

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ.....	6
ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	7
ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ.....	8
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	9
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	10
1.1 Τα συστατικά του ελαιολάδου.....	12
1.1.1 Λιπαρά οξέα.....	12
1.1.2 Τριγλυκερίδια.....	13
1.1.3 Δευτερεύοντα συστατικά του ελαιολάδου.....	14
1.1.4 Υδρογονάνθρακες.....	15
1.1.5 Τοκοφερόλες.....	15
1.1.6 Φαινόλες.....	16
1.1.7 Φωσφολιπίδια.....	16
1.1.8 Χρωστικές.....	16
1.1.9 Στερόλες.....	17
1.1.10 Αρωματικά συστατικά.....	17
1.1.11 Άλλα συστατικά.....	17
2. ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΧΘΡΩΝ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ.....	18
2.1 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία.....	20
2.1.1 Fenitrothion (Sumithion, Folithion).....	20
2.1.2 Malathion (Carbofos, Maliter).....	21
2.1.3 Fenthion (Lebaycid, Baytex).....	22
2.1.4 Parathion (Folidol, Forferno, Niran).....	23
2.2 Τοξικότητα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.....	23
3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ.....	25
3.1 Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων ελαιολάδου για την ανίχνευση υπολειμμάτων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων malathion, fenitrothion, fenthion, parathion.....	25

3.1.1 Κλασσική μέθοδος υγρής υγρής εκχύλισης (Liquid Liquid Extraction, LLE)	26
3.1.2 Μέθοδος εκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)	27
3.1.2 Συνδυασμένες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων ελαιολάδου	27
3.2 Μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης για την ανίχνευση υπολειμμάτων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων malathion, fenitrothion, fenthion, parathion	28
4. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ LPME (Liquid-Phase Microextraction)	30
4.1 Μέθοδος LPME α) δυο φάσεων β) τριών φάσεων.....	31
4.2 Περιγραφή χρήσης της ίνας στην LPME.....	33
4.3 Χαρακτηριστικά πορώδους κοίλης ίνας	35
4.4 Οργανικός διαλύτης.....	35
4.5 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την μέθοδο	36
4.6 Εφαρμογές της LPME	37
5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ.....	38
5.1 Εισαγωγή	38
5.2 Ανάπτυξη χρωματογραφικού διαχωρισμού, η έννοια του χρωματογραφήματος.....	39
5.3 Διάταξη αέριου χρωματογράφου	41
5.4 Φασματομετρία Μάζας	42
5.5 Σύζευξη Φασματογράφου Μάζας με την Αέρια Χρωματογραφία	43
5.6 Εφαρμογές της Αέριας Χρωματογραφίας	43
6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	45
6.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία.....	45
6.2 Περιγραφή της μεθόδου	46
6.3 Εφαρμογή της τεχνικής μικροεκχύλισης LPME στα δείγματα του ελαιολάδου	47
6.4 Χρωματογραφική ανάλυση με αέρια χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας (GC-MS)	49
7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	51
7.1 Συστατικά του ελαιολάδου που εκλούνται	51
7.2 Επιλογή του διαλύτη.....	53
7.3 Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης.....	55

7.4 Επιλογή του βάρους δείγματος	56
7.5 Επιλογή του μήκους ίνας.....	57
7.5 Επιλογή του χρόνου εκχύλισης	59
7.6 Εκτίμηση της μεθόδου	60
7.7 Σύγκριση της LPME με άλλες μεθόδους εκχύλισης οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε ελαιόλαδο	61
8. ΦΥΣΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ.....	64
8.1 Ποσότητες των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων που έχουν ανιχνευτεί με άλλες μεθόδους.....	66
9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	68
10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	70

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στην επιβλέπουσα Επίκουρο Καθηγήτρια κ. Ελευθερία Ψυλλάκη για την επίβλεψη, καθοδήγηση και την άψογη συνεργασία μας κατά την διάρκεια της διπλωματικής μελέτης. Στα μέλη της τριμελούς επιτροπής Καθηγητή κ. Καλογεράκη Νικόλαο καθώς και τον Δρ. Ιωάννη Πολυράκη για τις πολύτιμες διορθώσεις και παρατηρήσεις τους.

Σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου Υδατικής Χημείας και ιδιαίτερος στην υποψήφια διδάκτορα κα Μάγδα Χαραλαμπάκη για την πολύτιμη βοήθεια της.

