι ανήκει στην κατηγορία των οργανοφωσφορικών ενώσεων με την απόλυτη έννοια του όρου. Οι ενώσεις αυτές είναι συνήθως εστέρες, αμίδια, ανυδρίτες και φθοροπαράγωγα του φωσφορικού, φωσφοροθειονικού και φωσφοροδιθειονικού οξέος.



Σχήμα 1.2: Τύποι οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων (Κουϊμτζής και συν., 1998).

Συγκεντρωτικά τα βασικά χαρακτηριστικά των εγκεκριμένων στην Ελλάδα οργανοφωσφορικών δραστικών ουσιών με εντομοκτόνο δράση παρουσιάζονται στον πίνακα 1.1

Πίνακας 1.1 Συγκεντρωτικά χαρακτηριστικά εγκεκριμένων στην Ελλάδα οργανοφωσφορικών δραστικών ουσιών με εντομοκτόνο δράση.

a/a	Δραστική ουσία	Αριθμός εμπορικών σκευασμάτων	Μορφή σκευασμάτων	Σήμανση τοξικότητας για τον άνθρωπο
1	acephate	14	SL	Xn,
2	azinphos methyl	20	EC, SC, WP	T, PTY
3	cadusafos	3	EW, GR, CS	Xn, TY
4	chlormephos	1	GR	T, TY
5	chlorpyrifos EC	30	EC	T Xi, PTY
6	chlorpyrifos GR	11	GR	Xn, PTY
7	chlorpyrifos WG	1	WG	Xn, PTY
8	chlorpyrifos WP	4	WP	Xi, PTY
9	chlorpyrifos methyl	1	EC	Xi, PTY
10	demeton S methyl	2	EC	T, TY
11	diazinon	20	GR, FU, WP, EC	Xn, TY
12	dichlorvos	4	EC, SL	T, TY
13	dichlorvos 7	2	EC, L	Xn, -
14	dimethoate	23	EC	Xn- Xi, BY
15	disulfoton	2	GR	T, PTY
16	ethion	4	EC	T, BY
17	ethoprop EC	1	EC	T+, TY
18	ethoprop GR	1	GR	Xn, BY
19	fenamiphos CS	1	CS	Xn, PTY
20	fenamiphos EC	1	EC	T+, PTY
21	fenamiphos GR	1	GR	T, TY
22	fenitrothion	2	EC	Xn, TY
23	fenitrothion CS	1	CS	_, TY
24	fenthion	1	EC	Xn, -
25	formothion	1	EC	Xn, -
26	heptenophos	1	EC	T, TY
27	malathion	16	EW, EC, WP	Xn- Xi, PTY
28	malthion 1 DP	4	DP	_, TY
29	malthion DP	17	DP	_, TY
30	mecarbam	1	EC	T, BY
31	methamidophos	19	SL	T+, BY
32	methidathion	4	EC, WP	T, TY
33	monocrotophos	19	SL	T+, TY
34	omethoate	1	EC	T+, TY
35	parathion methyl	25	EC	T+, TY
36	parathion methyl CS	2	CS	_, PTY
37	parathion methyl GR	1	GR	T, TY
38	phorate	19	GR	T, TY
39	phosalone	5	WP, EC	Xn- Xi, TY
40	phosmet	9	EC, DP, SC, WP	Xn- Xi, PTY
41	phosphamidon	1	SCW	T, TY

42	DP pirimiphos methyl	1	DP	Xi,TY
43	EC pirimiphos methyl	2	EC	Xi,TY
44	FU	1	FU	Xi,TY
45	profenophos	1	EC	Xn-Xi, PTY
46	quinalphos	4	EC	T,PTY
47	terbufos	5	GR	T+,PTY
48	thiometon	1	EC	Xn,-
49	triazophos	1	EC	T,TY

- : χωρίς σήμανση, Xi : Ερεθιστικό, Xn: Επικίνδυνο, T: Τοξικό, T⁺: Δηλητήριο

- : χωρίς σήμανση, Xi : Ερεθιστικό, Xn: Επικίνδυνο, T: Τοξικό, T⁺: Δηλητήριο

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των οργανοφωσφορικών ως γεωργικά φάρμακα και ως εκ τούτων των ανωτέρων φυτοπροστατευτικών ουσιών είναι τα εξής:

- ✗ Ευρύ φάσμα δράσης και ισχυρή δράση κατά των εχθρών των φυτών
- ✗ Είναι σχετικά ασταθή στο περιβάλλον και διασπώνται σχηματίζοντας μη τοξικές ουσίες για τον άνθρωπο και τα ζώα
- ✗ Χαμηλή δοσολογία ουσιών ανά μονάδα περιοχής εφαρμογής
- ✗ Διασυστηματική δράση μεγάλου αριθμού ενώσεων
- ✗ Σχετικά γρήγορος μεταβολισμός στους σπονδυλωτούς οργανισμούς και απουσία συσσώρευσης στο σώμα καθώς και χαμηλή χρόνια τοξικότητα
- ✗ Ταχεία δράση εναντίον των εχθρών των καλλιεργειών.

Ένα από τα βασικά μειονεκτήματα των ενώσεων της κατηγορίας αυτής είναι η σχετικά υψηλή οξεία τοξικότητα στα σπονδυλωτά, γεγονός που συνεπάγεται την απαίτηση για κατάλληλα μέτρα προστασίας κατά την εφαρμογή τους.

1.2.4 Τρόπος δράσης και τοξικότητα των εντομοκτόνων

1.2.4.1 Εισαγωγή

Αποτέλεσμα της εφαρμογής της φυτοπροστασίας στη σύγχρονη γεωργική πρακτικής είναι μικροποσότητες (υπολείμματα) αυτών των ουσιών ή των τοξικών μορίων αποικοδόμησής τους να παραμείνουν στο προϊόν μετά τη συγκομιδή. Άλλα παρασιτοκτόνα χρησιμοποιούνται μετασυσλλεκτικά για παράταση του χρόνου διατήρησης των καρπών (καρποί σε ψυγεία, σιτηρά σε αποθήκες). Ως εκ τούτου φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι δυνατό να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στον άνθρωπο και στα παραγωγικά ζώα εφόσον δεν έχουν επαρκώς ελεγχθεί και δε

χρησιμοποιούνται σύμφωνα με τους όρους έγκρισής τους. Οι κίνδυνοι για τον άνθρωπο μπορεί να προέλθουν από:

α) σύντομη έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις πράγμα που μπορεί να οδηγήσει ακόμη και στο θάνατο,

β) συχνή έκθεση σε μικρές ποσότητες, εφόσον δεν λαμβάνονται τα απαραίτητα μέτρα προστασίας, και

γ) κατανάλωση νερού και τροφίμων με αυξημένες υπολειμματικές συγκεντρώσεις, κάτι που γίνεται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του (Παναγιωτάρου-Πέτσικου και συν., 2001).

Οι επιπτώσεις από την κατανάλωση γεωργικών προϊόντων που περιέχουν υπολείμματα φυτοφαρμάκων είναι συνάρτηση των τοξικολογικών ιδιοτήτων κάθε φυτοφαρμάκου και της συγκέντρωσής του στα τρόφιμα (Μπούμπας και Βουγιουκλάκης 2002). Η τοξική δράση των γεωργικών φαρμάκων διακρίνεται σε (USA –Environmental Protection Agency -EPA, 1999):

α) Οξεία. Ενδιαφέρει σε περιπτώσεις εφ' άπαξ λήψης τοξικού, όπως ατυχημάτων, αυτοκτονίας κ.λ.π.. Ουσίες που διακρίνονται από μεγάλη οξεία τοξικότητα, όταν υπάρχουν σε κάποιο εδάδιμο προϊόν σε υψηλή συγκέντρωση, μπορεί να προκαλέσουν έντονα και άμεσα ορατά συμπτώματα τοξικότητας στον καταναλωτή ή και αυτόν τον θάνατο.

β) Υποξεία ή ημιχρόνια ή υποχρόνια τοξικότητα. Αφορά κυρίως στους επαγγελματίες εκτεθειμένους στα γεωργικά φάρμακα (ψεκαστές, εργάτες βιομηχανιών παραγωγής και συσκευασίας γεωργικών φαρμάκων).

γ) Χρόνια τοξικότητα. Είναι οι κίνδυνοι από την παρατεταμένη (μέχρι και εφ' όρου ζωής) λήψη μικρών ποσοτήτων τοξικών με τη διατροφή. Αφορά στο σύνολο του πληθυσμού και σχετίζεται ιδιαίτερα με την καρκινογένεση (ογκογένεση).

1.2.4.2 Δράση και τοξικότητα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων

Ο κύριος στόχος των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων είναι το νευρικό σύστημα και ειδικότερα το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, που ελέγχει τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη στο κεντρικό νευρικό σύστημα, το παρασυμπαθητικό, τις νευρομυϊκές συνάψεις, τις συμπαθητικές συνάψεις, καθώς και τα συμπαθητικά νεύρα των επινεφριδίων και των ιδρωτοποιών αδένων (Ecobichon, 1991). Το ένζυμο φωσφορυλιώνεται σε μια σερίνη του ενεργού κέντρου, όπου

προσδένεται το φωσφορικό τμήμα του εντομοκτόνου και η φωσφορυλίωση αυτή είναι μη αντιστρεπτή (Stryer, 1988).

Τα κλινικά συμπτώματα που εμφανίζονται σε περιπτώσεις οξείας δηλητηρίασης από τα οργανοφωσφορικά μοιάζουν πολύ με αυτά που προξενούν τα καρβαμιδικά. Ανάλογα με τη βαρύτητα της δηλητηρίασης εμφανίζεται αδυναμία, πονοκέφαλος, βάρος στο στήθος, διαταραχές στην όραση, μύση, σιελόρροια, εφίδρωση, ναυτία, εμετός, διάρροια, κοιλιακές κράμπες, παράλυση και θάνατος (Lotti 2001).

Η δηλητηρίαση από οργανοφωσφορικά θεραπεύεται με ταυτόχρονη χορήγηση ατροπίνης και κάποιας οξίμης, όπως πραλιδοξίμη (Ellenhornetal, 1988). Αντίθετα, δεν ενδείκνυται η χορήγηση οξιμών στη δηλητηρίαση από καρβαμιδικά (Taylor 1990). Έχουν γίνει έρευνες προκειμένου να βρεθεί τρόπος γρήγορος, αξιόπιστος και κοινά αποδεκτός για την ταυτοποίηση της ουσίας που προκαλεί τη δηλητηρίαση. Γνωρίζοντας τους μοριακούς μηχανισμούς της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης είναι δυνατό να εκμεταλλεύονται οι διαφορές τους προκειμένου να εξάγονται ασφαλή συμπεράσματα. Σε μια μελέτη με το παραπάνω αντικείμενο, προτείνονται δυο τρόποι προκειμένου να αποφασιστεί αν η ουσία που προξένησε μια δηλητηρίαση ανήκει στα καρβαμιδικά ή τα οργανοφωσφορικά. Ο ένας τρόπος είναι η επώαση του ενζύμου στους 37°C και η παρακολούθηση της κινητικής του. Αν το ένζυμο επαναδραστηριοποιηθεί μετά από περίπου 1 h η δηλητηρίαση προέρχεται από καρβαμιδικά, αν όχι, από οργανοφωσφορικά. Αν η επώαση με κάποια οξίμη δώσει βελτίωση στην κινητική του ενζύμου, τότε υπάρχει ισχυρή ένδειξη ότι η δηλητηρίαση προέρχεται από οργανοφωσφορικά (Rotenberg et al 1995). Γενικά, τα συμπτώματα που προέρχονται από την οξεία έκθεση σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν μελετηθεί επαρκώς. Σκοτεινά σημεία όμως παραμένουν στο τι συμβαίνει σε περιπτώσεις χρόνιας και σε χαμηλά επίπεδα έκθεσης στις παραπάνω ενώσεις (Nasreddine, Parent-Massin, 2002). Πολλές μελέτες έχουν γίνει σε ζώα, αλλά και σε ανθρώπους με χρόνια επαγγελματική έκθεση (Hatjianetal 2000, Richards 2001). Κατά γενική ομολογία η μέτρηση της αναστολής της ακετυλοχολινεστεράσης, αν και είναι ένας πολύ χρήσιμος δείκτης σε περιπτώσεις αξιολόγησης οξείας δηλητηρίασης, δεν είναι αρκετά ευαίσθητος. Χρόνια έκθεση σε χαμηλά επίπεδα οργανοφωσφορικών είναι αφορμή για εμφάνιση μιας σειράς νευρολογικών (Jamal, 1997), ψυχολογικών και άλλων συμπτωμάτων, χωρίς απαραίτητα την προειδοποίηση μιας οξείας δηλητηρίασης (Stephensetal 1995, Costa, 2006). Είναι δυνατό αρκετές

εβδομάδες μετά από έκθεση σε οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα να εμφανιστεί καθυστερημένη πολυνευροπάθεια(delayed onset polyneuropathy) (Ray, 1998).

1.2.5 Συντονισμένα προγράμματα της ευρωπαϊκής ένωσης για τον έλεγχο των φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα

1.2.5.1 Εισαγωγή

Είναι κοινά αποδεκτό ότι η αγροτική παραγωγή χωρίς τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων δεν μπορεί να καλύψει τις συνεχώς αυξανόμενες διατροφικές ανάγκες του πληθυσμού της γης. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα όμως ανάλογα με τις εγγενείς ιδιότητες τους, τον τρόπο και τη συχνότητα που εφαρμόζονται είναι δυνατό να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στα φυτά, στον άνθρωπο, στα παραγωγικά ή άγρια ζώα και στο περιβάλλον γενικότερα. Για την αντιμετώπιση των δυσμενών επιπτώσεων και προκειμένου να περιοριστούν αυτές όσο το δυνατό περισσότερο, είναι αναγκαία η θέσπιση κατάλληλων νομοθετικών ρυθμίσεων.

Η νομοθεσία που διέπει τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα καθορίζεται τόσο από αρμόδια κρατικά νομοθετικά όργανα όσο και από υπερεθνικά όργανα καθώς και από διμερείς ή πολυμερείς συμφωνίες που παράγονται μεταξύ διαφόρων κρατών. Στην περίπτωση της Ελλάδας τέτοια όργανα παραγωγής υπερεθνικού δικαίου είναι εκτός από τους διάφορους Διεθνείς Οργανισμούς και η Ευρωπαϊκή Ένωση. Το 60-70% της εθνικής νομοθεσίας για το περιβάλλον έχει προέλθει από την εναρμόνιση του Ελληνικού δικαίου με το Κοινοτικό.

Στην παρούσα υποενότητα γίνεται μια σύντομη αναφορά στις σημαντικότερες κοινοτικές οδηγίες που αφορούν την προστασία του καταναλωτή. Παράλληλα αναφέρονται και οι κοινοτικές οδηγίες που αφορούν τον έλεγχο των αγροτικών προϊόντων για υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

1.2.5.2 Τοξικολογικός Έλεγχος Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων και Προστασία Καταναλωτή

Ο τοξικολογικός έλεγχος των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, βάσει της Κοινοτικής Οδηγίας 91/414/EEC, περιλαμβάνει μια σειρά μελετών που αφορούν τόσο τη δραστική ουσία του προϊόντος όσο και το ίδιο το φυτοπροστατευτικό προϊόν και είναι οι εξής (Αθανασέλης, 1994):

- Μελέτες οξείας τοξικότητας από στόματος, μέσω δέρματος και μέσω αναπνευστικού συστήματος
- Μελέτες ερεθιστικότητας οφθαλμών και δέρματος
- Μελέτες ευαισθητοποίησης δέρματος για την ανίχνευση αλλεργιογόνου δράσης
- Μελέτες υποχρόνιας τοξικότητας
- Μελέτες γονοτοξικότητας in vivo και in vitro
- Μελέτες χρόνιας τοξικότητας και καρκινογένεσης
- Μελέτες αναπαραγωγής (πολλαπλών γενεών και τερατογένεσης)
- Άλλες μελέτες (απορρόφησης, κατανομής, απέκκρισης και μεταβολισμού δρώντος συστατικού, δυναμικού νευροτοξικότητας κ.α).

Από τις μελέτες οξείας τοξικότητας προκύπτει η Μέση Θανατηφόρος Δόση (Lethal Dose, LD). Η παράμετρος αυτή χρησιμοποιείται για την τοξικολογική κατάταξη των χημικών ουσιών αλλά και για τον καθορισμό της ευαισθησίας μεταξύ των ειδών και η τιμή της δεν είναι σταθερή αλλά επηρεάζεται από πλήθος παραγόντων όπως το φύλο, η ηλικία, ο φορέας χορήγησης της εξεταζόμενης ουσίας κ.α. (Σκουρολιάκου, 2015).

Από τις μελέτες επαναλαμβανόμενης χορήγησης (υποχρόνια, χρόνια, αναπαραγωγής, κ.α) προκύπτει η Δόση χωρίς Παρατηρήσιμη Επίδραση (No Observed Effect Level, NOEL). Η παράμετρος αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία και έγκειται στο γεγονός ότι αποτελεί τη βάση για τον υπολογισμό άλλων χαρακτηριστικών της προς εξέταση ουσίας (Βαλαβανίδης, 2008). Αξίζει να αναφερθεί ότι προϋπόθεση για συνέχιση του τοξικολογικού ελέγχου μιας φυτοπροστατευτικής ένωσης είναι η δυνατότητα προσδιορισμού της NOEL για όλες τις τοξικολογικές μελέτες. Σε αντίθετη περίπτωση δεν είναι δυνατή η έγκριση κυκλοφορίας του φυτοπροστατευτικού προϊόντος. Εξίσου σημαντική με τη NOEL είναι και η Δόση χωρίς Παρατηρήσιμη Επιβλαβή Επίδραση (No Observed Adverse Effect Level NOAEL), η οποία είναι η δόση που δεν προκαλεί μη αναστρέψιμες βιολογικά σημαντικές επιδράσεις. Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι η NOAEL προσδιορίζεται από διάφορες μελέτες και έχει συγκεκριμένες εφαρμογές. Έτσι η NOAEL που προκύπτει από τις μελέτες υποχρόνιας τοξικότητας χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της επικινδυνότητας της ουσίας κατά την εργασιακή έκθεση του ανθρώπου. Η τιμή της NOAEL από τις μελέτες χρόνιας τοξικότητας, χρησιμοποιείται κατά κανόνα για την εκτίμηση κινδύνου για τους

καταναλωτές γεωργικών προϊόντων, οι οποίοι μπορούν να καταναλώσουν την εξεταζόμενη ουσία σε όλη τη διάρκεια της ζωής τους μέσω γεωργικών προϊόντων με μορφή υπολειμμάτων.

Από τις μελέτες μεταλλαξιγένεσης καθορίζεται η συνολική δόση που δεν αναμένεται να προκαλέσει μη αναστρέψιμες βλάβες (NOAEL) στο πλέον ευαίσθητο πειραματόζωο με σκοπό τον καθορισμό των μέγιστων ανεκτών επιπέδων έκθεσης του ανθρώπου και των αποδεκτών επιπέδων έκθεσης του χειριστή. Από την παράμετρο αυτή προκύπτει και η Ημερήσια Αποδεκτή Δόση (Acceptable Daily Intake, ADI). Η ADI προκύπτει από την NOEL ή την NOAEL όταν η τελευταία διαιρεθεί με ένα συντελεστή ασφαλείας, ο οποίος συνήθως έχει την τιμή 100 και συμπεριλαμβάνει τη διαφορά ευαισθησίας που μπορεί να υπάρχει μεταξύ ανθρώπων καθώς και τη διαφορά ευαισθησίας μεταξύ πειραματόζωου και ανθρώπου (Αθανασέλης 1994). Οι συντελεστές ασφαλείας έχουν οριστεί αυθαίρετα αλλά είναι τοξικολογικά αποδεκτοί.

Με βάση την ADI καθορίζονται τα Μέγιστα Επιτρεπτά Όρια Υπολειμμάτων (Maximum Residues Limits, MRLs) στα τρόφιμα. Για τον προσδιορισμό τους εφαρμόζονται διάφορες μέθοδοι έχοντας όλες όμως ένα κοινό σκοπό. (WHO,2009). Για τις ουσίες που η Ημερήσια Αποδεκτή Δόση για τον άνθρωπο έχει καθοριστεί βάση δεδομένων χρόνιων επιδράσεων θα πρέπει η υπολογιζόμενη Μέση Ημερήσια Λήψη κάθε τοξικής ουσίας να μην υπερβαίνει την ADI. Τα περισσότερα φυτοπροστατευτικά προϊόντα υπάγονται στην κατηγορία αυτή.

1.2.5.3 Αγροτικά Προϊόντα και Ανώτατα Επιτρεπτά Επίπεδα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων

Σύμφωνα με το άρθρο 2 της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ ως υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων ορίζονται μία ή περισσότερες ουσίες παρούσες εντός ή επί των φυτών ή των προϊόντων φυτικής προέλευσης, των βρώσιμων προϊόντων ζωικής προέλευσης ή αλλού στο περιβάλλον, προερχόμενες από τη χρήση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος περιλαμβανομένων των μεταβολιτών τους και των προϊόντων που προέρχονται από την αποικοδόμηση ή την αντίδραση τους. Η παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε αγροτικά προϊόντα ενέχει διάφορους κινδύνους για τον καταναλωτή ανάλογα με:

α) Την οξεία, την υποχρόνια και τη χρόνια τοξικότητα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων,

β) Το επίπεδο των υπολειμμάτων στο συγκεκριμένο προϊόν και,

γ) Τις διατροφικές συνήθειες των καταναλωτών. Προκειμένου λοιπόν να έχουμε άμεσα μια εικόνα για την καταλληλότητα ή όχι ενός προϊόντος σε ότι αφορά το θέμα των υπολειμμάτων, έχουν θεσπιστεί τα Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων (MRLs, Maximum Residues Limits) για κάθε συνδυασμό αγροτικού προϊόντος και φυτοπροστατευτικού προϊόντος.

(<http://www.agrotypos.gr/redirect.asp?type=a&id=56969>).

Η θέσπιση των MRLs έχει δυο απώτερους στόχους, αφενός την προστασία του καταναλωτή από τις ανεπιθύμητες επιδράσεις των φυτοπροστατευτικών προϊόντων και αφετέρου τη διευκόλυνσή του ενδοκοινοτικού και διεθνούς εμπορίου αγροτικών προϊόντων. Τα MRLs καθορίζονται μετά από μια πολύπλοκη διαδικασία. Συγκεκριμένα απαιτούνται δεδομένα για τη μελέτη των ιδιοτήτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (υπολειμματικότητα, μεταβολισμός, συμπεριφορά στον αγρό κ.α), τα οποία προέρχονται από εκτενή πειραματισμό που διεξάγεται σύμφωνα με τους κανόνες της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής και της Ορθής Γεωργικής Πρακτικής, και δεδομένα που αφορούν τις διατροφικές συνήθειες των διαφόρων κρατών προκειμένου να καθοριστεί η αναμενόμενη έκθεση του ανθρώπου ή των ζώων μέσω της τροφής. Οι διαδικασίες αυτές καθορίζονται στην Οδηγία 91/414/ΕΟΚ και τα MRLs που θεσπίζονται είναι υποχρεωτικά για τα Κράτη-Μέλη και ορίζονται σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης με τη συνεργασία της Επιτροπής και εκπροσώπων της κρατών μελών.

Στη συνέχεια αναφέρονται οι βασικότερες οδηγίες της Ε.Ε που θεσπίζουν MRLs στα αγροτικά προϊόντα με τις μέχρι σήμερα τροποποιήσεις τους:

1) Οδηγία 76/895/ΕΟΚ: «περί του καθορισμού της μέγιστης περιεκτικότητας για τα κατάλοιπα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων επί και εντός των οπωροκηπευτικών», όπως αυτή τροποποιήθηκε με τις οδηγίες 80/428/ΕΟΚ, 81/36/ΕΟΚ, 82/528/ΕΟΚ, 88/298/ΕΟΚ, 89/186/ ΕΟΚ, 93/58/ ΕΚ, 96/32/ ΕΚ, 97/41/ΕΚ και 2000/24/ΕΚ. Η οδηγία αυτή καθορίζει Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων (MRLs) για 59 δραστικές σε 29 ομάδες οπωροκηπευτικών. Προβλέπει ελέγχους για την τήρηση των MRLs (άρθρο 4) και αποστολή σχετικής έκθεσης στην Ε.Ε. Τα MRLs που καθορίζονται με την αρχική Οδηγία (76/895/ΕΟΚ) δεν είναι υποχρεωτικά για τα κράτη-μέλη τα οποία έχουν τη δικαιοδοσία να εφαρμόσουν στην επικράτεια τους αυστηρότερα όρια. Οι ρυθμίσεις (MRLs) της εν λόγω οδηγίας, τροποποιούνται σταδιακά με βάση τα νεότερα επιστημονικά δεδομένα και μεταφέρονται στην Οδηγία 90/64/ΕΟΚ η οποία προβλέπει μεταξύ άλλων την υποχρεωτική τήρηση των MRLs

από τα κράτη-μέλη(http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/legislation/pesticides/76-895.pdf.)