Στους φίλους μου για την ηθική και όχι μόνο υποστήριξη που μου παρείχαν κατά την διάρκεια της διπλωματικής μελέτης.

Τέλος δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω τους γονείς μου για την ηθική και οικονομική υποστήριξη τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η εφαρμογή της μικροεκχύλισης υγρής φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME) σε δείγματα ελαιολάδου με σκοπό την ανίχνευση υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Πρόκειται για μια μέθοδο προσυγκέντρωσης που ελαχιστοποιεί την χρήση οργανικού διαλύτη και δεν απαιτεί τον διαχωρισμό των λιπιδίων από τη μήτρα του ελαιολάδου πριν την ανάλυση.

Τα οργανοφωσφορικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εντομοκτόνα fenitrothion, malathion, fenthion, parathion που χρησιμοποιούνται εναντίων των εντομολογικών εχθρών της ελιάς. Οι ενώσεις αυτές είναι λιπόφιλες και έχουν βρεθεί υπολείμματα τους σε δείγματα ελαιόλαδου σε παλιότερες έρευνες.

Η ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των εντομοκτόνων έγινε με τη χρήση συστήματος αέριας χρωματογραφίας με φασματογράφο μάζας (GC-MS). Στα πειράματα ποσοτικοποίησης χρησιμοποιήθηκε το εντομοκτόνο ethoprophos σαν Εσωτερικό Πρότυπο (IS).

Τα πειράματα που έγιναν σκοπό είχαν την βελτιστοποίηση των συνθηκών της μεθόδου. Ως βέλτιστες συνθήκες για την εφαρμογή της μικροεκχύλισης υγρής φάσης σε δείγματα ελαιολάδου ορίστηκαν η ταχύτητα ανάδευσης 1000 rpm, χρόνος εκχύλισης 10 min, μήκος ίνας 1.3 cm, βάρος δείγματος 5 g και διαλύτης το τολουόλιο.

Ακολούθησε η διερεύνηση της γραμμικότητας κατά την οποία ο συντελεστής συσχέτισης κυμάνθηκε από 0.9847 έως 0.9999. Ενώ κατά την εκτίμηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου η σχετική τυπική απόκλιση RSD εμφάνισε μέση τιμή 9.5 %. Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου κυμάνθηκαν από 0.070 έως 0.428 mg/kg.

Μετά την βελτιστοποίηση της μεθόδου ακολούθησε η εφαρμογή της σε 31 φυσικά δείγματα που συλλέχτηκαν από ελαιώνες της Κρήτης. Σε ένα από τα δείγματα ανιχνεύτηκε ποσότητα fenthion που εκτιμήθηκε σε 0.9 mg/kg, ενώ σε ένα άλλο ανιχνεύτηκε ποσότητα malathion κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης (0.5 mg/kg).

ΛΙΣΤΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα (International Olive Oil Council, 1984)	13
Πίνακας 2. Εγκεκριμένα φυτοφάρμακα για την καλλιέργεια της ελιάς (Υπουργείο Γεωργίας)	19
Πίνακας 3. Μέθοδοι ανίχνευσης υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε ελαιόλαδο	29
Πίνακας 4. Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών (Χατζηιωάννου και Κουππάρης 2002)	40

ΛΙΣΤΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1. Τοποθέτηση της κοίλης ίνας στην μικροσύριγγα	47
Εικόνα 2. Διάταξη της μικροσύριγγας με την ίνα	48
Εικόνα 3. Διάταξη εκχύλισης με LPME.....	49
Εικόνα 4. Τοποθεσίες δειγματοληψίας από το νομό Χανίων.....	65
Εικόνα 5. Τοποθεσίες δειγματοληψίας στους υπόλοιπους νομούς της Κρήτης	65