2) Οδηγία 86/362/ΕΟΚ: «για τον καθορισμό ανωτάτων περιεκτικοτήτων για τα κατάλοιπα φυτοφαρμάκων μέσα και επάνω στα σιτηρά» όπως τροποποιήθηκε με τις οδηγίες 88/298/ΕΟΚ, 93/57/ΕΚ, 94/29/ΕΚ, 95/39/ΕΚ, 97/41/ΕΚ, 97/71/ΕΚ, 98/82/ΕΚ, 99/65/ΕΚ, 99/71/ΕΚ, 2000/24/ΕΚ και 2000/58/ΕΚ. Με την οδηγία αυτή καθορίζονται τα MRLs για 70 περίπου φυτοπροστατευτικά προϊόντα στα σιτηρά που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και προβλέπονται έλεγχοι σε ετήσια βάση για τήρηση των ορίων και ενημέρωση της Επιτροπής και των άλλων κρατών-μελών για τα αποτελέσματα των ελέγχων.

(http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/legislation/pesticides/86-362.pdf).

3) Οδηγία 86/363/ΕΟΚ: «για τον καθορισμό των ανωτάτων περιεκτικοτήτων για τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω και μέσα στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης» όπως τροποποιήθηκε με τις οδηγίες 93/57/ΕΚ, 94/29/ΕΚ, 95/39/ΕΚ, 97/41/ΕΚ, 97/71/ΕΚ, 98/82/ΕΚ, 99/71/ΕΚ, 2000/24/ΕΚ, 2000/48/ΕΚ, και 2000/58/ΕΚ. Με την οδηγία αυτή καθορίζονται MRLs για 70 περίπου φυτοπροστατευτικά προϊόντα σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (γάλα, αυγά, λίπος και κρέας) και προβλέπονται έλεγχοι σε ετήσια βάση για τήρηση των ορίων της Οδηγίας και ενημέρωση της επιτροπής και των άλλων κρατών-μελών για τα αποτελέσματα των ελέγχων αυτών.

(http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/legislation/pesticides/86-363.pdf.)

4) Οδηγία 90/642/ΕΟΚ: «Για τον καθορισμό των ανωτάτων περιεκτικοτήτων για τα κατάλοιπα φυτοφαρμάκων επάνω και μέσα σε ορισμένα προϊόντα φυτικής προέλευσης συμπεριλαμβανομένων και των οπωροκηπευτικών», όπως τροποποιήθηκε με τις οδηγίες 93/58/ΕΚ, 94/30/ΕΚ, 95/38/ΕΚ, 95/61/ΕΚ, 96/32/ΕΚ, 97/41/ΕΚ, 97/71/ΕΚ, 98/82/ΕΚ, 99/65/ΕΚ, 99/71/ΕΚ, 2000/24/ΕΚ, 2000/48/ΕΚ και 2000/58/ΕΚ. Η Οδηγία αυτή καταρτίζει κατάλογο ομάδων φυτικών προϊόντων για τα οποία προβλέπει καθορισμό ανώτατων ορίων υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (MRLs), δίνει παραδείγματα προϊόντων που ανήκουν σε κάθε ομάδα (άρθρο 1) και καθορίζει τα τμήματα των προϊόντων που ελέγχονται για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (παράρτημα οδηγίας). Επίσης προβλέπει κατάρτιση καταλόγου με MRLs που καθορίζονται σταδιακά με βάση τις νεότερες απαιτήσεις για τα προϊόντα του παραρτήματος, καθιστά τα MRLs υποχρεωτικά για τα κράτη-μέλη και απαιτεί

συστηματικούς ελέγχους από τα κράτη-μέλη βάσει των Εθνικών και του Συντονισμένου Κοινοτικού προγράμματος για τήρηση των MRLs. Οι μέθοδοι ανάλυσης που θα εφαρμόζονται μπορεί να είναι οι υποδεικνυόμενοι από την Ε.Ε ή και Εθνικές αλλά οπωσδήποτε θα πρέπει να λαμβάνουν υπόψη τους τα κριτήρια που καθορίζονται στο παράρτημα της Οδηγίας 85/591/ΕΟΚ που αφορά στις μεθόδους ελέγχου τροφίμων. Τέλος προβλέπει την αποστολή εκθέσεων στην Επιτροπή της Ευρωπαϊκής Ένωσης σε ετήσια βάση, σχετικά με τα αποτελέσματα των ελέγχων, τα κριτήρια βάσει των οποίων έγιναν τα προγράμματα, τον αριθμό των επιθεωρήσεων και τον τρόπο διεξαγωγής των ελέγχων και των παραβιάσεων των MRLs που διαπιστώθηκαν.

(www.efet.gr/images/efet_res/docs/legislation/pesticides/90-642.pdf).

5) Οδηγία 93/57/ΕΟΚ: Τροποποιεί το παράρτημα I της οδηγίας 86/362/ΕΟΚ (MRLs σε σιτηρά) και προσθέτει MRLs για 22 φυτοπροστατευτικά προϊόντα και το παράρτημα I της οδηγίας 86/363/ΕΟΚ (MRLs σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης) στο οποίο προσθέτει MRLs για 16 φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

6) Οδηγία 93/58/ΕΟΚ: Αφορά την τροποποίηση του παραρτήματος II της Οδηγίας 76/895/ΕΟΚ περί του καθορισμού της μέγιστης περιεκτικότητας σε υπολείμματα φυτοπροστατευτικά προϊόντα επί και εντός των οπωροκηπευτικών και του παραρτήματος της Οδηγίας 90/642/ΕΟΚ που αφορά τον καθορισμό ενός πρώτου καταλόγου Μέγιστων Ορίων (MRLs). Με την οδηγία αυτή καταργούνται διατάξεις (MRLs) που περιλαμβάνονται στην 76/895/ΕΟΚ και μεταφέρονται στην 90/642/ΕΟΚ ως υποχρεωτικά για τα κράτη-μέλη. Προσθέτει στον κατάλογο των προϊόντων που περιλαμβάνονται στην Οδηγία 90/642/ΕΟΚ τους σπόρους ηλίανθου και τις ελιές.

7) Οδηγία 95/39/ΕΚ: Τροποποιεί τα παραρτήματα των Οδηγιών 86/362/ΕΟΚ και 86/363/ΕΟΚ του Συμβουλίου που αφορούν στον καθορισμό ανώτατων περιεκτικότητων για τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων επάνω και μέσα στα σιτηρά και στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αντιστοίχως.

8) Οδηγία 97/41/ΕΚ: Τροποποιεί τις Οδηγίες 76/895/ΕΟΚ, 86/362/ΕΟΚ, 86/363/ΕΟΚ και 90/642/ΕΟΚ που αφορούν στον καθορισμό της μέγιστης περιεκτικότητας των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων επί και εντός των οπωροκηπευτικών, των σιτηρών, των τροφίμων ζωικής προέλευσης καθορισμένων προϊόντων φυτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων και των οπωροκηπευτικών αντίστοιχα.

9) Οδηγία 2000/24/ΕΚ: Τροποποιεί τα παραρτήματα των Οδηγιών 76/895/ΕΟΚ, 86/362/ΕΟΚ, 86/363/ΕΟΚ και 90/642/ΕΟΚ σχετικά με τα MRLs που έχουν θεσπιστεί σε σιτηρά, προϊόντα ζωικής και φυτικής προέλευσης συμπεριλαμβανομένων και των οπωροκηπευτικών.

10) Οδηγία 79/700/ΕΟΚ: Σχετικά με τη δειγματοληψία για τον έλεγχο υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων η οδηγία 79/700/ΕΟΚ «περί καθορισμού κοινοτικών μεθόδων δειγματοληψίας για τον επίσημο έλεγχο των καταλοίπων φυτοφαρμάκων επί και εντός των οπωροκηπευτικών» που ίσχυε έχει αντικατασταθεί από την οδηγία 2002/63/ΕΚ «για την καθιέρωση κοινοτικών μεθόδων δειγματοληψίας για τον επίσημο έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων μέσα και πάνω σε προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης και την κατάργηση της οδηγίας 79/700/ΕΟΚ»

Σε συνδυασμό με τα ανωτέρα δεν πρέπει να παραλειφθεί πως το όλο νομοθετικό πλαίσιο καλύπτεται και από κάποιες επιπλέον νομοθετικές ρυθμίσεις που αφορούν τον έλεγχο των τροφίμων. Στην κατηγορία αυτή υπάγεται η Οδηγία 89/397/ΕΟΚ «Σχετικά με τον επίσημο έλεγχο τροφίμων» όπως συμπληρώθηκε τελευταία με την Οδηγία 93/99/ΕΟΚ που θεσπίζει γενικές αρχές και προβλέπει ελέγχους και διαβίβαση των αποτελεσμάτων των ελέγχων στην Επιτροπή της Ε.Ε.

Η Ελλάδα εναρμονίστηκε με την παραπάνω οδηγία με την Απόφαση του Ανώτατου Χημικού Συμβουλίου 11/92 (ΦΕΚ 313/Β/8-5-92) και καθορίστηκε ως Αρμόδια Αρχή για τις αναλύσεις το Γενικό Χημείο του Κράτους ενώ δεν έχει εναρμονιστεί ακόμη με την Οδηγία 93/99/ΕΟΚ. Επίσης στην κατηγορία αυτή υπάγονται η Οδηγία 85/591/ΕΟΚ «Καθιέρωση κοινοτικών τρόπων δειγματοληψίας και μεθόδων ανάλυσης για τον έλεγχο των τροφίμων» και η οδηγία 93/43/ΕΟΚ «Υγιεινή τροφίμων» που έχει ενσωματωθεί στο εθνικό δίκαιο με την ΚΥΑ 487/2000 (ΦΕΚ 1219/4-10-2000) με αρμόδια αρχή για την εφαρμογή της το Υπ. Ανάπτυξης και ειδικότερα ο Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων (ΕΦΕΤ).

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ**2.1. Εγκατάσταση πειραμάτων και δειγματοληψία**

Ο σχεδιασμός των πειραμάτων για τον έλεγχο της υπολειμματικότητας γεωργικών φαρμάκων έχει μεγάλη σημασία:

- Πρώτον γιατί τα υπολείμματα έχουν να κάνουν με μικρές ποσότητες χημικών ουσιών (της τάξεως mg/kg).
- Δεύτερον, γιατί το ΑΟΥ(MRLs) σε κάποιες περιπτώσεις πλησιάζουν το όριο ανίχνευσης (LOD).
- Τρίτον οι ουσίες αυτές είναι τοξικές και τυχόν ανακριβές αποτέλεσμα θα οδηγήσει σε λάθος εκτιμήσεις του κινδύνου για τα τρόφιμα.

Για αυτό το σκοπό στις μελέτες υπολειμμάτων, προκειμένου τα δείγματα του γεωργικού προϊόντος που πιθανώς περιέχουν υπολείμματα γεωργικού φαρμάκου να είναι αντιπροσωπευτικά, πρέπει τα πειράματα να είναι βασισμένα στην Ορθή Γεωργική Πρακτική. Τα πειράματα γίνονται με χρησιμοποίηση εμπορικών σκευασμάτων και όχι εργαστηριακών παρασκευασμάτων γιατί η μορφή του σκεύασματος επηρεάζει την υποβάθμιση του γεωργικού φαρμάκου. Το μέγεθος του κάθε πειραματικού τεμαχίου πρέπει να είναι τέτοιο ώστε να επιτρέπει την άνετη εφαρμογή του γεωργικού φαρμάκου αλλά και τη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος (EE, 1997; EE; 1999; FAO, 1986) (Kratochvil and Peak, 1989). Σε όλες τις μελέτες χρειάζεται ένα πειραματικό τεμάχιο «μάρτυρας», στο οποίο δε χρησιμοποιείται γεωργικό φάρμακο (Beutel et al., 1992).

2.2. Αρχές εργασίας για τον ποιοτικό έλεγχο των αναλύσεων υπολειμμάτων ΦΠΠ σύμφωνα με την Ορθή Εργαστηριακή Πρακτική (ΟΕΠ) ή (GLP)

❖ Οι εργαστηριακές εργασίες θα πρέπει να πληρούν τις απαιτήσεις αναγνωρισμένου συστήματος διαπίστευσης, σύμφωνα με το ISO EN 45001 ή τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (ΟΕΠ).

❖ Το εργαστήριο πρέπει να συμμετέχει σε κατάλληλες διεργαστηριακές δοκιμές ελέγχου ικανότητας, όπως εκείνες που οργανώνονται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή, το FAPAS και το CHEK. Όταν δεν επιτυγχάνεται η αναγκαία βαθμολογία, το ή τα σχετικά προβλήματα θα πρέπει να επιλύονται πριν από την πραγματοποίηση περαιτέρω αναλύσεων στα υπ' όψη υπολείμματα.

❖ Στην περίπτωση ποσοτικών αποτελεσμάτων, τα κρίσιμα βάρη και όγκοι πρέπει να μετρώνται με εξοπλισμό που να δίνει ακρίβεια στην RSD της τάξεως του $\pm 2 \%$, και κατά προτίμηση της τάξεως του $\pm 1 \%$. Ο εργαστηριακός εξοπλισμός πρέπει να βαθμονομείται, συντηρείται και χρησιμοποιείται σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Παρόμοια προσέγγιση θα πρέπει να υιοθετείται και στην περίπτωση φασματοφωτομετρικού εξοπλισμού που απαιτεί βαθμονόμηση για το μήκος κύματος, το λόγο μάζας προς φορτίο, κ.λ.π. Στις αναλύσεις θα πρέπει να περιλαμβάνονται, κατά το δυνατό, τα συστατικά που ορίζονται σύμφωνα με την οδηγία 91/414/EC). (www.observatoire-pesticides.fr/upload/bibliotheque/.../directive_91_414_CE.pdf)

2.3. Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία από κάθε πειραματικό τεμάχιο πρέπει να είναι αντιπροσωπευτική και σύμφωνη με τις οδηγίες του FAO/WHO(1986) και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (79/700/EC) όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1 (EC/AppendixB,1997).

Πίνακας 2.1: Συνοπτικός πίνακας για την εφαρμογή δειγματοληψίας (EC/Appendix B, 1997).

Ακατέργαστα προϊόντα Ελάχιστος αριθμός δειγμάτων					Μεταποιημένα προϊόντα	
Είδος Δείγματος	Δείγμα αγρού (ανώριμα)	Δείγμα εργαστηρίου (ανώριμα)	Δείγμα αγρού (ώριμα)	Δείγμα εργαστηρίου (ώριμα)	Είδος δείγματος	Ελάχιστο εργαστηριακό δείγμα
Μηλοειδή	12 καρποί (1kg)	1kg	12 καρποί (1kg)	1Kg	Χυμός μαρμελάδα	1L
Εσπεριδοειδή	12 καρποί (1kg)	0,5kg	12 καρποί (1kg)	1kg	Χυμός μαρμελάδα	1L
Σταφύλια	12 τσαμπία (0,5kg)	0,5kg	12 τσαμπία (0,5kg)	1kg	Χυμός μαρμελάδα	1L
		0,5kg			Χυμός κρασί	

2.4. Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός υπολειμμάτων

Η διαδικασία αυτή ξεκινάει με την ορθή προετοιμασία των δειγμάτων, την ομοιογενοποίηση, την εκχύλιση, τον καθαρισμό και την ανάλυση. Κατά τη διαδικασία αυτή η προσοχή πρέπει να στρέφεται στη καθαρότητα των σκευών, των διαλυτών, των αντιδραστηρίων καθώς και στην ετοιμότητα των οργάνων. Ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων ως μέρος της Αναλυτικής Χημείας διέπεται από τις ίδιες απαιτήσεις που συνεπάγεται η αξιόπιστη και ευαίσθητη ανάλυση. Επιπλέον όμως έχει τις εξής ιδιαιτερότητες:

- Οι συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων είναι πολύ μικρές
- Το “υπόστρωμα” μεταβάλλεται και επηρεάζει την ανάλυση
- Το ιστορικό των δειγμάτων είναι πολλές φορές άγνωστο

Πρέπει να αποφεύγεται κάθε πιθανή μόλυνση των δειγμάτων από γεωργικά φάρμακα που μπορεί να προκύψει εξωτερική πηγή. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η σωστή σήμανση των δειγμάτων, όπως επίσης και η μεταφορά τους κατά την οποία πρέπει να αποφεύγονται οι υψηλές θερμοκρασίες. Ιδιαίτερη σημασία στην μεταφορά και φύλαξη των δειγμάτων για ανάλυση υπολειμμάτων έχει η συσκευασία και ο τρόπος μεταφοράς και φύλαξης (Σύσταση της ΕΕ, 1999/333). Η αποθήκευση των δειγμάτων που προορίζονται για ανάλυση υπολειμμάτων γίνεται μόλις φθάσουν στο εργαστήριο σε καταψύκτες με θερμοκρασία -20°C , στην οποία η υποβάθμιση των γεωργικών φαρμάκων πραγματοποιείται με εξαιρετικά χαμηλή ταχύτητα. Πιστεύεται ότι το 50 % όλων των λαθών, στις αναλύσεις του περιβάλλοντος προέρχονται από τη μη κανονική δειγματοληψία. Ένα άλλο σοβαρό πρόβλημα κατά τη φάση δειγματοληψίας έχει να κάνει με την τηρούμενη ιχνηλασιμότητα των δειγμάτων κατά τη μεταφορά τους στο εργαστήριο. Η ιχνηλασιμότητα βασίζεται στις κωδικοποιήσεις των δειγμάτων και την αυστηρή τήρηση αρχείων κατά την παραλαβή, μεταφορά και παράδοση δειγμάτων στα εργαστήρια. Οι τρεις αυτές φάσεις είναι συνδεδεμένες και πρέπει να γίνονται σε ορισμένο χρόνο που επιτρέπει η μεθοδολογία ανάλυσης (Nielsen, 1999). Για να αποτραπούν αυτά τα προβλήματα πρέπει να έχουμε υπόψη μας τους 5 παράγοντες για τον έλεγχο της δειγματοληψίας:

1. Η ασφάλεια του ατόμου που εκτελεί την δειγματοληψία,
2. Η εξασφάλιση αντιπροσωπευτικού δείγματος κάθε φορά που γίνεται ο έλεγχος.
3. Η παρεμπόδιση και προφύλαξη του δείγματος από πιθανές μολύνσεις,

4. Η τήρηση αρχείων από την παραλαβή των δειγμάτων μέχρι την τελευταία διαδικασία καταστροφής δειγμάτων,

5. Η προστασία των δειγμάτων από χημικές, φυσικές ή βιολογικές μεταβολές κατά την μεταφορά, φύλαξη και κατά τη διάρκεια ανάλυσης (Legendre et al., 1979; 1999/333/EC). Όλοι οι παραπάνω παράγοντες έχουν συζητηθεί λεπτομερώς από την EPA Region IV Standard Operating Procedure and Quality Assurance Manual (Μάρτιος, 1996), με ελεύθερη πρόσβαση στο ιντερνέτ: www.epa.gov/regionCH/sesd. Άλλες καλές πηγές πληροφόρησης γύρω από την δειγματοληψία είναι ο Standard Operating Procedures for Laboratory Operations and Sample Collection Activities από το Florida Department of Environmental Regulation Quality Assurance Section, 2600 Blair Stone Road, Tallhassee, Fl 32399-2400 (publication DER QA-001/92), και δυο βιβλία από το Larry Keith Environmental Sampling and Analysis, A Practical Guide (1991, Lewis Publishers) και Principles of Environmental Sampling (1988), American Chemical Society a second edition). Επίσης η ASTM έχει δημοσιεύσει σε βιβλίο τις επιλογές των 81 ASTM σχετικών διαδικασιών για τη δειγματοληψία, ASTM Standardson Environmental Sampling (1995, ASTM, 1916 RaceSt., Philadelphia PA 19103). Η EPA έχει δημοσιεύσει δύο οδηγούς (volume): Subsurface Characterization και Monitoring Techniques, (EPA 625/R-93/003).

Οι μέθοδοι προσδιορισμού των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων διακρίνονται σε εξειδικευμένες ή μεμονωμένου υπολείμματος (specificorsingle residue methods) και σε πολυυπολειμματικές (multi-residuemethods). Εξειδικευμένες ή μεμονωμένου υπολείμματος μέθοδοι (specificorsingleresidue methods) είναι αυτές με τις οποίες προσδιορίζεται ένα μόνον φυτοπροστατευτικό προϊόν ή ορισμένες μόνο συγγενείς ουσίες. Πριν το 1960 χρησιμοποιούνταν οι μέθοδοι-μεμονωμένου υπολείμματος ανάλυσης, καθώς όμως η χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων αυξανόταν άλλαξαν και οι ανάγκες της ανάλυσης. Η αξιολόγηση μίας αναλυτικής μεθόδου καθορίζεται από τους παρακάτω παράγοντες:

- Εξειδίκευση, δηλαδή ο αριθμός των ουσιών που μπορούν να ανιχνευθούν με την ίδια αυτή μέθοδο
- Εκλεκτικότητα, που αναφέρεται στην ικανότητα ανίχνευσης μίας ή περισσοτέρων σχετικών ουσιών σε ένα μίγμα ξένων ουσιών
- Ευαισθησία στην ανάλυση
- Χαμηλό κατώτατο όριο ανίχνευσης

Οι πολυπολειμματικές μέθοδοι (multiresidue methods ή MRM) αναπτύχθηκαν για να διευκολύνουν τον έλεγχο ρουτίνας των γεωργικών προϊόντων, επιτρέποντας τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Στην βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετές μέθοδοι, οι οποίες έχουν την δυνατότητα να προσδιορίζουν ένα σημαντικό μεγάλο αριθμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων διαφόρων κατηγοριών, ακόμη και άνω των 100 ουσιών (Song 2007). Ο Pang το 2006 ανέπτυξε μέθοδο με την οποία ανέλυε 446 ουσίες σε μέλι, χυμούς φρούτων και οίνους χρησιμοποιώντας διπλό φυσίγγιο εκχύλισης στερεάς φάσης (Solid phase extraction SPE), GC-MS και LC-MS-MS. Στους οίνους εφαρμόζονται με επιτυχία, όπως φαίνεται και από την πληθώρα των εργασιών, πολυπολειμματικές μέθοδοι προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων, οι οποίες συνδυάζουν διάφορες μεθόδους εκχύλισης και χρωματογραφικής ανάλυσης.

2.5. Αναλυτικές μέθοδοι για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων

Η αναλυτική διαδικασία μπορεί να είναι ποσοτική πολύ-υπολειμματική, ημιποσοτική, απλή ποσοτική μέθοδος ή απλώς ποιοτική. Η κάθε μία εξαρτάται από το σκοπό που επιθυμούμε, τη σημασία του αποτελέσματος και από το είδος ίου πεδίου εφαρμογής. Η πολικότητα, πτητικότητα, χημική αντίδραση, θερμική σταθερότητα επηρεάζουν σε σημαντικό βαθμό την απόδοση στις ανακτήσεις (recovery) από το υπόστρωμα των τροφίμων. Σημαντικό ρόλο στην ανίχνευση των ΦΠΠ (φυτοφαρμάκων) παίζουν ο καθαρισμός (cleanup) των δειγμάτων, όπως επίσης η επιλογή της κατάλληλης στήλης και της κατάλληλης μεθοδολογίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους (Nielsen, 1998).

2.5.1. Πολύ-υπολειμματικές μέθοδοι(multi residue methods)(MRMs)

Παίζουν σημαντικό ρόλο στην προσδιορισμό υπολειμμάτων στα γεωργικά προϊόντα και στα τρόφιμα. Οι MRMs χρησιμοποιούνται στην ανίχνευση και στον προσδιορισμό υπολειμμάτων από αρκετά φυτοπροστατευτικά προϊόντα σε μία σειρά τροφίμων. Μέσα από διεργαστηριακές συγκριτικές μελέτες έχουν αποδειχτεί αξιόπιστες στην εκτίμηση των επιπέδων υπολειμμάτων και χρησιμοποιούνται ευρύτατα (Biechi et al., 1997; Aston et al., 1996). Τυπικά οι μέθοδοι αυτές περιλαμβάνουν τις εξής φάσεις:

- α) την προετοιμασία των δειγμάτων,

- β) την εκχύλιση,
- γ) τον καθαρισμό και

δ) τον χρωματογραφικό διαχωρισμό ή τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιώντας εκλεκτικούς ανιχνευτές και αυτόματο προσδιορισμό. Οι πολυυπολειμματικές μέθοδοι (MRMs) χρησιμοποιούνται από την FDA και την USDA. Οκτώ από αυτές βασίζονται στην αέρια χρωματογραφία (GC) και δυο άλλες στη υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) (Nielsen, 1998). Οι MRMs που χρησιμοποιούνται τροποποιούνται και βελτιώνονται συνέχεια.

Από την άλλη πλευρά οι πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι δεν μπορούν να ανιχνεύσουν όλα τα υπολείμματα που περιέχονται σε όλα τα τρόφιμα. Στην πράξη παρουσιάζουν ένα συναγωνισμό ανάμεσα στον αριθμό των υπολειμμάτων που μπορούν να ανιχνεύσουν, τα είδη των τροφίμων στα οποία μπορούν να εφαρμοστούν και τα επίπεδα υπολειμμάτων που μπορούν να προσδιορίσουν. Το κύριο πλεονέκτημα τους είναι ο πολύ μεγάλος αριθμός υπολειμμάτων που μπορούν να ανιχνεύσουν και να προσδιορίσουν ταυτόχρονα και με αξιοπιστία. Λεπτομερώς οι μέθοδοι αυτές (MRMs) περιγράφονται από την FDA στο βιβλίο Volume I of the Pesticide Analytical Manual (PAM I). Τα AOAC International επίσης έχουν αναπτύξει μια πολύ-υπολειμματική (MRMs) μέθοδο για υπολείμματα φυτοφαρμάκων AOAC Pesticide Screen (AOAC Method 970.52)

2.5.2. Απλές μέθοδοι

Σε αντίθεση με τις MRMs οι απλές υπολειμματικές μέθοδοι (SRMs) επιτυγχάνουν τον προσδιορισμό μίας δραστικής ουσίας συνήθως μαζί με τους κύριους μεταβολίτες της (τους μεταβολίτες της ή τις μετασχηματισμένες ουσίες με τοξικολογική σημασία). Πολλές SRMs έχουν αναπτυχθεί για να στηρίζουν τις εφαρμογές για την καταγραφή των αποδεκτών ορίων ή στην έρευνα του μεταβολισμού και της τύχης στο περιβάλλον των χημικών ουσιών. Γενικά οι SRMs είναι λιγότερο χρονοβόρες και συχνά εξασφαλίζουν χαμηλότερα όρια στη ανίχνευση από τα MRLs. Ειδικές αναφορές για τις μεθόδους αυτές δίνονται στο Volume II of the Pesticide Analytical Manual (PAM II). Σε αυτό το βιβλίο περιγράφονται μέθοδοι οι οποίες έχουν δοκιμαστεί και αξιολογηθεί από την EPA.

2.6. Ποσοτικές μέθοδοι

2.6.1 Γενικά

Οι κύριες φάσεις μίας ποσοτικής αναλυτικής μεθόδου για υπολείμματα φυτοφαρμάκων είναι οι εξής :

1. προετοιμασία των δειγμάτων
2. εκχύλιση
3. καθαρισμός (Clenup)
4. διαχωρισμός
5. ανίχνευση και ποσοτικός προσδιορισμός

Υπάρχει μία ογκώδης τεχνική βιβλιογραφία για την ανάλυση υπολειμμάτων. Διάφορες μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί και αξιολογηθεί για την ανάλυση υπολειμμάτων σε διαφορετικά είδη τροφίμων. Τα κύρια βιβλία που περιγράφουν λεπτομερώς τις μεθόδους είναι: Pesticide Analytical Manual, Volume I, II, (FDA, 1985), Analytical Methods for Pesticide Residues in Foods (McLeod and Graham 1986) δημοσιευμένο από την Health Protection Branch Health and Welfare Canada και Analytical Methods for Residues of Pesticides (Greve, 1988) το οποίο εκδόθηκε από την Government Publishing Office for the Ministry of Welfare Health and Cultural Affairs of the Netherlands.

2.6.2. Επιλογή μιας μεθόδου

Τα κριτήρια επιλογής για μια αναλυτική μέθοδο έχουν να κάνουν με την αξιοπιστία της, τις ιδιότητες του υποστρώματος, και τις ιδιότητες του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση. Βάση αυτών των κριτηρίων μπορούμε να χωρίσουμε τις μεθόδους σε τέσσερις κατηγορίες

1. υψηλής υγρασίας, χαμηλής λιποπεριεκτικότητας (φρούτα και λαχανικά)
2. υψηλής υγρασίας, υψηλής λιποπεριεκτικότητας (κρέας)
3. χαμηλής υγρασίας, χαμηλής λιποπεριεκτικότητας (ξηροί καρποί)
4. χαμηλής υγρασίας, υψηλής λιποπεριεκτικότητας (cocoabeans) υψηλή υγρασία θεωρείται η περιεκτικότητα 75% και άνω σε νερό ενώ χαμηλής λιποπεριεκτικότητας είναι τα δείγματα που περιέχουν 2% λίπος.

Ανάλογα με την περιεκτικότητα των τροφίμων σε λίπος, υγρασία και υδατάνθρακες έχει γίνει λεπτομερώς καταχώριση των μεθόδων ανάλυσης τροφίμων από το Luke και Masumoto (Luke and Masumoto, 1986). Η πολικότητα των δραστικών ουσιών, οι αντιδράσεις, η θερμική σταθερότητα και οι οργανικοί διαλύτες κατανομής επιδρούν στην ανάκτηση των υπολειμμάτων από το υπόστρωμα τροφίμων.

Από την άλλη πλευρά η διαδικασία καθαρισμού και το είδος του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση μας δίνουν τη δυνατότητα επιλογής μιας μεθόδου και τον αναλυτικό εξοπλισμό που θα χρησιμεύσει στην ανάλυση (Lehotaj et al., 2000).

2.7. Εκχύλιση

Στόχος αυτής της διαδικασίας είναι η ανάκτηση όσο το δυνατόν πληρέστερα των υπολειμμάτων με χρήση οργανικών διαλυτών (Lehotaj et al., 2000). Συνήθως το δείγμα που υποβάλλεται σε εκχύλιση κυμαίνεται από 250g μέχρι και 5 g. Ο παραδοσιακός τρόπος εκχύλισης γίνεται μεταφέροντας το αναλυτικό δείγμα βάση της εφαρμοζόμενης μεθόδου σε ένα ομοιογενοποιητή υψηλής ταχύτητας, 3.000-5.000 στροφές το λεπτό. Το δείγμα αναμειγνύεται με οργανικό διαλύτη. Οι πιο συνηθισμένοι διαλύτες είναι:

⇒ η ακετόνη (CH_3COCH_3),

⇒ ο οξικός αιθυλεστέρας ($\text{CH}_3\text{COOCH}_3$) και

⇒ το ακετονιτρίλιο (CH_3CN). Σε αυτό το μίγμα προστίθεται χλωριούχο νάτριο (NaCl) άνυδρο ή άνυδρο θειικό νάτριο (Na_2SO_4) για την απορρόφηση του ύδατος και τον καλό διαχωρισμό των φάσεων (Ambras, 1996). Στην ανάλυση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιούνται διαλύτες υψηλότερης καθαρότητας, πρώτον γιατί οι ουσίες που θα ανιχνευτούν είναι σε πολύ χαμηλή ποσότητα και δεύτερο διότι η ανίχνευση έχει να κάνει με πολύ ευαίσθητα συστήματα.

Στο εμπόριο υπάρχουν διαλύτες υψηλής καθαρότητας «pesticides analysis» που οι προσμίξεις τους είναι πολύ χαμηλές. Ο καθαρισμός διαλυτών όταν δεν είναι της απαιτούμενης καθαρότητας γίνεται με απόσταξη ή με άλλους τρόπους, όπως με χρωματογραφία προσρόφησης, διήθηση από ηθμούς διαμέτρου πόρων 0,5 μm και ελέγχονται για την απορρόφηση τους στο υπεριώδες (UV). Πριν την εκχύλιση οι διαλύτες μπορούν να ελεγχθούν με χρωματογραφία και μετά να χρησιμοποιηθούν για εκχύλιση. Έτσι ελέγχεται η καθαρότητα τους σε όλο το φάσμα χρωματογραφίας. Για την επιλογή του διαλύτη οδηγούμαστε από τα εξής κριτήρια: (Visi, 1983).

⇒ έλλειψη αντίδρασης μεταξύ του διαλύτη και των γεωργικών φαρμάκων

⇒ η πολικότητα των προς προσδιορισμό γεωργικών φαρμάκων

⇒ το ποσοστό διαλυτότητας (βάρος W/όγκο V) των δραστικών ουσιών στους διάφορους διαλύτες

- ⇒ ο τύπος του προς ανάλυση δείγματος & η τοξικότητα του διαλύτη
- ⇒ η πτητικότητα και η καθαρότητα του διαλύτη
- ⇒ το κόστος του διαλύτη
- ⇒ ο τύπος της μεθόδου (ειδική ή πολυπολειμματική) Γενικά για την

εκχύλιση υδρόφιλων γεωργικών φαρμάκων χρησιμοποιούνται υδρόφιλοι διαλύτες και αντίστοιχα λιπόφιλοι διαλύτες για λιπόφιλα γεωργικά φάρμακα. Η ποσότητα του άνυδρου άλατος μειώνεται ή αυξάνεται ανάλογα με το ποσοστό υγρασίας ή ύδατος του δείγματος (Steinwandter, 1989). Το είδος του δείγματος καθορίζει το ποσοστό του άνυδρου άλατος και το είδος των διαλυτών που θα χρησιμοποιηθούν στην εκχύλιση. Η ανάμιξη του διαλύτη του άνυδρου άλατος και του δείγματος αναφοράς γίνεται σε υψηλή ταχύτητα για 1-2 min. Μετά από αυτή τη διαδικασία όλο το μίγμα αφήνεται να ηρεμήσει για 2-3 λεπτά μέχρι να ξεχωρίσει η οργανική φάση. Η οργανική φάση παραλαμβάνεται με διήθηση και έτσι παίρνουμε στη φάση καθαρισμού (Bourgeois et al., 1993).

2.8. Καθαρισμός (cleanup)

2.8.1. Παραδοσιακές μέθοδοι

Συνήθως τα ακατέργαστα εκχυλίσματα καθαρίζονται μερικώς πριν το διαχωρισμό και την ανίχνευση. Η ανάγκη για περαιτέρω καθαρισμό εξαρτάται από τις απαιτήσεις του αναλυτικού οργάνου προπαντός των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση των γεωργικών φαρμάκων ή άλλων τοξικών ουσιών, το είδος της χρωματογραφίας στο διαχωρισμό των ουσιών και το είδος του δείγματος. Ο όρος καθαρισμός στον προσδιορισμό υπολειμμάτων εκφράζει τις χημικές διεργασίες στις οποίες υποβάλλεται το εκχύλισμα προκειμένου να απομονωθούν τα γεωργικά φάρμακα από τα υπόλοιπα φυτικά εκχυλίσματα που είναι τα κύρια συστατικά τα οποία παρεμποδίζουν τη μέτρηση και μικραίνουν τη ζωή των στηλών και των ευαίσθητων ανιχνευτών της χρωματογραφίας. Τα φυτικά εκχυλίσματα μπορεί να είναι χημικές ενώσεις των εξής κατηγοριών: πτητικές αμίνες, φαινόλες, οργανικά οξέα, σάκχαρα, φυτικά λίπη και έλαια, χλωροφύλλη κ.α. Στη γενικότητα ο καθαρισμός των δειγμάτων είναι μια χρονοβόρα διαδικασία και απαιτεί μεγάλη προσοχή επειδή επηρεάζει το σφάλμα της αναλυτικής μεθόδου. Σε αυτή τη φάση της ανάλυσης οι ουσίες (φυτοφάρμακα) διαχωρίζονται από τα εκχυλίσματα τα

οποία εμποδίζουν την ανίχνευση των γεωργικών φαρμάκων (Hernandez et al., 1996). Τα υπολείμματα καθαρίζονται μερικές φορές από μια χρωματογραφική στήλη με τη διαδικασία της προσρόφησης. Για την προσρόφηση χρησιμοποιείται γυάλινη στήλη με διαστάσεις 10 -20 cm x2,5 cm γεμισμένη με Florisil, αλουμίνα, διοξείδιο του πυριτίου ή ενεργό άνθρακα. Συνήθως η γέμιση της στήλης (στατική φάση) επιλέγεται με βάση το φυτικό υπόστρωμα. Η κινητή φάση μπορεί να είναι οργανικός διαλύτης ή μίγμα διαλυτών. Ο διαχωρισμός των ουσιών στηρίζεται στη διαφορετική προσρόφηση των ουσιών πάνω στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού. Το εκχυλισμένο δείγμα (οργανική φάση) μεταφέρεται στην κορυφή της στήλης. Με τη βοήθεια των διαλυτών έκλουσης οι ουσίες μετακινούνται με διαφορετική ταχύτητα η κάθε μια ανάλογα με το βαθμό προσρόφησης της πάνω στη στατική φάση. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι η ακετόνη, το κυκλοεξανόλιο, το μεθυλενοχλωρίδιο κ.α. (Nielsen, 1998).

2.8.2 Εναλλακτικές τεχνικές καθαρισμού.

Το κύριο πλεονέκτημα αυτών των τεχνικών είναι η μείωση του απαιτούμενου χρόνου για την ολοκλήρωση αυτής της φάσης και η μείωση της ποσότητας του καταναλισκόμενου διαλύτη. Η εξοικονόμηση του τελευταίου έχει να κάνει με τη μείωση του κόστους της ανάλυσης (Markel et al., 1991; Bourgeois et al., 1993).

α) Εκχύλιση στερεά-φάσης. Μία μικρή ποσότητα στερεού με διάμετρο κόκκων 30-40 μm , που περιέχεται σε ένα σωλήνα πολυπροπυλενίου ή γυάλινο σε ποσότητα 30 mg -10 g προσροφητικού μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθαρισμό των εκχυλισμένων φυτοφαρμάκων πριν προσδιοριστούν στο χρωματογράφο (Nielsen, 1998). Τυπικά η κατακράτηση είναι -5% της μάζας του καθαριστικού υλικού. Ο ελάχιστος όγκος έκλουσης είναι μόνο 120 μL ανά 100 mg υλικού γέμισης (packing material). Υπάρχει μια μεγάλη γκάμα τέτοιων σωληνάρων με επιλογή εκλεκτικότητας ανάλογα με ία φάρμακα που θέλουμε να προσδιορίσουμε (Nielsen, 1998).

β) Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid-Phase Microextraction) SPME: Η τεχνική της (SPME) χρησιμοποιεί μια ίνα καλυμμένη με ένα πολυμερές υλικό που τοποθετείται εντός του υγρού εκχυλίσματος ή συγκρατείται στην αέρια φάση εντός του κενού του δείγματος η οποία δίνει τη δυνατότητα στη υπολειμματική ουσία να διαχυθεί μέσα στο στρώμα επικάλυψης. Ύστερα από την ισορροπία των φάσεων το πολυμερές σώμα μαζί με τη βελόνα μεταφέρεται στον εισαγωγέα του GC όπου οι

ουσίες με την επίδραση της θερμότητας εκροφούνται μέσα στη στήλη. Τα εξαρτήματα προσαρμογής για να εφαρμοστεί αυτή η τεχνική στην υπάρχουσα αεροχρωματογραφία υπάρχουν στο εμπόριο (McDonald and Bouvier, 1995).

γ) Διαλυτική εκχύλιση με τη βοήθεια μικροκυμάτων: Η μέθοδος αυτή μπορεί να μειώσει αισθητά το χρόνο εκχύλισης και είναι αποτελεσματική στην ανάκτηση των ουσιών από το υπόστρωμα των τροφίμων. Το εμπορικό σύστημα για ταυτόχρονη εκχύλιση πολλών δειγμάτων μέσα σε κλειστό και υπό πίεση δοχείο μπορεί να αυτοματοποιηθεί στις συνθήκες ενός εργαστηρίου. Τα δείγματα τοποθετούνται σε ένα γραμμικό στήριγμα με 8-12 φιαλίδια με την ίδια εσωτερική πίεση. Με μια οπτική ίνα μπορεί να ελεγχθεί με ακρίβεια η θερμοκρασία στο εσωτερικό του κλειστού δοχείου. Μετά την εκχύλιση τα φιαλίδια πρέπει να ψύχονται στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Το πλεονέκτημα αυτής της προσέγγισης είναι:

- ⇒ ο χειρισμός των θερμοκρασιών όταν αυτές ξεπεράσουν το σημείο ζέσεως του διαλύτη,
- ⇒ η γρήγορη μεταφορά των υπολειμμάτων στη διαλυτική φάση και
- ⇒ ο προγραμματισμός της διαδικασίας (Bouaid et al., 2000).

δ) Η επιταχυνόμενη διαλυτική εκχύλιση : Η τεχνική αυτή έχει να κάνει με τη χρησιμοποίηση περιορισμένων ποσοτήτων συμβατικών διαλυτών σε υψηλές θερμοκρασίες (μέχρι 200 °C) και πιέσεις (1500-2000 psi) ώστε να εκχυλίζει στερεά δείγματα σε μικρό χρονικό διάστημα (συνήθως <10 min) (Nielsen, 1998). Η διαδικασία αυτή μοιάζει με την τεχνική μικροκυμάτων με μόνη διαφορά ότι τα μικροκύματα αντικαθιστώνται από συμβατική θέρμανση. Στο τέλος της εκχύλισης ο απομένον διαλύτης μεταφέρεται στο φιαλίδιο με τη βοήθεια συμπιεσμένου αέρα. Περισσότερες λεπτομέρειες για το θέμα αυτό δίνονται στο κεφάλαιο 3.

2.9. Ανάλυση των δειγμάτων για υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Μετά την εκχύλιση και τον καθαρισμό των δειγμάτων γεωργικών προϊόντων ακολουθεί η ανάλυση για την ανίχνευση και προσδιορισμό των υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται ανάλογα με το είδος υπολειμμάτων που ελέγχονται, σε όργανα αέριας υγρής χρωματογραφίας (GLC), υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), φασματοφωτομετρίας μάζας (MS) και φασμοτοφωτομετρίας υπεριώδους (UV) (Widmer, 1990). Η ανάλυση

γίνεται με τη βοήθεια πρότυπων διαλυμάτων φυτοφαρμάκων. Λεπτομέρειες γι' αυτό το θέμα δίνονται στο επόμενο κεφάλαιο (Κεφ. 3)

2.10 Επικύρωση αναλυτικής μεθοδολογίας

Για την αξιολόγηση των αναλυτικών μεθόδων θα πρέπει να μελετώνται ορισμένες σημαντικοί παράμετροι, όπως αναφέρονται σε επόμενες παραγράφους (Λύκας 2009, EC 2009, Eurochem 2000 και 2002).

- **Βαθμονόμηση και γραμμικότητα:** Σε όργανα μετρήσεων, όπως οι χρωματογράφοι, απαιτείται βαθμονόμηση κατά την εγκατάστασή τους ως μέρος της διαδικασίας επιβεβαίωσης και ρύθμισης της κανονικής τους λειτουργίας. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται με τη χρήση προτύπων ουσιών αναφοράς. Η γραμμικότητα του συστήματος ανίχνευσης, είναι επιθυμητή αλλά δεν αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση και δεν είναι εξασφαλισμένη σε όλο το εύρος των συγκεντρώσεων. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται για την επαλήθευση της σχέσης μεταξύ των μετρήσεων ενός αναλυτικού οργάνου και των πραγματικών τιμών των προτύπων ουσιών. Η βαθμονόμηση πραγματοποιείται κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής τεχνικής με τη μέτρηση μιας σειράς προτύπων ουσιών σε διαφορετικές περιεκτικότητες.

Στην περίπτωση, που ενδιαφέρει η μελέτη της γραμμικότητας ενός ανιχνευτή για μια προσδιοριζόμενη ουσία, θα πρέπει να ελέγχεται η γραμμικότητα σε 5 τουλάχιστον συγκεντρώσεις, οι οποίες να καλύπτουν όλο το εύρος της περιοχής μετρήσεων της αναλυτικής μεθόδου. Η γραμμικότητα αποδεικνύεται με εξέταση του διαγράμματος της απόκρισης του ανιχνευτή σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναλυτή. Για να θεωρηθεί η γραμμική σχέση μεταξύ απόκρισης του αναλυτικού οργάνου και συγκέντρωσης στατιστικά σημαντική θα πρέπει ο συντελεστής συσχέτισης να έχει τιμές $> 0,98$. Εάν δεν είναι γραμμική η συσχέτιση είναι δυνατόν να περιοριστεί η περιοχή των συγκεντρώσεων ώστε να καταστεί γραμμική.

- **Όριο ανίχνευσης (limit of detection-LOD):** Το όριο ανίχνευσης προσδιορίζει το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης του αναλύτη, στο οποίο αυτός μπορεί να ανιχνευτεί αξιόπιστα και εξαρτάται από τον αναλύτη, το υπόστρωμα και τον ανιχνευτή. Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον στην πράξη η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα για την οποία ο λόγος σήμα προς θόρυβο (signal/noise, S/N) είναι 3:1.

- **Όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantitation-LOQ):** Το όριο

ποσοτικοποίησης μιας μεθόδου ορίζεται ως το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ουσίας, το οποίο μπορεί αξιόπιστα να προσδιοριστεί ποσοτικά με αποδεκτή, δηλαδή, πιστότητα και ακρίβεια. Το όριο ποσοτικοποίησης εξαρτάται από τον αναλύτη, το υπόστρωμα και τον ανιχνευτή. Για τον προσδιορισμό του ορίου ποσοτικοποίησης κυρίως προσεγγίζεται η συγκέντρωση του αναλύτη για την οποία ο λόγος σήμα προς θόρυβο (signal/noise, S/N) είναι 10:1.

- **Ευαισθησία (sensitivity):** Η ευαισθησία ορίζεται ως η μεταβολή της απόκρισης του ανιχνευτή για μεταβολή της ποσότητας του δείγματος ίση με τη μονάδα. Η ευαισθησία δείχνει τη μικρότερη ποσότητα που μπορεί να ανιχνευθεί και ορίζεται με το όριο ανίχνευσης (LOD). Σε μια χρωματογραφική καμπύλη δεν είναι δυνατή η ανίχνευση μέχρι του σημείου εκείνου, όπου ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο του οργάνου είναι ίσος με το 2. Πρακτικά όμως θα είναι αντικειμενικότερο και περισσότερο ρεαλιστικό να θεωρείται ως το όριο ανίχνευσης η ποσότητα εκείνη του συστατικού που δίνει ένα σήμα τριπλάσιο από το θόρυβο του σήματος $S/N=3$. Ως όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) ορίζεται η ποσότητα εκείνη του συστατικού που δίνει ένα σήμα δεκαπλάσιο από το θόρυβο του σήματος $S/N=10$. Η ευαισθησία για τις αναλύσεις υπολειμμάτων καθορίζεται από τη σχέση που έχει ορίσει η Ε.Ε. μεταξύ του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ) και των ανωτάτων αποδεκτών ορίων (MRLs) προκειμένου μία μέθοδος, από αυτές που προτείνονται, να θεωρείται ότι διαθέτει ικανοποιητική ευαισθησία.

- **Ειδίκευση-εκλεκτικότητα (specificity-selectivity):** Ειδίκευση είναι η ικανότητα του ανιχνευτή να παρέχει σήμα, που να προσδιορίζει την ταυτότητα του αναλυτή. Εκλεκτικότητα είναι η ικανότητα της μεθόδου (συμπεριλαμβάνοντας τα στάδια της προκατεργασίας και καθαρισμού δείγματος) να παρέχει στον ανιχνευτή την ικανότητα να διαχωρίσει την προσδιοριζόμενη ουσία σε μίγματα ή σε υποστρώματα χωρίς παρεμποδίσεις από άλλες ενώσεις με παρόμοια συμπεριφορά από άλλα συστατικά του υποστρώματος. Ιδανικός είναι εκείνος ο ανιχνευτής ο οποίος ανιχνεύει μόνο το συστατικό που μας ενδιαφέρει και τίποτα παραπάνω από τα συστατικά του δείγματος.