ΛΙΣΤΑ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1. Μοριακή δομή του fenitrothion (Redden <i>et al.</i> , 1996)	20
Σχήμα 2. Μοριακή δομή του malathion (EPA, 1996)	21
Σχήμα 3. Μοριακή δομή του fenthion (Hazel <i>et al.</i> , 1999).	22
Σχήμα 4. Μοριακή δομή του parathion (Dockter <i>et al.</i> , 1999)	23
Σχήμα 6 . Τομή κοίλης ίνας μέσα σε υδατική φάση δότη κατά τη μέθοδο i) δύο φάσεων και ii) τριών φάσεων (Psillakis and Kalogerakis, 2003).	31
Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση κοίλης πορώδους ίνας όταν συνδέεται με δύο βελόνες (Psillakis and Kalogerakis, 2003).	34
Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση πορώδους κοίλης ίνας συνδεδεμένη με μια μικροσύριγγα (Psillakis and Kalogerakis, 2003).....	34
Σχήμα 9. Παράμετροι που περιγράφουν τις κορυφές ενός χρωματογραφήματος (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)	40
Σχήμα 10. Διάταξη Αέριου Χρωματογράφου (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)	41
Σχήμα 11. Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στον λόγο A_i/A_{IS}	56
Σχήμα 12. Επίδραση του βάρους του δείγματος στο λόγο A_i/A_{IS}	57
Σχήμα 13. Επίδραση του μήκους της ίνας στον λόγο A_i/A_{IS}	58
Σχήμα 14. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στον λόγο A_i/A_{IS}	59

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CE: Capillary Electrophoresis

EI: Electron Impact

EPA: Environmental Protection Agency

FAO: Food and Agricultural Organization

GC: Gas Chromatography

GC-ECD: Gas Chromatography- Electron Capture Detector

GC-FID: Gas Chromatography- Flame Ionization Detector

GC-FPD: Gas Chromatography- Flame Photometric Detector

GC-NPD: Gas Chromatography- Nitrogen Phosphorus Detector

GPC-GC: Gel Permeation Chromatography-Gas Chromatography

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

LC: Liquid Chromatography

LLE: Liquid Liquid Extraction

LPME: Liquid Phase Microextraction

LOD: Limits Of Detection

MIC: Multi Ion Chromatogram

MS: Mass Spectrometry

NCI-MS: Negative Chemical Ionization-Mass Spectrometry

PAHs: Polycyclic Aromatic Hydrocarbons

PCBs: Polychlorinated Bifenils

RPLC-GC TOTAD: Reverced Phase Liquid Chromatography-Gas Chromatography Through Oven Transfer Adsorption-Desorpthon Interface

SI: Similarity Index

SIM: Single Ion Monitoring

SPE: Solid Phase Extraction

SPME: Solid Phase Microextraction

TLC: Thin Layer Chromatography

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το δένδρο της ελιάς (*Olea europaea*), που καλλιεργείται από τα πανάρχαια χρόνια, προσέφερε και προσφέρει ένα από τα βασικότερα είδη διατροφής του ανθρώπου. Καλλιεργείται κυρίως στις χώρες γύρω από την λεκάνη της Μεσογείου και έχει συνδεθεί με όλους τους πολιτισμούς που αναπτύχθηκαν στις χώρες αυτές. Το 98 % του αριθμού των ελαιοδέντρων που υπάρχουν ανά τον κόσμο φύονται στην λεκάνη της Μεσογείου και καλύπτουν το 95 % της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου. Η παραγωγή αυτή προέρχεται από 7, κυρίως χώρες, οι οποίες κατά σειρά σπουδαιότητας είναι: η Ισπανία, η Ιταλία, η Ελλάδα, η Πορτογαλία, η Τυνησία, η Αλγερία και το Μαρόκο (Κυριτσάκης, 1988).

Συγκεκριμένα για την περιοχή της Ελλάδας η ελαιοκομία αποτελεί μια από τις πλέον παραδοσιακές και περισσότερο διαδεδομένες γεωργικές καλλιέργειες. Αυτό οφείλεται στο άριστο οικολογικό περιβάλλον, ειδικότερα στις άριστες για την καλλιέργεια της ελιάς παραθαλάσσιες περιοχές της Ηπειρωτικής Ελλάδας και στα νησιά (Κυριτσάκης, 1988).

Η ελαιοκαλλιέργεια έχει πολύ μεγάλη κοινωνική και οικονομική σημασία, δεδομένου ότι απασχολεί και αποδίδει εισόδημα σε 400.000 οικογένειες περίπου. Οι ελαιώνες καταλαμβάνουν το 14.1 % της καλλιεργούμενης γης (Κυριτσάκης, 1988).

Το κυριότερο προϊόν της ελιάς είναι το ελαιόλαδο που χαρακτηρίζεται ως το έλαιο που λαμβάνεται από τους καρπούς του είδους της Ελιάς της Ευρωπαϊκής.