- **Ορθότητα-ανακτήσεις (trueness-recovery):** Η ορθότητα αναφέρεται στη διαφορά (σφάλμα) μεταξύ της μέσης τιμής μιας σειράς μετρήσεων και της αληθούς τιμής της μετρούμενης ποσότητας. Ο όρος ορθότητα ή τυπικό σφάλμα αντικαθίσταται με αυτόν της ανάκτησης, εφαρμόζοντας τη μέθοδο σε δείγματα

μάρτυρα, τα οποία δεν περιέχουν τον αναλύτη και τα οποία έχουν εμβολιαστεί τεχνητά με γνωστές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Χρησιμοποιούνται διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης εμβολιασμού ώστε να καλύπτουν την υπό μελέτη περιοχή. Συνήθως ένα σημαντικό επίπεδο εμβολιασμού είναι το όριο ποσοτικοποίησης και ένα άλλο το μέγιστο όριο υπολείμματος (MRL). Για κάθε τάξη μεγέθους επίπεδου εμβολιασμού απαιτούνται 2 ως 3 επίπεδα μελέτης. Οι εμβολιασμοί σε κάθε επίπεδο γίνονται σε ορισμένες επαναλήψεις (5 ως 6) και υπολογίζεται η μέση τιμή των ανακτήσεων και η σχετική τυπική απόκλιση τους. Σε περιπτώσεις όπου δεν είναι δυνατή η ανεύρεση μάρτυρα ή αν ο μάρτυρας περιέχει παρεμποδίζουσες κορυφές, το μικρότερο επίπεδο εμβολιασμού πρέπει να είναι τουλάχιστον 5 φορές μεγαλύτερο από το επίπεδο των παρεμποδίζουσών κορυφών. Για αναλύσεις υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, η Ε.Ε. αναφέρει ως αποδεκτές μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις από 70% μέχρι 120% για όλες τις προσδιοριζόμενες ενώσεις σε κάθε επίπεδο εμβολιασμού. Παρ' όλα αυτά σε περιπτώσεις που ο στόχος αυτός δεν μπορεί να επιτευχθεί και δεν υπάρχει εναλλακτική μέθοδος, μπορούν να γίνουν αποδεκτές μικρότερες τιμές ανάκτησης, που όμως πρέπει να συνοδεύονται από ικανοποιητικά στοιχεία ακρίβειας.

- **Πιστότητα (precision):** Η εκτίμηση της πιστότητας αναφέρεται στην εγγύτητα των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό καθορισμένες συνθήκες. Η πιστότητα εκτιμάται με την επαναληψιμότητα, η οποία είναι το μέτρο της διασποράς μιας σειράς μετρήσεων μεταξύ τους και εκφράζεται με κάποιο στατιστικό μέτρο της διασποράς π.χ. με την τυπική απόκλιση (s), που έχει τις μονάδες των επιμέρους αποτελεσμάτων (π.χ. mg/L, mg/kg, κλπ.) ή με τη σχετική τυπική απόκλιση (RSD %) ή με το συντελεστή μεταβλητότητας (CV %), που είναι καθαρός αριθμός. Η πιστότητα έχει άλλη μια συνιστώσα, την αναπαραγωγιμότητα. Ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα είναι το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες δηλαδή, ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα. Οι αποδεκτές από την ΕΕ τιμές επαναληψιμότητας είναι $RSD \leq 20\%$. Αναπαραγωγιμότητα είναι το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες δηλαδή, διαφορετικός αναλυτής ή διαφορετικές συσκευές ή σε βάθος χρόνου. Η αναπαραγωγιμότητα διακρίνεται σε ενδοεργαστηριακή (ίδιο εργαστήριο) ή διεργαστηριακή (διαφορετικά εργαστήρια).

Σχετικά με την επαναληψιμότητα αναφέρονται και οι παρακάτω όροι:

ενδιάμεση επαναληψιμότητα ή εντός προσδιορισμού δείγματος επαναληψιμότητα, που αναφέρεται στην επαναληψιμότητα σειράς μετρήσεων του ίδιου διαλύματος εργασίας και εκφράζει το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων του σταδίου μέτρησης της αναλυτικής παραμέτρου και η μεταξύ προσδιορισμών επαναληψιμότητα, που αναφέρεται σε σειρά προσδιορισμών διαφορετικών τμημάτων του ίδιου δείγματος, στα οποία εφαρμόζονται όλα τα στάδια της αναλυτικής μεθόδου

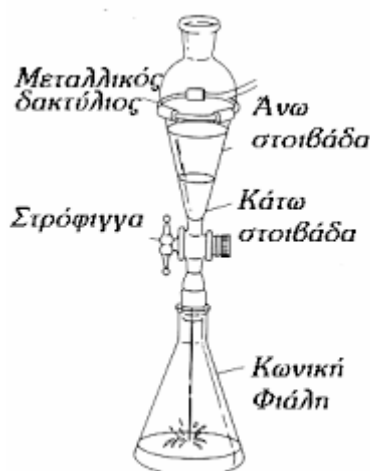
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΟΙΝΟΥΣ

3.1 Μεθοδολογίες εκχύλισης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε οινικά προϊόντα

3.1.1 Υγρή-υγρή εκχύλιση (LIQUID-LIQUID EXTRACTION- LLE)

Για πολλά χρόνια στο επιστημονικό πεδίο της αναλυτικής χημείας η υπό εξέταση τεχνική μνημονευόταν ως την πλέον δημοφιλή τεχνική επεξεργασίας δείγματος.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού συνιστάται στην απομάκρυνση οργανικών ενώσεων με εκχύλιση, με διαλύτη ή ανάμιξη με το υπόστρωμα του δείγματος και στηρίζεται στις σχετικές διαλυτότητες του συστατικού ανάμεσα στο διαλύτη εκχύλισης και στο υπόστρωμα του δείγματος (Σχήμα 3.1).



Σχήμα 3.1: Σχηματική Αναπαράσταση της Υγής-Υγής Εκχύλισης (http://www.eng.auth.gr/~chemtech/foititika/fd/ekxylisi/chap05_ekxylish.pdf.)

Σύμφωνα με την πρόσφατη βιβλιογραφική έρευνα των Grimalt, and Dehouck (2016), η LLE μέθοδος κατατάσσεται κυρίως στις εναλλακτικές τεχνικές καθαρισμού για τα σταφύλια και υποπροϊόντα τους (Πίνακας 3.1) Οι ερευνητές αποδίδουν το γεγονός αυτό στο ότι σε συγκεκριμένες μεθόδους οι διαλύτες κρίνονται ως κατάλληλοι ακόμα και για εξειδικευμένα φυτοφάρμακα που πρέπει να ταυτοποιηθούν. Ορισμένες μέθοδοι βασίζονται σε μίγμα ακετόνης: διχλωρομεθάνιο

(Navarro et al., 2000). Επιπροσθέτως άλλες μέθοδοι βασίζονται σε άλλα μίγματα διαλυτών όπως οξικό αιθυλεστέρα σε συνδυασμό με εξάνιο (de Melo Abreu et al, 2006) και διχλωρομεθάνιο ή ακετόνη, ακετόνη σε συνδυασμό με εξάνιο, και κυκλοεξάνιο σε συνδυασμό με διχλωρομεθάνιο (González-Rodríguez, et al., Rose et al., 2009). Σε ορισμένες περιπτώσεις, τα άλατα όπως το άνυδρο θειικό νάτριο ή χλωριούχο νάτριο προστίθενται για να αυξηθεί η ανάκτηση των φυτοφαρμάκων.

Πίνακας 3.1 : Συνοπτική παρουσίαση των δημοσιευμένων ειδικών μεθόδων για την ανάλυση των φυτοφαρμάκων στα σταφύλια και τα παράγωγα προϊόντα. του Η ανάκτηση εκφράζεται σε ποσοστό μεταξύ της θεωρητικής τιμής και της πειραματικής. Η Επαναληψιμότητα εκφράζεται ως σχετικό ποσοστό της τυπικής απόκλισης. (Grimalt, and Dehouck, 2016).

Number of analytes	Matrix	Sample treatment	Determination technique	Trueness (mg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%)	Sensitivity LOD (mg/kg) 10^{-3}
12 multiclass fungicides	Grape Must Wine	- SLE ⁽¹⁾ : 5g/50 mL sample + 30 mL acetone:dichloromethane (1:1 v/v) + 2g NaCl (Probe blender) - Dryness evaporation + 5 mL isooctane-toluene (1:1, v/v)	GC-ECD GC-NPD GC-EL-MS (Q)	0.01-0.5	78-107	17.5-0.6	0.77-5.16
15 multiclass pesticides	Skin/Whole grape	- SLE: 100-25g sample + 100-25 mL methanol - Dryness evaporation and dilution in 25 mL water:methanol (88:12 v/v) - SPE: 500 mg C ₈ , elution mixtures dichloromethane:methanol - Dryness evaporation and dissolved in 500 μL water:methanol (45:55, v/v)	LC-DAD	-	30.7-79.4	19.2-39.4	1.7 average
12 botanical insecticides	Grape	- SLE: 5g sample + 10 mL acetonitrile + 4g NaCl + 1g MgSO ₄	LC-DAD LC-APCI-MS	0.01-5	73-115	0.1-12.2	0.1-0.01
6 multiclass fungicides	Grape Wine	- SLE/ILE: 5g/5 mL + 10 mL ethyl acetate:hexane (1:1 v/v) - Dryness evaporation of 1 mL and dissolved with 1 mL of methanol:water (80:20 v/v) for LC and 0.5 mL of Ethyl acetate:hexane (1:1 v/v)	LC-DAD GC-MS(Q)	0.25-2.00	96-105	6-12	0.1-0.3
10 multiclass pesticides	Grape	- SLE: 50g sample + 100 mL ethyl acetate + 75g Na ₂ SO ₄ - Dryness evaporation of 2 mL aliquot and dissolved with 0.45 mL methanol	LC-MS/MS (QqQ)	0.01-0.1	78-104	6-15	5-10

Number of analytes	Matrix	Sample treatment	Determination technique	Trueness (mg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%)	Sensitivity LOD (mg/kg) 10 ⁻³
3 multiclass fungicides	Grape Wine	- SLE: 10g/10 mL sample + 10 mL cyclohexane:dichloromethane (9:1, v/v). - Dryness evaporation aliquot 5 mL, dissolution to 1 mL cyclohexane	GC-NPD GC-ECD GC-MS/MS (IT)	0.05-2.0	81-102	3-12	5-50 GC-ECD; 10-100 GC-NPD
8 organophosphorus pesticides	Grape juice	- Dilution juice: 10 mL sample + 10 mL MilliQ water, pH adjustment 6.0 with NaOH 1.0M - SPE: 40 mg MWCNTs; elution 20 mL dichloromethane - Dryness evaporation, dissolution 1 mL cyclohexane + Na ₂ SO ₄ ; filtration PTFE	GC-NPD	0.15-1.35	75-103	1.9-6.3	1.85-7.32
18 multiclass pesticides	Grape Must Wine Vinegard	- SLE: 10 g sample + 10 mL methanol (UAE) - SBSE: 20 mm x 0.5 mm PDMS 1000 rpm 25 °C 150 min	GC-MS (Q)		72-122	3-20	6.7-40.0
27 multiclass pesticides	Grape Must Wine	- QuEChERS: 10 g sample + 10 mL acetonitrile + 4 g MgSO ₄ + 1 g NaCl manual shaking and centrifugation - dSPE: 1 mL aliquot extract + 150 mg MgSO ₄ + 50 mg PSA + 50 mg C ₁₈	LP-GC-MS (Q)	0.04-5	57-120; 63-120; 52-121	5-20; 3-17; 3-18	1.0-12.5; 1.2-14.0; 1.3-19 ng/g
11 fungicides	White/Red Grape White/Red Wine	- SLE: 15 g/15 mL sample + 15 mL ethyl acetate: hexane (1:1 v/v) Ultrasound bath 10 min. + 1 g NaCl + 5 g Na ₂ SO ₄ - Dryness evaporation 12 mL aliquot dissolution 3 mL acetonitrile - SPE: envi Carb -II/PSA, elution 20 mL acetonitrile:toluene (3:1 v/v) - Dryness evaporation dissolution 0.5 mL acetone + protectants	GC-MS (IT)	0.05-0.5	76-147	2-16	<1-24

Τα βασικότερα μειονεκτήματα του εγκεκριμένου τρόπου εκχύλισης παρουσιάζονται συγκεντρωτικά στο σχήμα 3.2 (Στράτης και συν., 2000).



Σχήμα 3.2: Βασικά μειονεκτήματα της τεχνικής LLE

Λόγω των ανωτέρων μειονεκτημάτων, οι Hyötyläinen et al (2002) προτείνουν μια διαφορετική μεθοδολογία την «microporous membrane liquid-liquid extraction (MMLLE)» η οποία συνδυάζεται με την αέρια χρωματογραφία για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων εντομοκτόνων σε ερυθρούς οίνους, Σήμερα, στον κλάδο του ποιοτικού ελέγχου των τροφίμων όσο και των υδάτινων οι πιο βελτιωμένες τεχνικές της LLE (τεχνικές μικροεκχύλισης υγρής φάσης) εφαρμόζονται για τη χημική ανάλυση υπολειμμάτων οργανικών ενώσεων (π.χ φυτοφαρμάκων) τόσο σε δείγματα τροφίμων (Xia et al., 2006, Fu et al., 2009) όσο και για την ποιοτική αξιολόγηση δειγμάτων νερού (Chiton et al., 1993).

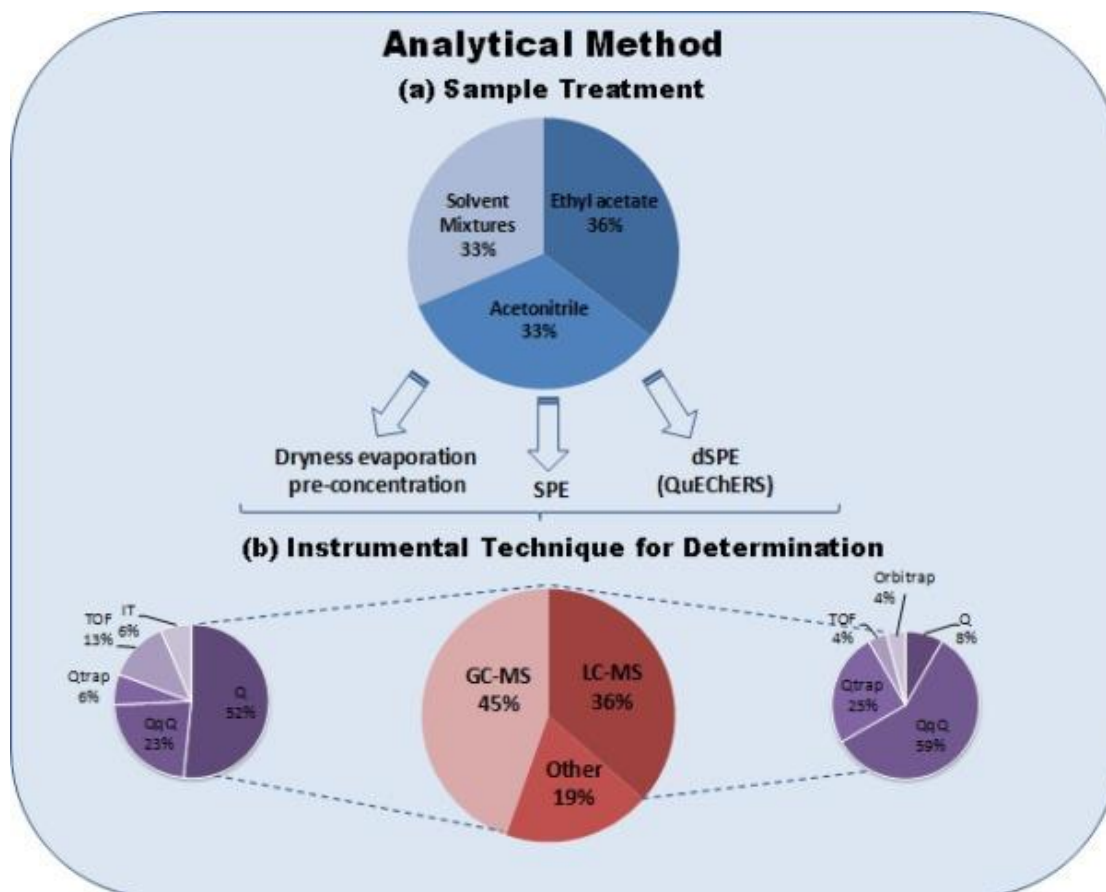
3.1.2 Υγρή στερεή εκχύλιση (SOLID PHASE EXTRACTION-SPE)

Η συγκεκριμένη τεχνική αναπτύχθηκε στα μέσα της δεκαετίας του '70 και αποτελεί ουσιαστικά μια μικρογραφία της χρωματογραφίας στήλης, η οποία χρησιμοποιεί μικροστήλες με προσροφητικό υλικό κατασκευασμένες από πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο ή γυαλί.

Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της SPE η οποία αντικατέστησε ουσιαστικά την εκχύλιση υγρού-υγρού είναι τα παρακάτω (Στράτης και συν.2000):

- Επιτυγχάνεται μεγάλο ποσοστό ανάκτησης της ένωσης που μας ενδιαφέρει και σε υψηλή καθαρότητα.
- Απαιτούνται μικροί χρόνοι προκατεργασίας.
- Δεν σχηματίζονται γαλακτώματα.
- Υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης της μεθόδου, η οποία συνεπάγεται μεγαλύτερη ταχύτητα, καλύτερη επαναληψιμότητα και ταυτόχρονη κατεργασία πολλών δειγμάτων.
- Απαιτείται μικρή ποσότητα διαλύτη και επιτυγχάνεται μεγάλη προσυγκέντρωση.
- Υπάρχει δυνατότητα εκλεκτικής παραλαβής συγκεκριμένων ενώσεων από υπόστρωμα ποικίλης σύστασης.

Λόγω των ανώτερων πλεονεκτημάτων αντιπροσωπεύει το 33% των εφαρμοζόμενων ειδικών τεχνικών στον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων (Εικόνα 3.1)



Εικόνα 3.1: Συνοπτική παρουσίαση των αναλυτικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων (υπολείμματα φυτοφαρμάκων) : (α) επεξεργασία του δείγματος και, (β) ενόργανες τεχνικές για ανάλυση. (Grimalt, and Dehouck, 2016).

Οι Economou et al (2009) συνιστούν την εφαρμογή της SPE με φυσίγγια Oasis HLB που συνδυάζει καλύτερη απομόνωση των παρασιτοκτόνων και απορρύπανση του υπό εξέταση δείγματος σε ένα μόνο βήμα (Economou et al 2009). Σύμφωνα με τους ερευνητές η ανώτερη τεχνική διαπιστώθηκε αποτελεσματική στην εφαρμογή της σε 60 δείγματα οίνων . Τα φυτοφάρμακα τα οποία ανιχνεύθηκαν με την ανώτερη τεχνική ήταν τα εξής: carbendazim-benomyl, thiophanate-methyl and carbaryl.

ο Tuzimski (2012) σε πρόσφατη δημοσίευση του κατά την εφαρμογή της SPE χρησιμοποίησε τα εξής:

- Bakerbond Octadecyl C18 Polar Plus SPE columns (3000mg=6mL) C18=SDB-1 [C18 500mg on the top; styrene divinylbenzene copolymer (SDB) 200mg on bottom=6mL),
- Baker SPE-12G SPE chamber (J.T. Baker, Philipsburg, USA)
- Ειδικότερα οι SPE στήλες καθαρίστηκαν με διάλυμα μεθανόλης (3*2mL) και μετά με απιονισμένο νερό (3*2mL). Για την ανάλυση των φυτοφαρμάκων, οινικά δείγματα αραιώμενα 3:1, μεταφέρθηκαν σε C18 ή C18=SDB-1 SPE σωλήνες. Αφού οι σωλήνες γέμισαν με τα υπό εξέταση οινικά δείγματα (200mL, ρυθμός ροής 7.5–10mL min, πίεση 75–85mm Hg), εν συνεχεία οι στήλες (C18 or C18=SDB-1) ξηράθηκαν 2λεπτά και εν συνεχεία εκλούστηκαν με 10mL μεθανόλης

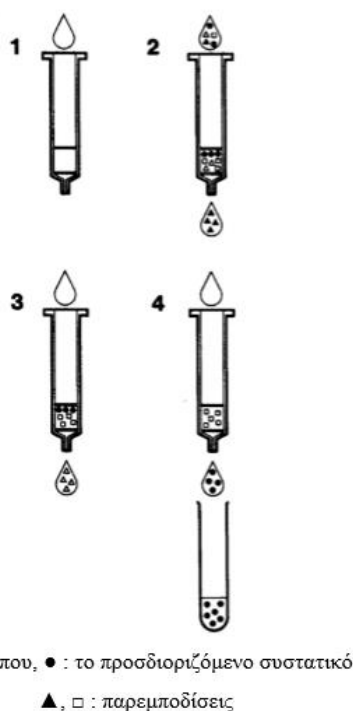
Ως βασικό μειονέκτημα της εκχύλισης στερεάς φάσης-υγρού είναι το γεγονός ότι έχει υψηλό υπόβαθρο εάν πρόκειται να χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με GC ή GC/MS. Το δυσκολότερο στάδιο στη συγκεκριμένη τεχνική εκχύλισης είναι η επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού, ανάλογα με το υπό εξέταση δείγμα. Ο τύπος και η ποσότητα του προσροφητικού υλικού το οποίο επιλέγεται, εξαρτάται από τη διαλυτότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων στους διάφορους διαλύτες, την πολικότητά τους, την φύση του υποστρώματος του δείγματος, καθώς και τη συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων μέσα σ' αυτό.

Παράλληλα η επιλογή του διαλύτη γίνεται με τέτοιο τρόπο, ούτως ώστε να απομακρύνονται από το δείγμα όσο το δυνατόν περισσότερες παρεμποδίσεις, ενώ ταυτόχρονα να εξασφαλίζεται η μέγιστη δυνατή ανάκτηση για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.

Γενικά επιλέγονται πολικοί διαλύτες όταν χρησιμοποιούνται μη πολικές στατικές φάσεις και αντίστροφα. Συνοπτικά τα στάδια τα οποία ακολουθούνται στην εκχύλιση στερεάς φάσης-υγρού αποδίδονται γραφικά στο σχήμα 3.2 και είναι τα παρακάτω:

- ✓ Ενεργοποίηση του προσροφητικού με τη βοήθεια ενός διαλύτη (CH₃OH, CH₃CN, H₂O, κ.α.)
- ✓ Εισαγωγή του δείγματος
- ✓ Πλύση του προσροφητικού υλικού με μια σειρά διαφορετικών διαλυτών για την απομάκρυνση των ενώσεων που παρεμποδίζουν

- ✓ Παραλαβή των ενώσεων που ενδιαφέρουν με κατάλληλο διαλύτη έκλουσης. Ο μηχανισμός συγκράτησης των ενώσεων στο προσροφητικό υλικό, είναι ο ίδιος με εκείνο της υγρής χρωματογραφίας. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενώσεων, στατικής φάσης και διαλυτών βασίζονται σε δυνάμεις vanderWaals (διπόλουδιπόλου, δεσμών υδρογόνου), ηλεκτροστατικής φύσεων και συνδυασμών μεταξύ τους (Wells and Yu, 2000).



Σχήμα 3.2 :Στάδια της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (1.Ενεργοποίηση στήλης 2. Εισαγωγή του δείγματος 3. Έκπλυση της στήλης 4. Έκλουση του αναλυτή).

3.1.3 Μικροεκχύλιση δια της στερεής φάσης (SOLID PHASE MICROEXTRACTION -SPME)

Η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιεί μια ειδική ίνα μήκους λίγων εκατοστών, και μικρής διαμέτρου, από τηγμένο πυρίτιο επιστρωμένο με πολυμερές, προσαρμοσμένο σε μικροσύριγγα. Η διάταξη της ίνας αποτελείται από ένα εξωτερικό προστατευτικό περίβλημα, βελόνα και μια εσωτερική βελόνα στην άκρη της οποίας τοποθετείται εποξική κόλλα. Η διεργασία ελέγχεται από τη διάχυση των συστατικών από το περιβάλλον διάλυμα μέσω λεπτής στατικής, υδατικής στοιβάδας γύρω από την ίνα. Αποκαθίσταται ισορροπία και επειδή οι μη πολικές οργανικές ενώσεις έχουν

μεγάλο συντελεστή κατανομής στη μη πολική ίνα επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις των συστατικών.

Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της συγκεκριμένης τεχνικής, πέρα από το ότι δε χρησιμοποιεί διαλύτη και δεν απαιτεί τη χρήση πολύπλοκων συσκευών είναι ότι μπορεί να εφαρμοστεί τόσο για πτητικές όσο και για μη πτητικές ενώσεις σε υγρά και αέρια δείγματα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, ενώ παράλληλα μπορεί και να αυτοματοποιηθεί. Παράλληλα ο χρόνος ανάλυσης μειώνεται σημαντικά, ενώ ελαχιστοποιείται και η πιθανότητα σφαλμάτων λόγω κακού χειρισμού των δειγμάτων (Pawlisyzon, 2002).

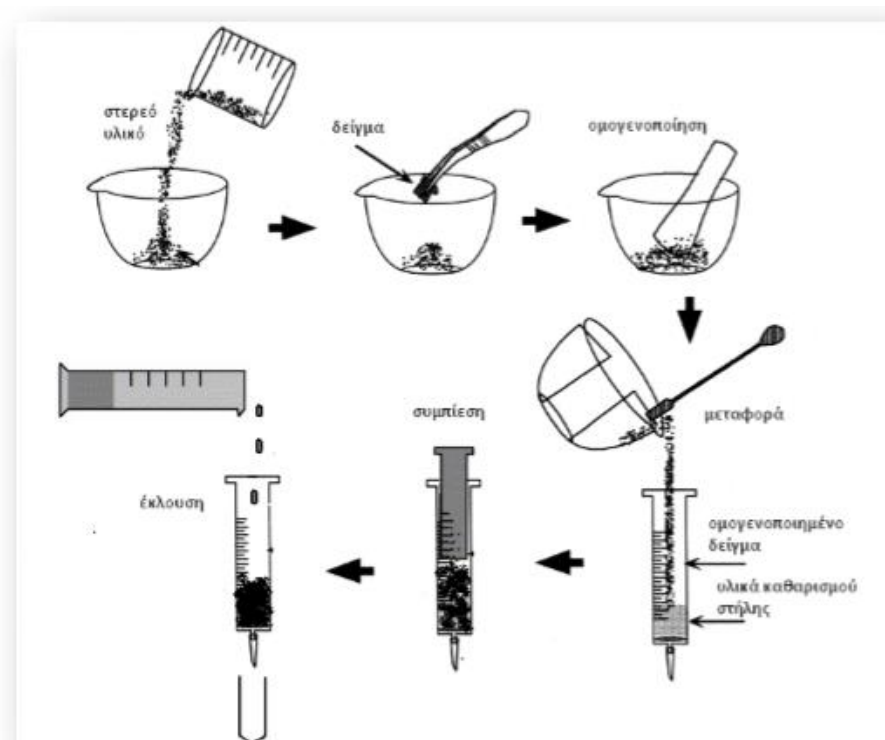
Σύμφωνα με τους Zambonin et al (2003), η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία για τον ποιοτικό έλεγχο των τροφίμων. Πιο συγκεκριμένα οι ανωτέρω ερευνητές την εφάρμοσαν για την ανίχνευση επιβλαβών ουσιών (φυτοφάρμακα) στο κρασί και σε χυμούς φρούτων. Παρόμοιες έρευνες έχουν λάβει χώρα από τους Lambropoulou and Albanis (2003) σε φρούτα και από τους Tsoutsis et al. (2006) στο ελαιόλαδο.

Οι Ravelo-Pérez et al (2008) χρησιμοποίησαν την τεχνική της SPME σε συνδυασμό με τη μικκυλιακή ηλεκτροκινητική χρωματογραφία (MEKC) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 11 υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (pirimicarb, metalaxyl, pyrimethanil, procymidone, nuarimol, azoxystrobin, tebufenozide, fenarimol, benalaxyl, penconazole and tetradifon) σε ερυθρούς οίνους. Τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα υπό εξέταση δείγματα προσυμπυκνώθηκαν με SPME χρησιμοποιώντας πολυ (διμεθυλοσιλοξάνης) / διβινυλοβενζόλιο (PDMS / DVB) ίνες και την έγχυση μεγάλων όγκων δείγματος στο τριχοειδή ηλεκτρόδιο αντίστροφης πολικότητας (REPSM). Με το συνδυασμό των δύο διαδικασιών προσδιορίστηκαν τελικά 10 από τα 11 φυτοφάρμακα στους υπό εξέταση ερυθρούς οίνους. Τα επίπεδα των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων κυμαίνονταν μεταξύ 0,049 και 1,69 mg / L (δηλαδή, επίπεδα πολύ κάτω από το MLO εκτός από το pirimicarb).

3.1.4 Εκχύλιση στερεής φάσης με διασπορά, MSPD (MATRIX SOLID PHASE DISPERSION)

Η MSPD είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική τελική η οποία αναπτύχθηκε πρώτη φορά το 1989 (Barker et al 1989, Kristenson et al. 2006), Αυτή επιτρέπει την εκχύλιση φυτοφαρμάκων από ομογενοποιημένο δείγμα τροφίμου το οποίο βρίσκεται σε διασπορά πάνω σε ένα φέρον στερεό όπως το συνθετικό πυρετικό άλας του μαγνησίου (Florisol) ή οξείδιο του πυριτίου (Bogialli and DiCorda, 2007).

Το ομογενοποιημένο δείγμα τοποθετείται σε μια στήλη και τα φυτοφάρμακα εκκλύονται εκλεκτικά με οργανικούς διαλύτες (Σχήμα 3.3). Με αυτό τον τρόπο, η εκχύλιση του δείγματος και ο καθαρισμός του εκχυλίσματος επιτυγχάνονται ταυτόχρονα με καλή επαναληψιμότητα και ανάκτηση. Επιπρόσθετα, τόσο ο χρόνος ανάλυσης όσο και το ποσοστό του οργανικού διαλύτη μειώνονται.



Σχήμα 3.3: Απεικόνιση της εκχύλισης στερεής φάσης με διασπορά

Εφαρμογές της τεχνικής αυτής περιλαμβάνουν την εκχύλιση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων από φρούτα και λαχανικά (Fernandez et al., 2000) γάλα (Muccio et al., 1996) αυγά (Valsamaki et al., 2006) και ψάρια (Carro et al. 2005). Σε πολλές

περιπτώσεις χρησιμοποιείται και για την απομάκρυνση του λίπους όπως στην περίπτωση του προσδιορισμού φυτοφαρμάκων σε καρπό ελιάς και ελαιόλαδο (Ferrer et al, 2005). Επιπροσθέτως, οι Grimalt and Dehouck (2016), υποστηρίζουν ότι η μέθοδος DSPE χρησιμοποιείται κυρίως για τον καθαρισμό των δειγμάτων (Εικ. 3.1). Περισσότερο από το ήμισυ των πολυ-υπολειμματικών μεθόδων που παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.2 επιλέγουν την MSPD ως μια “clean-up” τεχνική.

Πίνακας 3.2. Συνοπτική παρουσίαση των δημοσιευμένων πολύ-υπολειμματικών μεθόδων για την ανάλυση των φυτοφαρμάκων στα σταφύλια. Η ανάκτηση εκφράζεται σε ποσοστό μεταξύ της θεωρητικής τιμής και της πειραματικής. Η Επαναληψιμότητα εκφράζεται ως σχετικό ποσοστό της τυπικής απόκλισης (Grimalt, and Dehouck, 2016).

Number of analytes	Sample treatment	Determination technique	Trueness (mg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%)	Sensitivity LOD (mg/kg) 10^{-3}
38	- SLE: 8 g sample + 50 mL ethyl acetate + 70 g Na ₂ SO ₄ + 2 g NaHCO ₃ - Low volume evaporation: 2 × (10 mL methanol to 2 mL final volume)	LC-ESI-MS/MS (QqQ)	0.01–0.8	73–92	4.5–17.7	1 ^a
57	- SLE: 75 g sample + 200 mL ethyl acetate + 40 g Na ₂ SO ₄ + (NaOH for acid matrices) - Dryness evaporation of aliquot and dissolved in methanol	LC-ESI-MS/MS (QqQ)	0.01–0.5	44–118	3–30	1 ^a
74	- SLE: 20 g sample + 10 mL water + pH adjustment 6–7 + 40 mL ethyl acetate - Dryness evaporation aliquot of 5 mL and dissolved in 1 mL methanol	LC-ESI-MS/MS (QqQ)	0.01–1	63–158	3–31	1 ^a
446	- SLE: 20 g sample + 40 mL acetonitrile + 5 g NaCl - SPE: Envi-18 elution acetoni-	GC-MS (Q) LC-ESI-MS/MS (QqQ)	0.01–3.00	55–134	2.1–39.1	0.5–25 (LOD)

309	<ul style="list-style-type: none"> - SLE: 75 g sample + 200 mL ethyl acetate + 15 g NaHCO₃ + 40 g Na₂SO₄ - Dryness evaporation 100 mL and dissolve in 5 mL ethyl acetate: cyclohexane (1:1 v/v) - Dilute 5 times with ethyl acetate: cyclohexane (1:1 v/v) for GC - Dryness evaporation aliquot 0.5 mL and dissolve to 1.5 mL methanol for LC 	GC-MS/MS (QqQ) LC-ESI-MS/MS (QTrap)	0.01-0.05	57-122	2-30	1 ^a
-----	--	--	-----------	--------	------	----------------

Number of analytes	Sample treatment	Determination technique	Trueness (mg/kg)	Recovery (%)	Repeatability (%)	Sensitivity LOD (mg/kg) 10 ⁻³	
82	<ul style="list-style-type: none"> - SLE: 10 g sample + 10 mL ethyl acetate + 10 g Na₂SO₄ - dSPE: aliquot 5 mL + 25 mg PSA - Clean aliquot of 4 mL + 200 µL 10% diethylene glycol in methanol - Dryness evaporation and dissolution in 2 mL methanol:water 0.1% acetic acid 1:1 v/v 	LC-MS/MS (QTrap)	0.0025-0.05	36.5-120.5	0.3-19	0.1-3.3	
341	<ul style="list-style-type: none"> - SLE: 25 g sample + 40 mL ethyl acetate + 25 g Na₂SO₄ - For GC, DSPE: 0.8 mL extract sample + 0.2 mL toluene + 25 mg PSA + 25 mg GCB - For LC, dryness evaporation in 10% diethylene glycol and dissolution in methanol. Dilution 1:1 mobile phase 	GC-MS (Q) LC-ESI-MS/MS (QqQ)	0.001-0.5	60-140	15-30	1 for most pesticides	
171	<ul style="list-style-type: none"> - SLE: 15-7.5 g sample + 30 mL acetone + 30 mL dichloromethane + 30 mL light petroleum (+Na₂SO₄) - Dryness evaporation 1.1 mL aliquot, dissolution 1.0 mL methanol 0.02% acetic acid 	LC-MS/MS (QqQ)	0.01-0.1	21-114	1-50	≤10 ^a	
80	<ul style="list-style-type: none"> - QuEChERS: 10 g sample + 10 mL acetonitrile + 4 g MgSO₄ + 1 g NaCl + 0.5 g disodiumhydrogen citrate sesquihydrate + 1 g trisodiumcitrate dehydrate - dSPE: aliquot extract + 150 mg MgSO₄ + 25 mg PSA/mL extract 	GC-MS/MS (QqQ) LC-MS/MS (QTrap)	0.005-0.2	60-127	0.2-16.7	10 ^a	

Παρά τα σαφή πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτή, σημαντικό είναι να σημειωθεί πως δεν μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί και είναι αρκετά χρονοβόρα σε περιπτώσεις ανάλυσης μεγάλου αριθμού δειγμάτων.

3.1.5 Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (Single drop microextraction, SDME)

Μια σημαντική μέθοδος που αναπτύχθηκε από την μικροεκχύλιση με διαλύτη είναι η μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (SDME), όπου το ρόλο του δέκτη έχει μια μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη, μη αναμίξιμου με το νερό, η οποία κρέμεται πάνω από υδατικό διάλυμα. Αυτό είναι το σύστημα δύο φάσεων. Όταν η μικροσταγόνα έρθει σε επαφή με το υδατικό δείγμα, οι οργανικές ενώσεις μεταφέρονται στην φάση του οργανικού και έτσι επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των ουσιών προς ανάλυση. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, το οποίο έχει καθοριστεί κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, η μικρο-σταγόνα αποσύρεται μέσα στην μικροσύριγγα και μεταφέρεται στον θάλαμο εισαγωγής δειγμάτων ενός GC ή HPLC για ανάλυση. Η τεχνική SDME, αν και είναι μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος εκχύλισης, ωστόσο σημαντικό μειονέκτημά της είναι η απαίτηση εκτεταμένων χρόνων δειγματοληψίας και μεγάλων ταχυτήτων ανάδευσης έχουν ως αποτέλεσμα πιθανή μετατόπιση και απώλεια της μικροσταγόνας (Lambropoulou and Albanis 2007). Στο τομέα των τροφίμων και ειδικότερα των οινικών προϊόντων, η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε από τους Garbi et al. (2010). Οι ερευνητές προσδιόρισαν τα υπολειμματικά επίπεδα των φυτοφαρμάκων (diazinon, dimethoate, chlorpyrifos, vinclozolin, fenthion, quinalphos) μετά από τον καθαρισμό τους με την τεχνική SDME

3.1.6 QuEChERS

Η εκχύλιση QuEChERS είναι η πιο πρόσφατη αναλυτική μεθοδολογία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών και η τεχνική της είναι ένας συνδυασμός παλαιότερων τεχνικών εκχύλισης. Οι Anastassiades κ.ά. το (2003) δημοσίευσαν μια εργασία στην οποία περιγράφουν μια μέθοδο απλή, γρήγορη, εύκολη, οικονομική και αποτελεσματική για την ταυτόχρονη ανίχνευση σημαντικού αριθμού ενώσεων σε φρούτα και λαχανικά. Η μέθοδος αυτή αποτελείται από δύο στάδια:

- Το πρώτο είναι η εκχύλιση/κατανομή των ενώσεων (extraction/partitioning) σε έναν οργανικό διαλύτη όπου στην περίπτωση αυτή είναι το ακετονιτρίλιο. Αρχικά ζυγίζονται 10g δείγματος (καλά ομογενοποιημένου) τα οποία τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 40ml. Στην συνέχεια προστίθενται 10ml ακετονιτρίλιο και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 1 λεπτό. Με γρήγορες κινήσεις ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός συσσωματωμάτων του $MgSO_4$ προστίθενται 4gr άνυδρου θειικού μαγνησίου ($MgSO_4$) και 1gr χλωριούχου νατρίου ($NaCl$). Ακολουθεί ανάδευση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 5000rpm για 5 λεπτά. Στο στάδιο αυτό επιτυγχάνεται η μεταφορά των υπό μελέτη ενώσεων καθώς και διάφορων συνεκχυλιζόμενων ουσιών στο ακετονιτρίλιο καθώς και ο διαχωρισμός των φάσεων με την βοήθεια των αλάτων που προστέθηκαν, όπως φαίνεται στην εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2: Δείγμα στο τέλος του πρώτου σταδίου της εκχύλισης QuEChERS

- το δεύτερο στάδιο είναι η εκχύλιση στερεής φάσης με διασπορά (dispersive SPE). Από το υπερκείμενο μεταφέρεται 1ml σε μικρό σωλήνα φυγοκέντρησης όγκου 1,5ml στο οποίο έχουν τοποθετηθεί 25mg προσροφητικού PSA και 150mg θειικού μαγνησίου ($MgSO_4$). Ακολουθεί έντονη ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκέντρηση για 1 λεπτό στις 6000rpm. Τέλος μεταφέρεται 0,5ml σε φιαλίδιο και ακολουθεί χρωματογραφική ανάλυση. Στο στάδιο αυτό απομακρύνεται όλη η υγρασία από το ακετονιτρίλιο με την βοήθεια του $MgSO_4$ ενώ οι συνεκχυλιζόμενες ενώσεις του υποστρώματος προσροφούνται στο PSA.

Οι Anastassiades et al. (2003) μελέτησαν πολλούς παράγοντες και έκαναν πολλές δοκιμές μέχρι να καταλήξουν στα συγκεκριμένα αντιδραστήρια καθώς και

στις ποσότητες αυτών τα οποία είναι απαραίτητα για την εκχύλιση. Χαρακτηριστικά μελέτησαν:

- τα πλεονεκτήματα, τα μειονεκτήματα και την εκλεκτικότητα τριών διαλυτών, του ακετονιτριλίου, της ακετόνης και του οξικού αιθυλεστέρα, τα οποία έχουν δώσει πολύ καλά αποτελέσματα σε πολύ — υπολειμματικές μεθόδους ανίχνευσης φυτοφαρμάκων για να καταλήξουν στο ακετονιτρίλιο,

- την ανακίνηση των δειγμάτων με το χέρι και την ανακίνηση μηχανικά (με blender) για να καταλήξουν πως η ανακίνηση με το χέρι είναι αποδεκτή για την εκχύλιση πολικών και μη πολικών παρασιτοκτόνων σε φρούτα και λαχανικά,

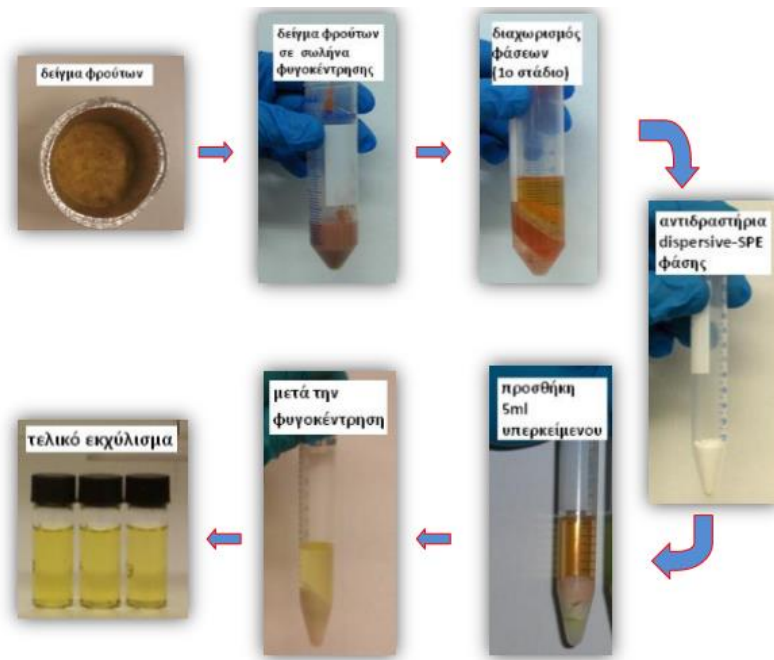
- διάφορα άλατα και διάφορους συνδυασμούς αυτών για τον διαχωρισμό των φάσεων στο πρώτο στάδιο της εκχύλισης, για να καταλήξουν στη χρήση $MgSO_4$ και $NaCl$ στις προαναφερθέντες ποσότητες,

- την επίδραση του pH στην εκχύλιση των παρασιτοκτόνων,

- την ξήρανση της φάσης του ακετονιτριλίου στο δεύτερο στάδιο της εκχύλισης, όπου επιτυγχάνεται πλήρης απομάκρυνση του νερού από τον διαλύτη με την βοήθεια του $MgSO_4$ και

- τα υλικά που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως προσροφητικά στο δεύτερο στάδιο της εκχύλισης για να καταλήξουν πως το κατάλληλο υλικό είναι το PSA (primary secondary amine)

Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζεται η διαδικασία εκχύλισης σε 10g δείγματος φρούτων όπου στο δεύτερο στάδιο έχουν μεταφερθεί πέντε 5ml υπερκείμενου με τις αντίστοιχες αναλογίες αντιδραστηρίων



Σχήμα 3.4: Διαδικασία εκχύλισης οίνων με την μέθοδο QuEChERS

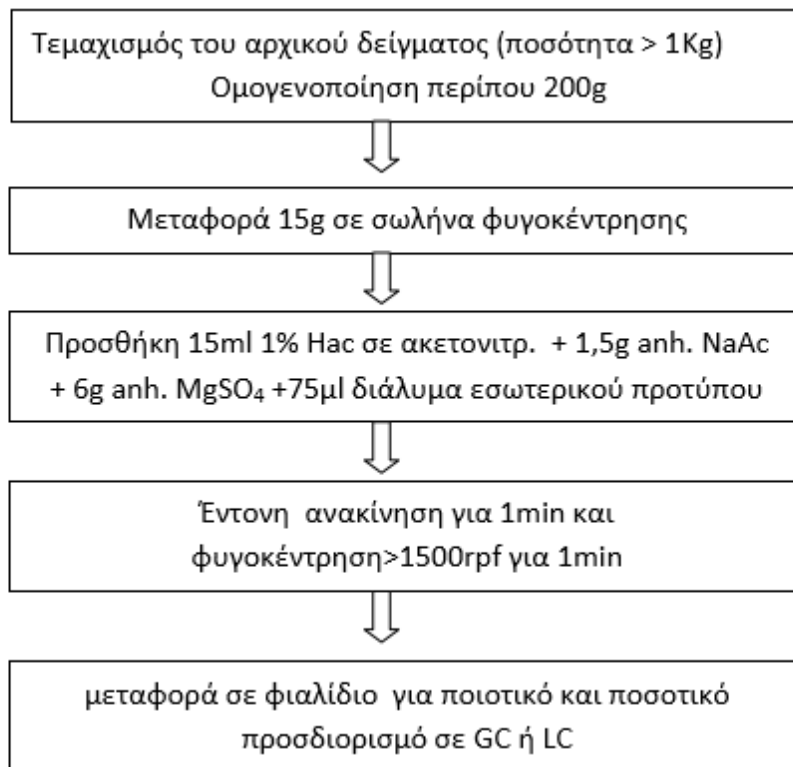
Το 2005 βελτιστοποίησαν ακόμη περισσότερο την μέθοδο και προτείνουν λύσεις για υποστρώματα πιο πολύπλοκα. Η πρώτη βελτιστοποίηση της μεθόδου είναι η ρύθμιση του pH και για τον λόγο αυτό χρησιμοποιούν στο στάδιο της προσθήκης του $MgSO_4$ και του $NaCl$ διάλυμα δύο ακόμη αντιδραστήρια, τα: trisodium citrate dihydrate και disodium hydrogencitrate sesquihydrate σε ποσότητες 1g και 0,5g αντίστοιχα. Για τον καλύτερο καθαρισμό του δείγματος προτείνεται η χρήση επιπλέον προσροφητικών στο στάδιο της dispersive — SPE όπως είναι:

- η χρήση του GCB (Graphitized Carbon Black) για δείγματα τα οποία είναι πλούσια σε χλωροφύλλη ή σε καροτενοειδή σε ποσότητες ανάλογες της παρουσίας αυτών των συνεκχυλιζόμενων ενώσεων και οι οποίες κυμαίνονται από 2,5mg έως 7,5mg ανά ml εκχυλίσματος και
- η χρήση αντίστροφης φάσης προσροφητικών υλικών C18 ή C8 για την απομάκρυνση του λίπους, η οποία θα μπορούσε να επιτευχθεί και με το πάγωμα είτε του εκχυλίσματος μετά την εκχύλιση/κατανομή είτε του τελικού εκχυλίσματος. (Anastassiades et al. 2003, QuEChERS 2005)

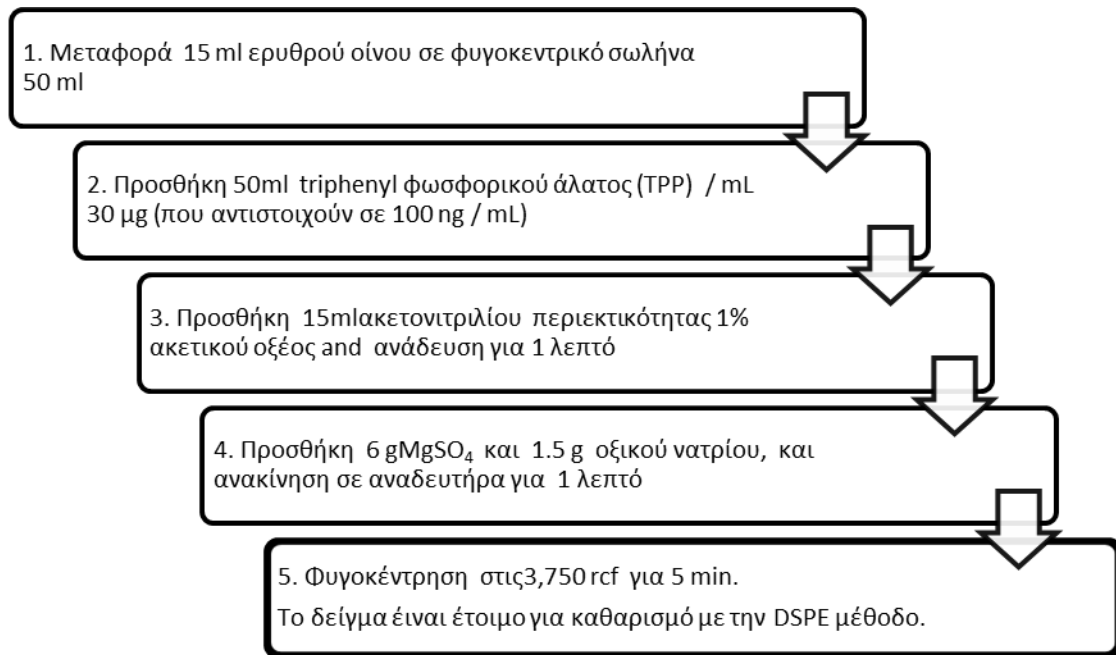
Η μέθοδος αυτή με το πέρασμα των χρόνων έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την

εκχύλιση ποικίλων παρασιτοκτόνων από ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων όπως τα φρούτα και τα λαχανικά (Lehotay et al. 2005)

Το 2007 η QuEChERS έγινε επίσημη μέθοδος για φρούτα, AOAC Official Method η οποία έχει κάποιες διαφοροποιήσεις συγκριτικά με την αρχική της μορφή. Τα βασικά στάδια της διαδικασίας που αναφέρεται στην μέθοδο είναι τα εξής: Αντίστοιχη μεθοδολογία για οινικά προϊόντα παρουσιάζονται στο σχήμα 3.5



Σχήμα 3.5: Πειραματική διαδικασία η QuEChERS για φρούτα



Σχήμα 3.6 Πειραματική διαδικασία η QuEChERS για οίνους (Oliver and Fischer 2010)

Οι Guo et al. (2016) τροποποίησαν την τεχνική QuEChERS για την εκχύλιση ερυθρών οίνων. Ειδικότερα, 10 mL ερυθρού οίνου μεταφέρθηκαν σε 50 mL φυγοκεντρικό σωλήνα και ανακινηθήκαν μαζί 10 mL ακετονιτριλίου σε μηχανικό αναδευτήρα για 30 s. Στο διάλυμα αυτό προστέθηκαν άλατα (χλωριούχο νάτριο 1 g, άνυδρο θειικό μαγνήσιο 4g, κιτρικό νάτριο 1 g, όξινο φωσφορικό δινάτριο 0.5 g και αναδεύτηκαν ξανά για 1 λεπτό. Εν συνέχεια το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στις 8000 rpm για 5 λεπτά. Ένα χιλιοστόλιτρο του υπερκείμενου μεταφέρθηκε σε 25 mg PSA- σωλήνα φυγοκέντρησης 2 ml, ανακοιμήθηκε για ca. 10 s και φυγοκεντρήθηκε <8000 rpm για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο διηθήθηκε μέσω 0,22 μm οργανικής μεμβράνης και μεταφέρθηκε σε 1.5 mL σωλήνα φυγοκέντρησης.

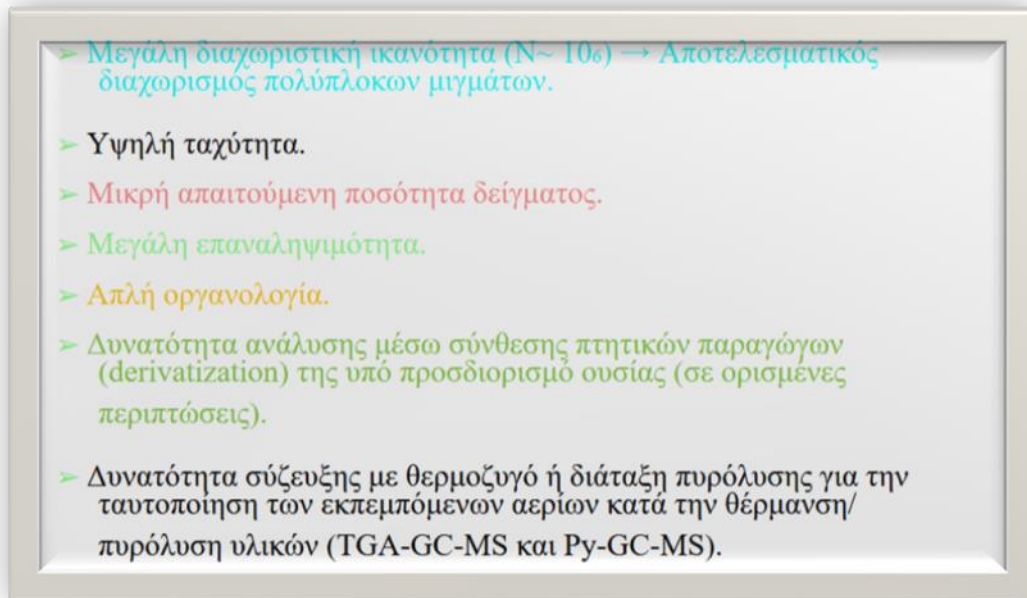
3.2 Μεθοδολογίες προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων

3.2.1 Αέρια χρωματογραφία (gas chromatography)

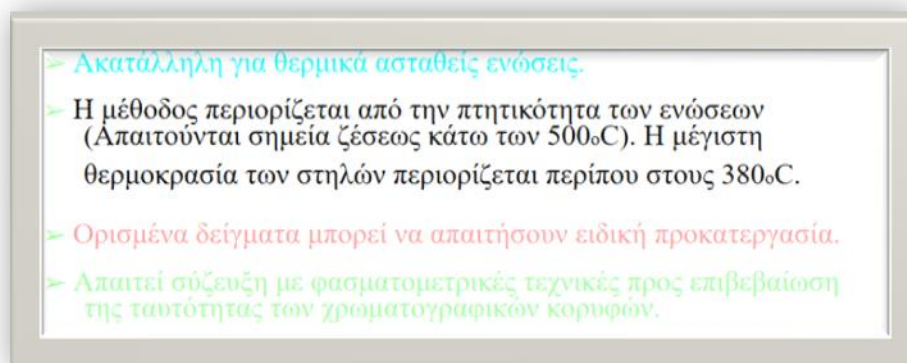
Η μέθοδος αυτή πρωτοεμφανίσθηκε το 1952 με τη χρησιμοποίηση μίας κινούμενης αέριας φάσης αντί της υγρής, με αξιοσημείωτα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (σχήμα 3.10 και 3.11 αντίστοιχα.)

Η αρχή της μεθόδου στηρίζεται στο ότι το δείγμα εξαερώνεται και μεταφέρεται από το φέρον αέριο (κινούμενη φάση) κατά μήκος μίας στήλης που περιέχει τη λεγόμενη «στατική» φάση. Αυτή μπορεί να αποτελείται από μία ουσία στερεά με προσροφητικές ιδιότητες οπότε πραγματοποιείται αέρια χρωματογραφία σε στερεά φάση (Gas-Solid Chromatography) ή πράγμα που συμβαίνει τις περισσότερες φορές, να υπάρχει μία ουσία στερεά εντελώς ανενεργή ως βάση και πάνω της ένας λεπτός υμένας υγρής φάσης. Τότε πραγματοποιείται αέρια χρωματογραφία σε υγρή - στερεά φάση (GasLiquid-Solid Chromatography). Η στερεά και υγρή φάση επιλέγεται ανάλογα με την ανάλυση που θέλει ο κάθε ερευνητής να επιτελέσει.. (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου,2000).

Το δείγμα λοιπόν φέρεται στη στήλη αυτή από το φέρον αέριο (N_2 ή He), διαχωρίζεται στα συστατικά του τα οποία λόγω διαφορετικού μεγέθους μορίων εξέρχονται σε διαφορετικούς χρόνους και τέλος έτσι διαχωρισμένα φθάνουν στον ανιχνευτή ο οποίος τα ανιχνεύει ποσοτικά. (Σχήμα 3.12α και 3.13) Η καταγραφή των σημάτων του ανιχνευτή γίνεται από ηλεκτρονικούς καταγραφείς - ολοκληρωτές. Ο ποιοτικός διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος γίνεται με βάση το χρόνο κατακράτησης (retention time) εκάστου συστατικού στη στήλη. (<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/fma/files/GC.pdf>.)



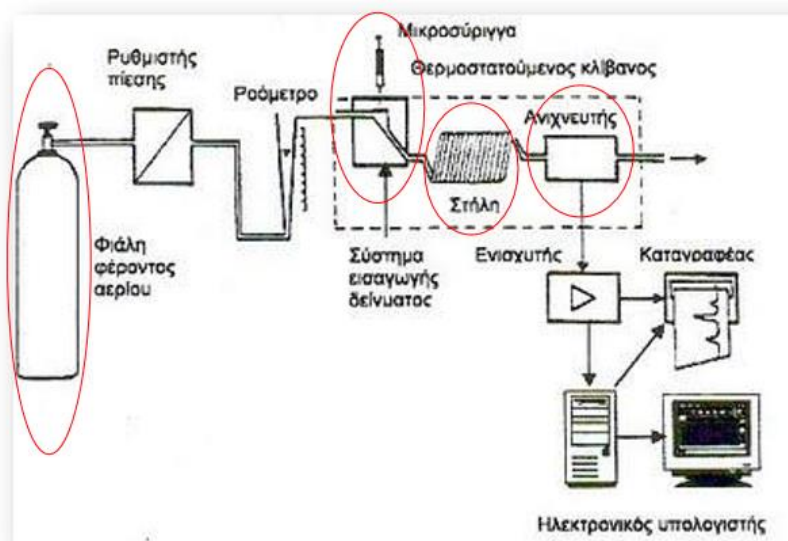
Σχήμα 3.10: Πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας (<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/fma/files/GC.pdf>.)



Σχήμα 3.11: Μειονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας (<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/fma/files/GC.pdf>.)

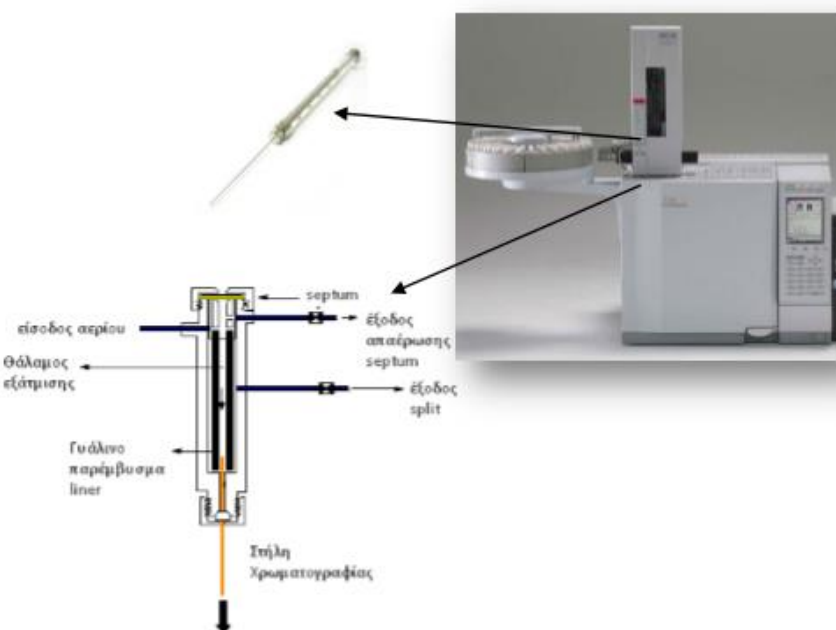
Οι συγκεκριμένοι χρόνοι για κάθε συστατικό που αναμένεται να βρει ένας ερευνητής στο προς ανάλυση δείγμα καθορίζονται ως εξής: Διοχετεύει στη στήλη δείγμα γνωστής περιεκτικότητας σε μία σειρά από ουσίες και σημειώνει τους χρόνους κατακράτησης για κάθε συστατικό. Επίσης καταγράφει την ένταση του κάθε σήματος που είναι ανάλογη με την ποσότητα του κάθε συστατικού. Τις πληροφορίες αυτές τις τροφοδοτεί στη μνήμη του αυτόματου ηλεκτρονικού ολοκληρωτή - καταγραφέα που με βάση αυτές τις πληροφορίες επεξεργάζεται τους χρόνους και την ένταση των

σημάτων από τα συστατικά των αγνώστων δειγμάτων και κάνει κατ'αυτόν τον τρόπο τον ποιοτικό και ποσοτικό διαχωρισμό



Σχήμα 3.12: Οργανολογία GC

(<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/fma/files/GC.pdf>.)



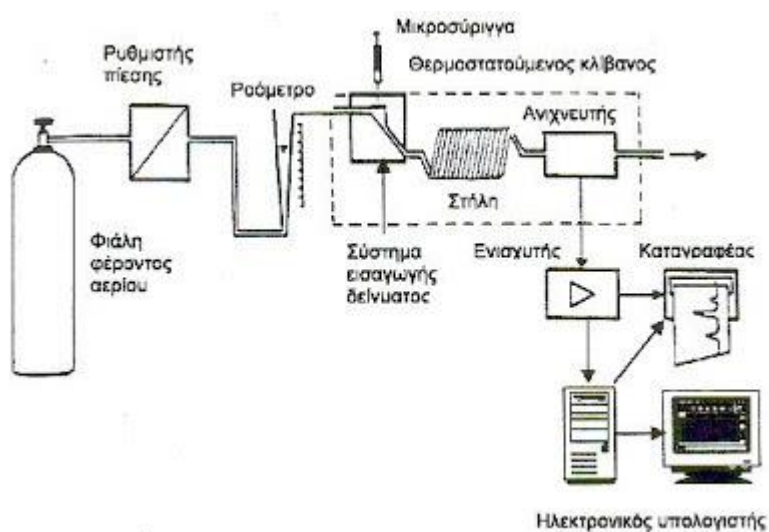
Σχήμα 3.13: Αυτόματος δειγματολήπτης , σύριγγα και εισαγωγέας

(<http://www.chemeng.ntua.gr/courses/fma/files/GC.pdf>.)

Τα κυριότερα μέρη στα οποία βασίζεται η λειτουργία της αέριας χρωματογραφίας παρουσιάζονται στο σχήμα 3.13.

3.3.2 Αέρια χρωματογραφία φασματομετρία μάζας (gas chromatography/mass)

Η συνδυασμένη τεχνική της αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS) είναι από τις πιο διαδεδομένες αναλυτικές τεχνικές (Βλάτσιος, 2011). Χρησιμοποιείται για ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς σύνθετων μιγμάτων που αποτελούνται από οργανικά πτητικά ή ημιπτητικά συστατικά. Όπως φαίνεται στο σχήμα 3.14 αποτελεί συνδυασμό ενός αέριου χρωματογράφου (GC) που διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος και ενός MS ανιχνευτή που παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης κάθε συστατικού.



Σχήμα 3.14 Οργανολογία GC-MS (Βλάτσιος 2011).

Στην πλειοψηφία των GC-MS συστημάτων, χρησιμοποιείται τριχοειδής χρωματογραφική στήλη, σε συνδυασμό με φασματόμετρο μάζας που διαθέτει τετράπολο φίλτρο μαζών και πραγματοποιεί ιονισμό των μορίων με κρούση ηλεκτρονίων (electron impact, EI). Η GC-MS τεχνική είναι από τις πρώτες συνδυασμένες τεχνικές που αναπτύχθηκαν. Στις μέρες μας αποτελεί τυπικό αναλυτικό όργανο των περισσότερων εργαστηρίων (περιβαλλοντικών, κλινικών, φαρμακολογικών, τοξικολογικών κ.α.). Οι κυριότεροι παράγοντες που συνετέλεσαν στην επιτυχία της είναι (Βλάτσιος 2011):

- Ο υψηλός βαθμός συμβατότητας των τεχνικών GC και MS. Η συμβατότητα αφορά τις εφαρμογές, την ταχύτητα και την χημική εκλεκτικότητα. Το

μοναδικό σημείο ασυμβατότητας μεταξύ τους είναι η διαφορετική πίεση λειτουργίας. Αυτό ξεπεράστηκε με την ανάπτυξη των τριχοειδών στηλών που λειτουργούν και ως διατάξεις υποβιβασμού της πίεσης.

- Η διαθεσιμότητα εκτενών βιβλιοθηκών φασμάτων μάζας.

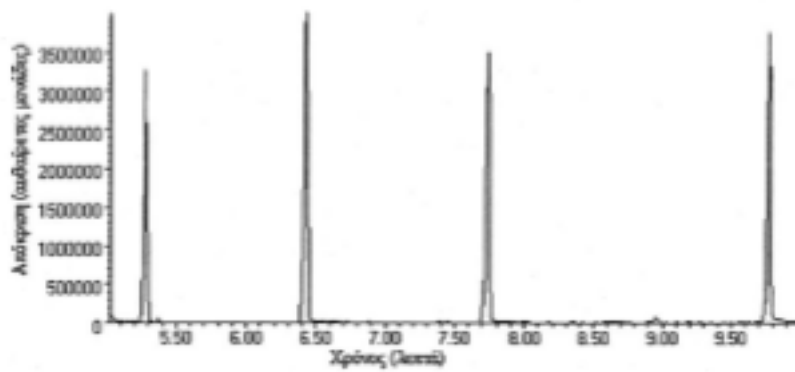
Το σημαντικότερο πρόβλημα κατά την ερμηνεία των GC-MS μετρήσεων είναι ο ελλιπής διαχωρισμός των κορυφών έκλουσης των συστατικών, φαινόμενο πολύ συνηθισμένο κατά την ανάλυση σύνθετων μιγμάτων. Συνέπεια του ελλιπούς χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι η αλληλοεπικάλυψη των φασμάτων μάζας των συστατικών. Αυτή προκαλεί δυσκολίες στην ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους.

Στο σχήμα 3.15 παρουσιάζονται τυπικά γραφήματα που χρησιμοποιούνται για την λήψη πληροφοριών από μια GC-MS ανάλυση. Ειδικότερα:

a) Στο σχήμα 3.15.α φαίνεται το συνολικό χρωματογράφημα ή αλλιώς η καμπύλη ολικής απόκρισης ιόντων (total ion current, TIC). Το TIC παριστάνει την συνολική απόκριση του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου. Σε αυτό εμφανίζονται οι κορυφές έκλουσης (peak) των συστατικών του μίγματος. Ο χρόνος ανάσχεσης (retention time) και το εμβαδόν κάθε κορυφής, χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό, αντίστοιχα, κάθε συστατικού.

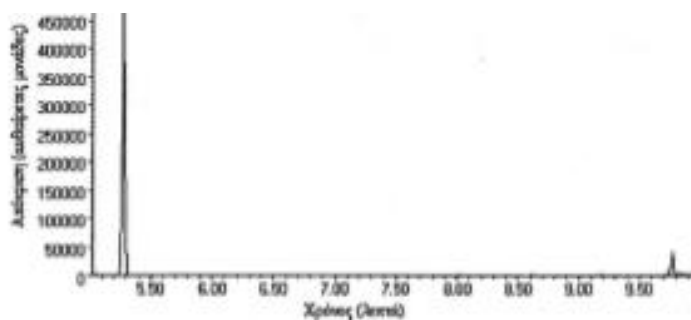
b) Στο σχήμα 3.15.β φαίνεται το χρωματογράφημα μεμονωμένου ιόντος (Extracted Ion Chromatogram, EIC). Αυτό παριστάνει την απόκριση του ανιχνευτή συναρτήσει του χρόνου, για συγκεκριμένο ιόν. Χρησιμοποιείται με τον ίδιο τρόπο που χρησιμοποιείται και το TIC με τη διαφορά ότι εμφανίζει αυξημένη εκλεκτικότητα σε σχέση με το τελευταίο. Το άθροισμα όλων των EICs παράγει το TIC (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

c) Στο σχήμα 3.15.γ φαίνεται το φάσμα μάζας που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή του χρωματογραφήματος. Χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των συστατικών του μίγματος.



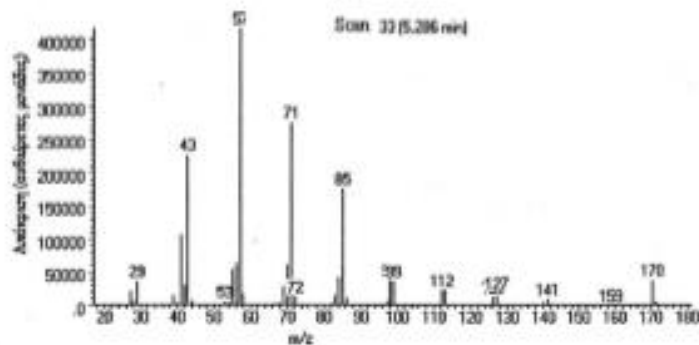
(α)

Ion 71.00 (70.70 to 71.70)



(β)

Scan 32 (5.206 min)



(γ)

Σχήμα 3.15: Τυπικά γραφήματα που χρησιμοποιούνται για την εξαγωγή πληροφοριών από μία GC-MS ανάλυση (α) καμπύλη ολικής απόκρισης ιόντων (TIC), (β) καμπύλη απόκρισης μεμονωμένου ιόντος (EIC) και (γ) φάσμα μάζας σε συγκεκριμένη χρονική στιγμή.

Οι Relajic et al (2016) προσδιόρισαν τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων χρησιμοποιώντας ένα χρωματογράφο 6890N αερίου με φασματογράφο μάζας 5975 αδρανές και 7863B αυτόματο δειγματολήπτη (Agilent, Santa Clara, California, USA). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός διεξήχθη σε τριχοειδή στήλη HP-5MS, 30μ; 0,25 χλιοστά, εσωτερική διάμετρος 0.251m. Η θερμοκρασία στο φούρνο ρυθμίστηκε ως

εξής: αρχική θερμοκρασία 120 °C, κρατήθηκε για 1 λεπτό; ; 30 °C ανά λεπτό έως 190 °C, κρατήθηκε για 1 λεπτό, 5 °C ανά λεπτό έως 205 °C, κρατήθηκε για 1 λεπτό; 2° C ανά λεπτό έως 217°C, 6 °C ανά λεπτό έως 232° C, κρατήθηκε για 1 λεπτό, 10 °C ανά λεπτό έως 240 °C, χωρίς πραγματοποιηθήκε;? 40° C ανά λεπτό έως 320°C, που πραγματοποιηθήκε για 3 λεπτά.

Η θερμοκρασία της πηγής ιόντων ήταν 230; C, η θερμοκρασία της γραμμής μεταφοράς ήταν 280° C και MS θερμοκρασία quad ήταν 150° C. Ο ιοντισμός κρούσης ηλεκτρονίων ρυθμίστηκε στα 70 eV. Το φέρον αέριο ήταν ήλιο (Messer, καθαρότητα 6.0) με ρυθμό ροής 1 mL/λεπτό. Η ανάλυση πραγματοποιηθήκε με SIM.

Οι Baša Česnik et al (2008) εξέτασαν 47 δείγματα οίνων που προέρχονται από αμπελλοκαλλιέργειες ολοκληρωμένης διαχείρισης των επιζήμιων εχθρών και εντόμων. Τα υπό εξέταση δείγματα αναλύθηκαν για την παρουσία του 67 φυτοφαρμάκων. Δύο εσωτερικές αναλυτικές μέθοδοι χρησιμοποιηθήκαν για τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων: αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας μεθόδου (GC-MS) για τον προσδιορισμό των διθειοκαρβαμιδικών και πολυ-υπολειμματικές μέθοδος GC-MS. Σε ένα δείγμα σταφυλιών (2,1%) ανιχνεύθηκαν υπολείμματα , 28 δείγματα (59,6%) περιείχαν υπολείμματα σε επίπεδα μικρότερα ή ίσα από τα ανώτατα όρια καταλοίπων (AOK), και σε 18 δείγματα (38,3%) τα επίπεδα των υπολειμμάτων ήταν υψηλότερα από το όριο για την ουσία cyprodinil (το εύρος συγκέντρωσης ήταν 0,03-0,40 mg kg⁻¹ του cyprodinil) και fludioxonil (συγκέντρωση ήταν 0,03 mg kg⁻¹ του fludioxonil). Πολλαπλά υπολείμματα βρέθηκαν σε 41 δείγματα (87,2%). Ο μεγαλύτερος αριθμός των φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν ανά δείγμα ήταν επτά. Δεν παρατηρήθηκε παραβίαση των φυτοφαρμάκων επιτρέπεται σε IPM. Folpet (97,9%), cyprodinil (51,1%), διθειοκαρβαμικά (44,7%), χλωροθαλονίλη (23,4%), χλωροπυριφός (19,1%) και pyrimethanil (14,9%) ήταν τα πιο συχνά βρέθηκαν φυτοφαρμάκων στα σταφύλια.

3.2.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography-HPLC)

Η χρωματογραφία είναι μια μέθοδος χημικής ανάλυσης που βασίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός δείγματος μεταξύ δύο φάσεων. Η μία φάση παραμένει σταθερή στο σύστημα και ονομάζεται «στατική φάση»(stationary phase) ενώ η άλλη λέγεται «κινητή φάση»(mobile phase) και διέρχεται μέσα ή πάνω

από την επιφάνεια της στατικής φάσης. Η κινητή φάση προκαλεί μετατόπιση των συστατικών του μίγματος σε διαφορετικές θέσεις μέσα σε μια χρωματογραφική στήλη με αποτέλεσμα το διαχωρισμό τους (Pecsok et al., 1980).

Η υγρή χρωματογραφία είναι ένα σύστημα διαχωρισμού στο οποίο η κινητή φάση είναι ένας διαλύτης ενώ η στατική φάση ένα πορώδες μέσο (Pecsok et al., 1980). Τα βασικά είδη υγρής χρωματογραφίας, ανάλογα με την φύση της στατικής φάσης και τον μηχανισμό του διαχωρισμού, είναι (Meyer, 1994):

- Χρωματογραφία προσρόφησης (adsorption chromatography), στην οποία η στατική φάση είναι κατάλληλο προσροφητικό υλικό (πυριτική πηκτή, αλουμίνα, οξείδιο του μαγνησίου).

- Χρωματογραφία κατανομής (partition chromatography), στην οποία το πορώδες μέσο της στατικής φάσης επιχρίεται με ένα υγρό αδιάλυτο στην κινητή φάση. Ο διαχωρισμός βασίζεται σε κατανομή των χημικών ουσιών μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης.

- Χρωματογραφία ιοντανταλλαγής (ion-exchange chromatography), στην οποία η στατική φάση φέρει ιονικές ομάδες που αλληλεπιδρούν με τις ιονικές ουσίες αντίθετου φορτίου του δείγματος.

- Χρωματογραφία αποκλεισμού με βάση το μέγεθος (size exclusion chromatography), στην οποία η στατική φάση αποτελείται από μια διαπερατή πηκτή και ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το μοριακό μέγεθος των ουσιών.

Εξ' αιτίας των υψηλών πιέσεων που επικρατούν στην υγρή χρωματογραφία, η υγρή στοιβάδα της στατικής φάσης κατά την χρωματογραφία κατανομής απομακρύνεται σταδιακά από την κινητή φάση (Pecsok et al., 1980). Για το λόγο αυτό αναπτύχθηκαν τεχνικές χημικής σύζευξης της υγρής φάσης στο πορώδες υπόστρωμα και δημιουργήθηκαν οι χημικά συζευγμένες φάσεις (chemically bonded phases) οι οποίες χρησιμοποιούνται σήμερα στην πλειοψηφία των διαχωρισμών (Meyer, 1994).

Ανάλογα με την πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης, διακρίνονται τα παρακάτω είδη υγρής χρωματογραφίας (Meyer, 1994):

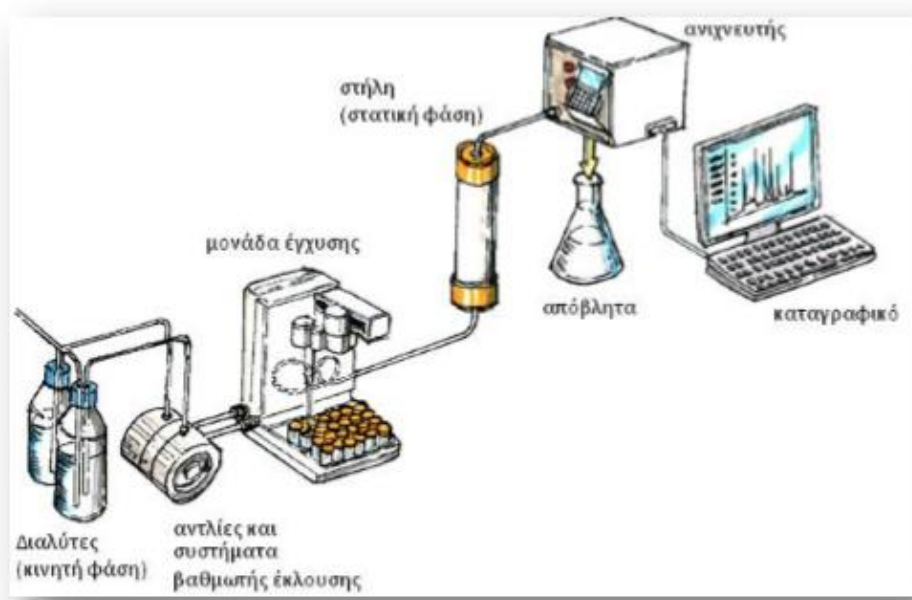
- Χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase chromatography), όπου η πολικότητα της στατικής φάσης είναι μεγαλύτερη της πολικότητας της κινητής φάσης,

- Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed phase chromatography), όπου η πολικότητα της κινητής φάσης είναι μεγαλύτερη της

πολικότητας της στατικής φάσης.

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας για την μεταφορά ενός υγρού υπό υψηλή πίεση και η δημιουργία στηλών με εξειδικευμένα τεχνολογικά χαρακτηριστικά οδήγησε στην ραγδαία ανάπτυξη της τεχνικής της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης ή υψηλής πίεσης (High Performance Liquid Chromatography or High Pressure Liquid Chromatography - HPLC) όπως αλλιώς αναφέρεται (Meyer, 1994) λόγω των υψηλών πιέσεων που επικρατούν. Ένα χρωματογραφικό σύστημα HPLC αποτελείται από τα παρακάτω βασικά επιμέρους τμήματα (Σχήμα 3.16):

- Φιάλες διαλυτών
- Αντλία υψηλής πίεσης, σταθερής ροής
- Εισαγωγέα δείγματος
- Χρωματογραφική στήλη
- Ανιχνευτή
- Καταγραφικό



Σχήμα 3.16: Σχηματική αναπαράσταση συστήματος HPLC (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου,2000).

Σχετικά με το πεδίο εφαρμογή της σημειώνεται πως η HPLC είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική στον προσδιορισμό υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων, σε

σύγκριση με την αέρια χρωματογραφία, στις παρακάτω περιπτώσεις (Cotterill and Byast, 1984):

- Όταν τα φυτοφάρμακα είναι θερμικά διασπώμενες ουσίες, όπως για παράδειγμα ουσίες που ανήκουν στις κατηγορίες των καρβαμιδικών, διθειοκαρβαμιδικών, και παραγώγων της ουρίας.
- Όταν δεν είναι πτητικές ενώσεις, π.χ. βενζιμιδαζόλια,
- Όταν είναι ιοντικές ενώσεις, π.χ. φαινοξυοξικά οξέα.

Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της HPLC είναι ότι πρόκειται για «μη καταστρεπτική» τεχνική και έτσι είναι δυνατή η συλλογή των διαχωρισμένων συστατικών και η περαιτέρω ταυτοποίησή τους (Cotterill and Byast, 1984).

Ο Tuzimiski (2012) χρησιμοποίησε ένα ευαίσθητο υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή διόδων (HPLC-DAD) και χρωματογραφία λεπτής στιβάδας υψηλής απόδοσης με ανίχνευση με συστοιχία διόδων μεθόδους (HPTLC-DAD) για τον προσδιορισμό δέκα φυτοφαρμάκων που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές τάξεις σε δείγματα κρασιών. Η προτεινόμενη μέθοδος βασίζεται στην εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) διαδικασία με C18 Polar Plus και C18 / SDB-1 φυσίγγια για την απομόνωση και τη συγκέντρωση των αναλυτών. Το αποδεκτό μέσο ανακτήσεις για σχεδόν όλα τα φυτοφάρμακα που μετράται στο επίπεδο συγκέντρωσης 200 ng mL⁻¹ κρασί ήταν στο εύρος 69-119%. Στη μέθοδο HPLC-DAD, τα όρια ανίχνευσης ήταν της τάξεως του 0,03 έως 0,27 μg ml⁻¹ και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQs) ήταν της τάξεως του 0,10 έως 0,81 μg ml⁻¹. Αντίστοιχα, στη μέθοδο HPTLC-DAD, τα LOD όρια ήταν ίση 0,11 μg ανά σημείο και τα LOQ όρια ήταν 0,33 μg ανά σημείο για το prometryn που εντοπίστηκε σε δείγματα κρασιού, αντίστοιχα. Οι ποσότητες των φυτοφαρμάκων που καθορίστηκαν ήταν 1.5-2.0 ng mL⁻¹ κρασί (n = 5).

4.ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ

ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ

ΕΝΤΟΜΟΚΤΟΝΩΝ ΣΕ ΟΙΝΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

4.1 Εισαγωγή

Σύμφωνα με τους Oliva et al (2000), η αμπελοκαλλιέργεια χαρακτηρίζεται ως ιδιαίτερη ευάλωτη αφού δύναται να προσβληθεί τόσο από πολυάριθμα ζωικά όσο και από φυτικά παράσιτα. Οι σκόροι (*Lobesia botrana*, *Clysia ambiguella*) και τα ζώφια (*Eotetranychus carpini*, *Panonichus ulmi*, *Tetranychus urticae*) είναι τα πιο κοινά φυτοφάγα έντομα. Οι εχθροί αυτοί αν και συνήθως δεν προκαλούν σοβαρές βλάβες ή άλλες καταστροφές, η έγκαιρη αντιμετώπισή τους είναι εφικτή μέσω της χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Ο αριθμός των διαθέσιμων φυτοφαρμάκων στους αμπελουργούς αυξάνεται σταθερά, καθώς εισάγονται στην γεωργία όλο και πιο εξειδικευμένα προϊόντα για την καταπολέμηση των διαφόρων παθογενειών. Ως εκ τούτου η εκτεταμένη χρήση φυτοφαρμάκων στην παραγωγή σταφυλιού έχει οδηγήσει στην παρουσία υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στους εμπορικούς οίνους που προσφέρονται για δημόσια κατανάλωση. Έτσι, έχει δημιουργηθεί μια μεγάλη υπόθεση αβεβαιότητας που αφορά τα επίπεδα των ουσιών αυτών στο οίνο και στα διάφρα οινικά προϊόντα τα οποία μπορούν να γίνουν ασφαλέστερα από αυτούς τους ενδεχόμενους επιβλαβείς παράγοντες (Τσακίρης, 2014).

Κατά τους Correia et al. (2000), Tsakiris et al (2011), ο προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων στα γεωργικά προϊόντα, και ιδιαιτέρως στο κρασί, έχει πάρει πολύ μεγάλες διαστάσεις τα τελευταία χρόνια, επειδή η λαθεμένη χρήση των φυτοφαρμάκων για την προστασία των καλλιεργειών μπορεί να καταλήξει στην παρουσία υπολειμμάτων αυτών των ουσιών στον οίνο. Από την άλλη μεριά, αυτό το γεγονός μερικές φορές συνοδεύεται από καθυστερημένες και αργά αναπτυσσόμενες ζυμώσεις και αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι μερικά μείγματα παρουσιάζουν μια αρνητική επίδραση στην ανάπτυξη και τον μεταβολισμό των αμπελιών. Λαμβάνοντας υπόψη τα ανώτερα στοιχεία στην παρούσα υποενότητα γίνεται μια προσπάθεια παρουσίασης των κυριότερων ερευνητικών αποτελεσμάτων σχετικά με τα επίπεδα υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε οίνους.

4.2 Υπολείμματα οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε μεσογειακά οινικά προϊόντα

Σύμφωνα με τον Τσακίρη (2014) τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται στην προστασία αμπέλων και τα υπολείμματα τους που παραμένουν στα σταφύλια κατά τη συγκομιδή μπορούν να μεταφερθούν στο οίνους κατά τη διαδικασία της οινοποίησης. Η διαδικασία οινοποίησης αρχίζει με το πάτημα των σταφυλιών. Από αυτή τη στιγμή και μετά, η υπολειμματική ποσότητα του φυτοφάρμακου που βρίσκεται στην επιφάνεια σταφυλιών έρχεται σε επαφή με το μούστο. Δηλαδή, το παρασιτοκτόνο βρίσκεται σε ένα διφασικό σύστημα που αποτελείται από μια υγρή όξινη φάση (μούστος) και μια στερεά φάση και κατανέμεται μεταξύ των δύο φάσεων.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί οι χημικές αναλύσεις των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα γεωργικά προϊόντα γίνεται σε διαπιστευμένα εργαστήρια (ιδιωτικά ή κρατικά.). Σύμφωνα με τον Τσακίρη (2003), αναλυτικά δεδομένα χημικών αναλύσεων που ελήφθησαν από 62 δείγματα από το εργαστήριο Fasma Tech για την περίοδο 1999 -2000 σε σταφύλι (σουλτανίνα) έδειξαν ότι:

- 8 Οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα ανιχνεύθηκαν (acephate, chlorpyrifos methyl, diazinon, dichlorvos, iprodione, methamidophos, methidathion, pyrazophos.)
- Μόνο το 5% των δειγμάτων αναγνωρίστηκαν με μη ανιχνεύσιμα υπολείμματα (M.A)
- Το 84% των δειγμάτων χαρακτηρίστηκαν με υπολείμματα μικρότερα ή ίσα των MRLs
- Το 11% των δειγμάτων χαρακτηρίστηκαν με υπολείμματα μεγαλύτερα των MRLs 11% .

Σύμφωνα με τον Τσακίρη (2000) 500 δείγματα [ελαιόλαδο, οπωροκηπευτικά, χυμοί φρούτων, γαλακτοκομικά, δημητριακά, κρασιά] εξετάστηκαν από το εργαστήριο «SkyLab» Αν και μεγάλο μέρος των δειγμάτων ελήφθησαν από βιολογικές καλλιέργειες ανιχνεύτηκαν τα εξής φυτοπροστατευτικά προϊόντα: Οργανοφωσφορικά οργανοχλωριωμένα, αζωτούχα, πυρεθρίνες, δίθειοκαρβαμιδικά. Ειδικότερα, τα πιο συχνά εμφανιζόμενα φυτοπροστατευτικά προϊόντα στα υπό εξέταση δείγματα ήταν το diazinon, iprodione, methidathion, fenthion, dimethoate,

phosalone, pirimiphos methyl, bromophos methyl, malathion, διθειοκαρβαμιδικά.

Σε πιο πρόσφατη ερευνητική μελέτη, οι Tsakiris et al (2011), εξέτασαν ποικίλα γεωργικά προϊόντα (σταφύλια πιπεριές, ντομάτες, αγγούρια, μελιτζάνα και ελαιόλαδο) με σκοπό την εκτίμηση των υπολειμματικών επιπέδων των φυτοφαρμάκων και την εκτίμηση κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία, δεδομένου ότι μεγάλες ποσότητες αυτών των προϊόντων καταναλώνονται καθημερινά στις μεσογειακές χώρες, ειδικά κατά τη θερινή περίοδο. Συνολικά ελήφθησαν 815 δείγματα εκ των οποίων τα 234 ήταν σταφύλια. Η δειγματοληψία έγινε από διάφορες περιοχές της Ελλάδας την περίοδο 2005-2009 . Τα αποτελέσματα των χημικών αναλύσεων στα σταφύλια παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.1

Πίνακας 4.1: Είδος δραστικής ουσίας, μέση και μέγιστη συγκέντρωση, MRLs(Tsakiris et al. 2011)

Food commodity	Pesticide	Pos	%	Average concentration (mg/kg)	Max value (mg/kg)	MRLs (mg/kg)
Grapes (n=234)	Diothiocarbamates	8	3.42	0.274	0.84	5
	Carbendazim + Benomyl	4	1.71	0.055	0.1	0.3
	Iprovalicarb	2	0.85	0.032	0.04	2
	Myclobutanil	2	0.85	0.035	0.04	1
	Fenbutatin oxide	2	0.85	0.095	0.14	2
	Fenarimol	1	0.43	0.010	0.01	0.3
	Penconazole	1	0.43	0.020	0.02	0.2
	Pirimiphos methyl	1	0.43	0.010	0.01	0.05
	Deltamethrin	1	0.43	0.020	0.02	0.2
	Dimethomorph	1	0.43	0.050	0.05	3
	Dimethoate-omethoate	1	0.43	0.060	0.06	0.02
	Tetraconazole	1	0.43	0.010	0.01	0.1
	Boscalid	1	0.43	0.260	0.26	5
	Kresoxim methyl	1	0.43	0.010	0.01	1
	Tebuconazole	1	0.43	0.010	0.01	2
	Endosulfan sulfate	1	0.43	0.010	0.01	0.5
	Endosulfan a and b	1	0.43	0.020	0.02	0.5

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των ερευνητών στα σταφύλια οι πιο συχνά ανιχνευόμενες κατηγορίες δραστικών ουσιών ήταν τα διθειοκαρβαμικά και τα βενζιμιδαζόλια (carbendazim και benomyl). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι σε δείγματα από Μεσογειακή αμπελοκαλλιέργεια τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δεν αποτελούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία. Ενδεχομένως αυτό να οφείλεται στη

σωστή εφαρμογή τους από καλλιεργητές, με αποτέλεσμα να μην παρουσιάζουν υπολειμματική δράση.

Οι Economou et al (2009), εξετάζοντας τα υπολειμματικά επίπεδα φυτοφαρμάκων σε ελληνικούς λευκούς και ερυθρούς οίνους διαπίστωσαν πως οι συγκεντρώσεις της συντριπτικής πλειοψηφίας των εφαρμοζόμενων φυτοφαρμάκων στην αμπελοκαλλιέργεια, στους παραγόμενους οίνους ήταν μικρότερες από $0,01 \text{ mgL}^{-1}$ και μόνο οκτώ φυτοφάρμακα προσδιορίστηκαν σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από τις MLOQ: carbaryl, pyrimethanil, azoxystrobin, myclobutanil, carben-dazim/benomyl, thiophanate-methyl, fenhexamid and metalaxyl (Πίνακας 4.2). Ωστόσο, ένα σχετικά υψηλό ποσοστό (35% των 60 δειγμάτων οίνου που ελέγχθηκαν) βρέθηκε να περιέχει τουλάχιστον ένα από αυτά τα οκτώ φυτοφάρμακα σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από $0,010 \text{ mgL}^{-1}$. Τα carben-dazim/benomyl, (30% των δειγμάτων), το thiophanate-methyl, (20% των δειγμάτων) και το carbaryl (21% των δειγμάτων) ήταν τα πιο συχνά καθορισμένα εντομοκτόνα σε δείγματα οίνου άνω των $0,010 \text{ mg L}^{-1}$. Σύμφωνα με τους ερευνητές, τα χαμηλά MLOQ για τα carben-dazim/benomyl, και ιδιαίτερα τα carbaryl, στα οινοποιήσιμα σταφύλια (πίνακας 4.2), τα σχετικά υψηλά ποσοστά εμφάνισής τους σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ στα αναλυθέντα δείγματα ενδέχεται να προκαλέσουν ορισμένες ανησυχίες όσον αφορά τη χρήση αυτών των ενώσεων στις αμπελοκαλλιέργειες. Επιπλέον, η παρουσία περισσότερων του ενός φυτοφαρμάκων στο ίδιο δείγμα που μπορεί να ασκεί συνεργιστική δράση υποδηλώνει την ανάγκη παρακολούθησης των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα δείγματα οίνων ως δείκτη διασφάλισης της υγείας του καταναλωτή

Πίνακας 4.2: Αποτελέσματα από την ανάλυση 60 δειγμάτων νωπών και MRLs στα οиноποιήσιμα σταφύλια για τα εντομοκτόνα που προσδιορίστηκαν σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από το MLQ ($0,01 \text{ mgL}^{-1}$)(Economou et al., 2009).

Compound	$0.01 \text{ mgL}^{-1} < c^a < 0.1 \text{ mgL}^{-1}$	$0.1 \text{ mgL}^{-1} < c^a < 1 \text{ mgL}^{-1}$	MRLs in wine grapes (mg kg^{-1}) [28]
Number of positive samples (% of 60 samples analyzed)			
Carbaryl	11 (18%)	2 (3%)	0,05
Pyrimethanil	2 (3%)	2 (3%)	5
Myclobutanil	2 (3%)	0 (0%)	1
Azoxystrobin	2 (3%)	0 (0%)	2
Carbendazim + benomyl	11 (18%)	7 (12%)	0,5
Thiophanate-methyl	7 (12%)	5 (8%)	3
Fenhexamid	5 (8%)	0 (0%)	5
Metalaxyl	1 (2%)	0 (0%)	1

^a Concentration determined.

Στον Πίνακα 4.3 παρουσιάζονται τα ερευνητικά δεδομένα των Cabras and Angioni (2000) σχετικά με τα υπολείμματα εντομοκτόνων (σε χιλιοστόγραμμα ανά χιλιόγραμμα (SD) σε οиноποιήσιμα σταφύλια. Τα εντομοκτόνα ανήκουν στην οικογένεια οργανοφωσφορών και συγκαταλέγονται στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα για τον έλεγχο του σκώρου σταφυλιών. Τα ποσοστά αποσύνθεσης είναι πολύ γρήγορα, με ένα $t_{1/2}$ που κυμαίνεται μεταξύ 0,97 και 3,84 ημερών. Συνεπώς, τα υπολείμματα κατά τη συγκομιδή ήταν είτε πολύ χαμηλά είτε μη ανιχνεύσιμα (Πίνακας 4.3). Το dimethoate έδειξε μια ανομοιόμορφη εικόνα : υποβαθμίστηκε γρήγορα κατά την πρώτη εβδομάδα, αλλά ήταν σταθερή τις επόμενες δύο εβδομάδες. Επίσης, το azinphos-methyl ήταν σταθερό στις δύο εβδομάδες μετά την εφαρμογή του στην αμπελοκαλλιέργεια.

Πίνακας 4.3: Υπολείμματα εντομοκτόνων (σε χιλιοστόγραμμα ανά χιλιόγραμμα (SD) στα σταφύλια (Cabras and Angioni 2000).

pesticide	residues at intervals (days) after last application					$t_{1/2}$ (days)
	0	1-2	5-7	14	21	
azinphos-methyl			0.71 ± 0.21	0.63 ± 0.37	0.72 ± 0.45	1.28
chlorpyrifos-methyl	0.16 ± 0.07	0.06 ± 0.02	0.01 ± 0.00			
chlorpyrifos-methyl		0.16	0.08	0.04		3.84
dimethoate	1.13 ± 0.36		0.21 ± 0.08	0.26 ± 0.06	0.28 ± 0.07	
fenitrothion	2.40	0.23	0.07	0.03	0.02	3.27
fenthion	0.28 ± 0.07	0.18 ± 0.07	0.06 ± 0.02			
malathion	2.90	0.73	0.03			1.05
methidathion	0.56 ± 0.13	0.25 ± 0.07	0.04 ± 0.01			1.46
parathion-methyl	0.37 ± 0.04	0.07 ± 0.03	0.01 ± 0.00			0.97
parathion-methyl	0.64	0.08	0.02			1.20
quinalphos	0.39 ± 0.04	0.18 ± 0.02	0.05 ± 0.02			1.73

Στην περίπτωση που η διαδικασία της οινοποίησης μπορεί να πραγματοποιηθεί με τα δέρματα των σταφυλιών, τότε ο οίνος θα περιέχει όλα τα υπολείμματα που περιέχονται στα σταφύλια. Αντιθέτως, εάν η οινοποίηση λάβει χώρα χωρίς τα δέρματα των σταφυλιών, τότε ο οίνος θα περιλαμβάνει μόνο τα υπολείμματα που έχουν περάσει στο μούστο. Σύμφωνα με τα δεδομένα που αναφέρθηκαν στους Πίνακες 4.4 τα υπολείμματα dimethoate, and pyrimethanil στο γλεύκος ήταν παρόμοια με τα αντίστοιχα στα σταφύλια. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις, τα υπολείμματα των εντομοκτόνων στο γλεύκος ήταν σημαντικά χαμηλότερα από εκείνα στα σταφύλια και σε μερικές περιπτώσεις δεν υπήρχαν στο μούστο καθόλου υπολείμματα. Σύμφωνα με τους ερευνητές το γεγονός αυτό ενδεχομένως να αποδίδεται στη μεγάλη συγγένεια αυτών των παρασιτοκτόνων για τη στερεή φάση. Η τάση αυτή επιβεβαιώνεται και από το γεγονός ότι η φυγοκέντρωση συμβάλλει στην πλήρη εξάλειψη των υπολειμματικών επιπέδων ορισμένων παρασιτοκτόνων (cyprodinil, tebuconazole, και chlorpyrifos). Ορισμένα δραστικά συστατικά, τα οποία είναι ασταθή σε όξινο περιβάλλον, υποβαθμίζονται μετά την συμπίεση και στο τέλος της ζύμωσης τα ενεργά συστατικά δεν ανιχνεύονται πλέον στον οίνο. Τα φυτοφάρμακα που είχαν δείξει αυτή τη συμπεριφορά είναι dichlofluanid chlozolate, folpet. (Cabras and Angioni 2000).

Πίνακας 4.4: Υπολείμματα εντομοκτόνων (σε χιλιοστόγραμμα ανά χιλιόγραμμα (SD) στον οίνο (Cabras and Angioni 2000)

pesticide	grape	must	clarified must	wine without maceration	wine with maceration	refs
aziphos-methyl	0.63 ± 0.37				0.04	Goodwin and Ahmad, 1998
aziphos-methyl	0.77 ± 0.38				0.52	Goodwin and Ahmad, 1998
chlorpyrifos	0.73 ± 0.21	0.02	0.01	0.03	0.03	Cabras et al., 1994a
chlorpyrifos	1.86 ± 0.30*	0.09	<0.01	<0.01	<0.01	Sala et al., 1996
chlorpyrifos	2.00 ± 0.26*	0.34 ± 0.02			0.02 ± 0.00	Navarro et al., 1999
chlorpyrifos-methyl	0.16 ± 0.07*	0.06	0.02	0.03	0.03	Cabras et al., 1995b
dimethoate	0.28 ± 0.08	0.26	0.23	0.17	0.20	Cabras et al., 1994a
dimethoate		1.2*		1.03		Kawar et al., 1979
fenitrothion	1.37 ± 0.13*	0.17 ± 0.03	0.10 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.07 ± 0.01	Sala et al., 1996
fenthion	0.06 ± 0.02	0.04	0.04	0.03	0.04	Cabras et al., 1995b
methidathion	0.56 ± 0.13*	0.26	0.25	0.21	0.21	Cabras et al., 1995b
parathion-methyl	0.37 ± 0.04	0.13	0.05	0.05	0.05	Cabras et al., 1995b
parathion-methyl	0.28 ± 0.01*	0.06 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.00	Sala et al., 1996
quinalphos	0.39 ± 0.04*	0.16	0.04	0.07	0.07	Sala et al., 1996

Η σωστή χρήση των φυτοφαρμάκων και η οινοπαραγωγική διαδικασία αναμφίβολα επηρεάζουν την μείωση, και ακόμη και την εξάλειψη των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων. Σύμφωνα με τους (Cabras and Angioni 2000) η

δραστηριότητα των ζυμών κατά την αλκοολική ζύμωση μπορούν να μειώσουν την περιεκτικότητα σε φυτοπροστατευτικά κατάλοιπα. Οι ζύμες έχουν την ικανότητα να αποικοδομούν ορισμένα φυτοφάρμακα που ανήκουν στην κατηγορία των πυρεθροειδών (Faticenti et al . 1984). Οι ζύμες που παράγουν H₂S και SO₂ μπορούν να αποικοδομήσουν μερικά εντομοκτόνα (chlorpyrifos-methyl, fenitrothion, parathion, quinalphos, Πίνακας 4.5) που ανήκουν στην κατηγορία των θειοφωσφορικών (Cabras et al., 1995a-c). Επιπλέον, οι ζύμες προσροφούν ορισμένα φυτοφάρμακα, συμβάλλοντας έτσι στην απομάκρυνσή τους από το κρασί στο τέλος της ζύμωσης.

Πίνακας 4.5: Επίδραση ζυμομυκήτων που παράγουν H₂S και SO₂ σε υπολείμματα φυτοφαρμάκων (Cabras and Angioni 2000).

pesticide	sample	residues (mg/kg ± SD)	
		0 days	7 days
chlorpyrifos-methyl	control	0.90 ± 0.05	0.65 ± 0.06
	liquid	0.59 ± 0.04	0.17 ± 0.01
	yeasts	0.17 ± 0.01	0.11 ± 0.01
fenitrothion	control	0.88 ± 0.04	0.81 ± 0.01
	liquid	0.81 ± 0.03	0.25 ± 0.01
	yeasts	0.10 ± 0.02	0.10 ± 0.03
parathion	control	1.07 ± 0.03	1.02 ± 0.03
	liquid	0.85 ± 0.05	0.41 ± 0.01
	yeasts	0.13 ± 0.04	0.09 ± 0.02
quinalphos	control	0.95 ± 0.01	0.87 ± 0.03
	liquid	0.78 ± 0.02	0.36 ± 0.02
	yeasts	0.10 ± 0.01	0.07 ± 0.01

Οι Edder et al. (2012) εξέτασαν τα υπολειμματικά επίπεδα φυτοφαρμάκων σε ελβετικούς οίνους που προέρχονταν από βιολογικούς και συμβατικούς αμπελώνες. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης τους, οι ερευνητές ανίχνευσαν σε 12 δείγματα βιολογικών οίνων φυτοφάρμακα σε συγκεντρώσεις άνω 10 μg / L Το γεγονός αυτό αποδόθηκε σε επιμολύνσεις από γειτονικούς συμβατικούς αμπελώνες, με αποτέλεσμα να απαιτείται συχνότερος έλεγχος των βιολογικών αμπελώνων. Σχετικά με τους συμβατικούς αμπελώνες, ανιχνεύτηκαν 25 δραστικές ουσίες στο 95% των δειγμάτων (176 δείγματα). Τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα στους υπό εξέταση οίνους παρατίθενται στον πίνακα 4.6.

Πίνακας 4.6: Στοιχεία σχετικά με τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα στους ελβετικούς οίνους ελάχιστα, μέγιστα και μέσα επιπέδα υπολειμμάτων και των αντίστοιχων ελβετικών MRL.

Pesticides	% of positive samples	Levels min-max [mg/L]	Median [mg/L]	Swiss MRL [mg/L]
Carbendazim	69 %	0.001 - 0.28	0.012	2
Fenhexamid	61 %	0.001 - 0.59	0.035	1.5
Azoxystrobin	59 %	0.001 - 0.11	0.005	0.5
Cyprodinil	52 %	0.001 - 0.083	0.008	0.5
Pyrimethanil	45 %	0.001 - 0.070	0.005	1
Tebuconazole	39 %	0.001 - 0.011	0.002	0.3
Dimethomorph	19 %	0.001 - 0.102	0.010	0.2
Myclobutanil	14 %	0.001 - 0.013	0.002	-
Thiophanate-methyl	9 %	0.003 - 0.026	0.007	2
Carbaryl	8 %	0.003 - 0.079	0.008	3
Iprovalicarb	6 %	0.004 - 0.21	0.11	1
Fludioxonil	3 %	0.016 - 0.066	0.035	0.5

Συμπεράσματα

Η συνεχής ανάγκη για περισσότερα και καλύτερα γεωργικά προϊόντα έχει οδηγήσει στην παραγωγή και χρήση πολλών φυτοπροστατευτικών ουσιών. Ιδανικά, η επιθυμητή βιολογική δράση των φυτοφαρμάκων θα έπρεπε να έχει υψηλή εξειδίκευση στους οργανισμούς-στόχους και να αφήνει απρόσβλητους τους υπόλοιπους οργανισμούς. Ωστόσο, τα περισσότερα φυτοφάρμακα δεν είναι απόλυτα επιλεκτικά αυξάνοντας τον κίνδυνο προσβολής του ανθρώπου, γεγονός που οδηγεί την επιστημονική έρευνα στην ανάγκη μελέτης των δυνητικών επιπτώσεων της χρήσης τους στην υγεία του ανθρώπου, των υπόλοιπων οργανισμών και το περιβάλλον. Για την προστασία της γεωργικής παραγωγής χρησιμοποιείται πληθώρα φυτοφαρμάκων που ταξινομούνται σε τρεις μεγάλες κατηγορίες: ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα. Είναι αποδεκτό στη σύγχρονη έρευνα ότι τα εντομοκτόνα είναι οι πλέον τοξικές ουσίες και έτσι η παρούσα μελέτη εστιάστηκε σε αυτά. Μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών εντομοκτόνων στην αμπελοκαλλιέργεια εφαρμόζονται κυρίως τα οργανοφωσφορικά

Για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στους οίνους απαιτείται μία διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος (εκχύλιση-καθαρισμός) και μία διαδικασία ανάλυσης. Μέχρι σήμερα υπάρχει μία ογκώδης τεχνική βιβλιογραφία για την ανάλυση υπολειμμάτων. Διάφορες μέθοδοι έχουν δοκιμαστεί και αξιολογηθεί για την ανάλυση υπολειμμάτων σε διαφορετικά είδη τροφίμων. Οι πιο συνήθεις τεχνικές εκχύλισης είναι οι εξής: εκχύλιση μεταξύ δύο υγρών-liquid liquid extraction (LLE), εκχύλιση στερεής φάσης-solid phase extraction (SPE), μικροεκχύλιση στερεάς φάσης-solid phase microextraction (SPME), η μικροεκχύλιση μεμονωμένης σταγόνας-single drop microextraction (SDME), κ.ά. Οι πιο συνήθεις τεχνικές ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των φπ είναι οι εξής: η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS, GC MS/MS), αλλά και πιο παραδοσιακές τεχνικές όπως η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) η υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (LC-MS και LC-MS/MS). Τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή μια αναλυτικής μεθόδου έχουν να κάνουν με την αξιοπιστία της, τις ιδιότητες του υποστρώματος, και τις ιδιότητες του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας 1.1: Κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων και τρόπος δράσης αυτών. (Προσαρμογή από Κούρας, 2000).

	Χημική κατηγορία	Χημικές ενώσεις	Τρόπος δράσης (βιολογική δράση)
Εντομοκτόνα	Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες	DDT και παράγωγα αυτού	Νευροτοξικά (διατάραξη ισορροπίας Na-K στους νευρώνες)
		Hexachlorocyclohexane (HCH)	Νευροτοξικό (παροπλήσια δράση με το DDT)
		Κυκλοδιένια (Aldrin, Dieldrin, Heptachlor, Endosulfan κ.α.)	Νευροτοξικά (διατάραξη ισορροπίας Na-K ταυτόχρονη παρεμπόδιση της εισόδου Cl ⁻ στους νευρώνες)
		Πολυχλωροτερπένια (Toxaphene)	Νευροτοξικά (όμοια δράση με τα κυκλοδιένια)
	Οργανοφωσφορικοί εστέρες	Αλειφατικά παράγωγα (Malathion, Dimethoate, Monocrotophos κ.α.)	Η νευροτοξική δράση όλων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων οφείλεται στην παρεμποδιστική δράση που ασκούν στην ακετυλοχολινεστεράση, με αποτέλεσμα την περίσσεια της ακετυλοχολίνης, τη δυσλειτουργία του νευρικού συστήματος και την παράλυση του κεντρικού νευρικού συστήματος (ΚΝΣ)
		Παράγωγα φαινυλίου (Parathion Methyl, Parathion Ethyl κ.α.)	
		Ετεροκυκλικά παράγωγα (Diazinon, Chlorpyrifos, Azinphos Methyl κ.α.)	
	Καρβαμιδικοί και θειοκαρβαμιδικοί εστέρες	Carbaryl, Methomyl, Carbofuran, Aldicarb κ.α.	Νευροτοξικά (όμοια δράση με τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα)
	Συνθετικά πυρεθροειδή	Permethrin, Allethrin, Cypermethrin κ.α.	Νευροτοξικά (όμοια δράση με το DDT)

Πίνακας 1.1 (συνέχεια)

Ακαρεοκτόνα	Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες	Dicofol, Chlorobenzilate κ.α.	Δρουν νευροτοξικά (όμοια δράση με το DDT)
	Φορμαμίδνες	Chlorodimeform, Amitraz κ.α.	Δρουν ως αναστολείς μιας βιογενούς αμίνης της μονοαμινοοξειδάσης και συναγωνίζονται την οκτοπαμίνη στους υποδοχείς της
	Οργανοκασσιτερούχες ενώσεις	Cyhexatin, Azocyclotin κ.α.	Αναστέλουν την οξειδωτική φωσφορύλιωση στο στάδιο της παραγωγής ενέργειας από ΑΤΡ.
	Δνιτροφαινόλες	Dinobuton, Binocap κ.α.	Δρουν όμοια με τις οργανοκασσιτερούχες ενώσεις.
	Οργανοθειούχες ενώσεις	Tetradifon, Propargite κ.α.	Προκαλούν στειρώση στα θηλυκά ακάρια

Μυκητοκτόνα	Διθειοκαρβαμιδικοί εστέρες	Thiram, Ziram, Maneb, Zineb κ.α.	Αδρανοποιούν της -SH ομάδες των αμινοξέων, των πρωτεϊνών και ενζύμων ή παρεμποδίζουν την αναπνοή των μυκήτων.
	Καρβαμιδικοί εστέρες	Φθαλιμίδια (Captan, Folpet, Captafol κ.α) Δικαρβοξυμίδια (Vinclozolin, Iprodione κ.α).	Πιθανή παρεμπόδιση της σύνθεσης αμινών και ενζύμων που περιέχουν τη ρίζα -SH, αναστέλουν τη βιοσύνθεση τριγλυκεριδίων, χητίνης, στερολών και DNA.
	Βενζιμιδαζόλια	Benomyl, Carbendazim, Thiabendazol κ.α.	Προκαλούν ανωμαλίες στην εκβλάστηση των σπόρων των μυκήτων και στη διαίρεση και ανάπτυξη των κυττάρων αυτών.
	Δινιτροφαινόλες	Dinocap κ.α.	Παρεμποδίζουν τα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορυλίωσης.
	Αλκυφατικές αζωτούχες ενώσεις	Dodine, Quazatine.	Μεταβάλλουν την διαπερατότητα των κυτταρικών μεμβρανών προκαλώντας απώλεια ηλεκτρολυτών.
	Φανυλαμίδια	Metalaxyl κ.α.	Αναστέλουν τη βιοσύνθεση του RNA.

Πίνακας 1.1 (συνέχεια)

Νηματοδοκτόνα	Οργανοφωσφορικοί εστέρες	Fenamiphos, Disulfoton, Phorate, Demeton, Demeton Methyl κ.α.	Δρουν νευροτοξικά όμοια με τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.
	Καρβαμιδικοί εστέρες	Aldicarb, Carbofuran, Oxamyl κ.α.	Δρουν νευροτοξικά, όμοια με τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα.
Νηματοδοκτόνα	Αλογονωμένοι υδρογονάνθρακες	DD, EDB, Bromide Methyl, Chloropicrin κ.α.	Νευροπαραλυτικά καπνογόνα
	Ισοθειοκυανικοί εστέρες	Metam-sodium, Dazomet κ.α.	Αδρανοποιούν τις -SH, -OH, -NH ₂ ομάδες των αμινοξέων των ενζύμων.

Ζιζανιοκτόνα	Χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες	Φανοξυ-άλκοολικά οξέα και εστέρες αυτών (2,4-D, 2,4,5-T, MCPA κ.α.)	Επηρεάζουν την κυτταρική διαίρεση, ενεργοποιούν τον μεταβολισμό των φωσφορικών και τροποποιούν το μεταβολισμό των νουκλεϊκών οξέων.
	Ακετυλιδία	Alachlor, Metolachlor, Propachlor κ.α.	Αναστέλουν τον μεταβολισμό των νουκλεϊδικών οξέων, την κυτταροδιαίρεση και τη βιοσύνθεση των πρωτεϊνών, κηρών και λιπών.
	Ενώσεις διπυριδύλιου	Diquat, Paraquat, Difenzoquat.	Καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη των φυτικών ιστών με φωτοξειδωτικές δράσεις.
	Καρβαμιδικοί εστέρες	Propham, Phenmedipham, Barban, Chloroprotham κ.α.	Διακόπτουν την κυτταρική διαίρεση, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης των φυτικών ιστών.

Ζιζανιοκτόνα	Δινιτροανιλίνες-δινιτροφαινόλες	Trifluralin, Isopropalin κ.α. Dinoseb κ.α.	Παρεμποδίζουν τα ένζυμα της οξειδωτικής φωσφορύλιωσης αναστέλουν τη φωτοσύνθεση και αναπνοή.
	Φανυλουρίες	Diuron, Linuron, Monuron, Fenuron κ.α.	Παρεμποδίζουν την αντίδραση της φωτοσυνθετικής παραγωγής φυτικών σακχάρων.
	Θειοκαρβαμιδικοί εστέρες	EPTC, Molinate, Thiobencarb κ.α.	Αναστέλουν τη σύνθεση λιπιδίων, τη φωτοσύνθεση και την αναπνοή των φυτών.
	Τριαζίνες	Atrazine, Simazine, Cyanazine κ.α.	Αναστέλουν την αντίδραση της φωτοσύνθεσης.

Βιβλιογραφία

Ξενογλώσση Βιβλιογραφία

- Beutel, M., R. Deckardt, K. Schaudig, S. Franke, and R. Zauner. (1992). Trauer, Depressivität und Angst nach einem Spontanabort: Eine Studie über systematische Erfassung und Einflussfaktoren [Grief, depression, and fear after spontaneous abortion: Systematic inquiry into its determinants]. *Psychother. Psychosom. med. Psychol.* 42 (5): 158-66.
- Cabras P., and Angioni A (2000). Pesticide Residues in Grapes .Wine, and Their Processing Products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48.
- Cabras, P.; Garau, V. L.; Angioni, A.; Farris, G. A.; Budroni, M.; Spanedda, L. . (1995a). Interaction during fermentation between pesticides and oenological yeasts producing H₂S and SO₂. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 43, 370-373.
- Cabras, P.; Garau, V. L.; Melis M.; Pirisi, F. M.; Tuberoso, C. I. G. (1995c). The effect of clarifying substances on organophosphorous insecticide residues in wine. *J. Wine Res.*, 6, 201-205.
- Cabras, P.; Garau, V. L.; Pirisi, F. M.; Cubeddu, M.; Cabitza, F.; Spanedda, L. (1995b). Fate of some insecticides from vine to wine. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2613-2615.
- Correia M., Delerue-Matos C., and Alves A. (2000). Multi-residue methodology for pesticide screening in wines. *Journal of Chromatography A* 2000, 889: 5967.
- Costa L.G (2006). Current issues in organophosphate toxicology. *Clinica Chimica Acta* ; 366: 1-13.
- Cremlyn R.J. (1991). *Agrochemicals: Preparation and Mode of Action*. John Willey & Sons Ltd. INC. Chichester, West Sussex, UK.
- Economou, A. H. Botitsi, S. Antoniou, and D. Tsipi (2009). Determination of multi-class pesticides in wines by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216:5856-5867.
- Edder, P. D. Ortelli, and O. Zali (2012). Survey of Pesticide Residues in Wines (http://ge.ch/sante/media/site_sante/files/imce/consommation-affaires-veterinaires/doc/reference_11.pdf).

- Ellenhorn MJ, and Barceloux DG (1988). Medical toxicology-diagnosis and treatment of human poisoning. Elsevier, New York, 1988
- Fatichenti, F.; Farris, G. A.; Deiana, P.; Cabras, P.; Meloni, M.; Pirisi, F. M. (1984).The effect of *Saccharomyces cerevisiae* on concentration of dicarboximide and acylamide, fungicides and pyrethroid insecticides during fermentation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 419-421.
- Jamal, G.A. (1997). Neurological symptoms of organophosphorous compounds. *Adverse Drug React. Toxicological reviews*. 16 133-170, pISSN: 1176-2551,
- Lotti M. (2001).Clinical toxicology of anticholinesterase agents in humans. In: Krieger R.I., editor. *Handbook of pesticide Toxicology*. San Diego: Academic Press; p.1043-1085
- Matolcsy G., M. Nádasy and V. Andriska, (1988).*Studies in environmental science 32-Pesticide Chemistry*”, Elsevier Science Publishing Co., Inc., Amsterdam, pp 108-164.
- Nasreddine L and Parent-Massin D. (2002). Food contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? *Toxicol Lett* 127: 29–41.
- Oliva J., Barba A., Vela N., Melendreras F., and Navarro S. (2000). Multiresidue method for the rapid determination of organophosphorus insecticides in grapes, must and wine. *Journal of Chromatography A* 2000, 882: 213-220.
- Pang, G.F., Fan, C.L., Liu, Y.M., Cao, Y.Z., Zhang, J.J., Fu, B.L., Li, X.M., Li, Z.Y., Wu, Y.P. (2006).Multi-residue method for the determination of 450 pesticide residues in honey, fruit juice and wine by double-cartridge solid-phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives and Contaminants*, 23:777-81.
- Pehkonen S.O. and Q. Zhang (2002).The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: A Critical Review”. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 32:17-72.
- Rotenberg M., Shefi M., Dany S., Dore I., Tirosh M., Almog S. (1995). Differentiation between organophosphate and carbamate poisoning. *Clin Chim Acta*. 31; 234(1-2): 11-21.

- Schwarzenbach R. P., P. M. Gschwend and D. M. Imboden (2003). "Environmental Organic Chemistry", Eds John Wiley & Sons Inc, Hoboken, New Jersey.
- Stephens R., Spurgeon A., Calvert I.A., Beach J, Levy L.S., Berry H. and Harrington J.M. (1995). Neuropsychological effects of long-term exposure to organophosphates in sheep dip. *Lancet* 345: 1135–1139
- U.S. Environmental Protection Agency, USEPA, "EFED RED Chapter for Ethyl Parathion", (eds) McLane D., A. Al-Mudallal, K. Costello and J. Hetrick, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances, Washington D.C. 20460 (1999).
- WHO (1986). Environmental Health Criteria 63. Organophosphorus Insecticides: A General Introduction", Published under the joint sponsorship of the United Nations Environment Programme, the International Labour Organization, and the World Health Organization, Geneva
- World Health Organization, (WHO), (1986). Organophosphorus Insecticides: A General Introduction, Environmental Health, Criteria 63". Geneva, (1986). World Health Organization,

Ελληνική Βιβλιογραφία

- Γιαννοπολίτης, Κ. Ν. (2005). Οδηγός γεωργικών φαρμάκων 2005 / Κ. Ν. Γιαννοπολίτης. - 1η έκδ. - Αθήνα : ΑγροΤύπος ΑΕ, 2005. - 470σ. · 28x21εκ.
- Κουϊμτζής Θ., Κ. Φυτιάνος, Κ. Σαμαρά-Κωνσταντίνου, (1998). Χημεία Περιβάλλοντος. Εκδόσεις University Studio Press, Θεσσαλονίκη.
- Λύκας, Δ. (2009). Ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης και παρακολούθηση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αμπελοκαλλιέργεια και στα προϊόντα οινοποίησης. Διδακτορική διατριβή.
- Μαχαίρα Κ. (2001). Χρόνιες επιδράσεις από την έκθεση σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Στα πλαίσια του Σεμιναρίου «Μεθοδολογία και προτεραιότητες στην εργαστηριακή παρακολούθηση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων», Σεμινάριο από το Ανθρώπινο Δίκτυο Διάδοσης της Έρευνας & Τεχνολογίας Γνώσης-ΕΠΕΤ II, 98 ΑΔ60», Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Αθήνα, 25-27 Ιουνίου 2001, σελ. 93-102.

- Μούρκιδης Γ.Α. (1978).Μαθήματα Γεωργικής Χημείας - Φυτοφάρμακα. Θεσσαλονίκη.
- Μούρκιδης Γ.Α.. (1974).Γεωργική Χημεία, - Γ΄ Γεωργική Φαρμακολογία. Θεσσαλονίκη.
- Παναγιώταρου-Πέτσικου Ν., Φ. Υδραίου, Γ. Κολιόπουλος, Α.Κ. Ζούνος και Γ. Αλβανόπουλος (2001).Έλεγχος επιπτώσεων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο περιβάλλον. Νομοθετικές ρυθμίσεις. περιέχεται στο «Παρακολούθηση Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων από τη χρήση Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων στη Γεωργία-Υφιστάμενη κατάσταση στην Ελλάδα», Συμπεράσματα Ανθρώπινου Δικτύου Διάδοσης της Έρευνας & Τεχνολογίας Γνώσης-ΕΠΕΤ ΙΙ, 98 ΑΔ60», Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Αθήνα, σελ 5-22, (2001).
- Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε. (1991).Γεωργικά Φάρμακα Μέρος ΙΙ., Διδακτικές σημειώσεις στο μάθημα Γεωργικά Φάρμακα Ι.
- Τσακίρης Ι.Ν. (2003) Υπολειμματικές ποσότητες φυτοφαρμάκων σε γεωργικά προϊόντα της Βορείου Ελλάδος, καταγραφή, νομοθεσία, έλεγχος και επιπτώσεις. Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Κρήτης.

Ιστότοποι

- <http://www.oiv.int/>.
- http://www.minagric.gr/syspest/syspest_crops.aspx
- <http://www.agrotypos.gr/redirect.asp?type=a&id=56969>).
- http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/legislation/pesticides/76-895.pdf.
- http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/legislation/pesticides/86-363.pdf.
- www.efet.gr/images/efet_res/docs/legislation/pesticides/90-642.pdf.