Το ελαιόλαδο, εξαιτίας των θρεπτικών και βιολογικών του ιδιοτήτων αποτελεί ένα βασικό συστατικό στο διαιτολόγιο των κατοίκων ορισμένων περιοχών της γης από την αρχαιότητα μέχρι και σήμερα (Κυριτσάκης, 1988).

Η αναγνωρισμένη παγκοσμίως βιολογική αξία του ελαιολάδου το καθιστά προϊόν με τεράστια σημασία και δυνατότητα εξέλιξης στην παγκόσμια αγορά. Έρευνες έχουν αποδείξει ότι στις Μεσογειακές χώρες, που χρησιμοποιούν ως κύρια πηγή λίπους το ελαιόλαδο, το ποσοστό των καρδιακών παθήσεων είναι μικρότερο σε σχέση με τις χώρες της Βόρειας

Ευρώπης, οι οποίες χρησιμοποιούν ως κύρια πηγή λίπους τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (Roche *et al.*, 2000).

Ωστόσο οι καθημερινοί διατροφικοί κίνδυνοι, που έχουν δημιουργηθεί εξαιτίας των αλόγιστων ενεργειών του ανθρώπου στην προσπάθεια της αύξησης της γεωργικής παραγωγής, έχουν αυξήσει την καχυποψία του κόσμου και έχουν εντείνει την στροφή του σε προϊόντα που προέρχονται από οργανικές μεθόδους παραγωγής. Έτσι και το ελαιόλαδο δεν μπορεί να μείνει ανεπηρέαστο και κυρίως όταν είναι γνωστό ότι για την καλλιέργεια του χρησιμοποιούνται μερικά εξαιρετικά επικίνδυνα χημικά σκευάσματα.

Δεδομένης της βιολογικής του αξίας, της μοναδικότητας του και της αυξημένης του τιμής, κυρίως στις χώρες που δεν παράγεται και συγχρόνως λόγω της αναγκαιότητας να διασφαλιστεί η καθαρότητα του οργανικού ελαιολάδου από τυχόν υπολείμματα χημικών σκευασμάτων κρίνεται αναγκαία η ανεύρεση νέων ποσοτικών και ποιοτικών μεθόδων ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο ελαιόλαδο. Οι μέθοδοι αυτές πρέπει να είναι αποτελεσματικές, γρήγορες, να έχουν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης (δεδομένου ότι τα χημικά σκευάσματα πιθανόν να είναι επικίνδυνα ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις), να ελαχιστοποιούν την χρήση τοξικών διαλυτών και να είναι εύκολα εφαρμόσιμες.

1.1 Τα συστατικά του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο αποτελείται κυρίως από λιπαρά οξέα, τριγλυκερίδια (μίγματα εστέρων γλυκερίνης με τα ανώτερα λιπαρά οξέα) και από άλλα δευτερεύοντα συστατικά σε ένα ποσοστό 0.5-1 %. Τα τελευταία είναι πολύ σημαντικά για την σταθερότητα και την γεύση του ελαιολάδου (Boskou, 1996).

1.1.1 Λιπαρά οξέα

Η σύνθεση του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα κυμαίνεται και εξαρτάται από την ποικιλία, τις κλιματολογικές συνθήκες της περιοχής, το γεωγραφικό πλάτος και την ωριμότητα του ελαιοκάρπου κατά την συγκομιδή. Το μεγαλύτερο ποσοστό των λιπαρών οξέων είναι ακόρεστα (Κυριτσάκης, 1988).

- Ακόρεστα λιπαρά οξέα: ελαϊκό (C18:1 μονοακόρεστο), λινελαϊκό (C18:2), λινολενικό (C18:3), αραχιδονικό (C20:4), παλμιτολεϊκό (C16:1)
- Κορεσμένα λιπαρά οξέα: παλμιτικό (C16:0), στεατικό (C18:0)

Συγκεκριμένα τα λιπαρά οξέα που περιέχει το ελαιόλαδο δίνονται στον Πίνακα 1 .

Πίνακας 1. Περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε λιπαρά οξέα

Λιπαρά οξέα	Περιεκτικότητα (%)
Ελαϊκό	56.0-83.0
Παλμιτικό	7.5-20.0
Λινελαϊκό	3,5-20
Στεατικό	0.5-5.0
Παλμιτολεϊκό	0.3-3.5
Λινολενικό	0.0-1.5
Μυριστικό	0.0-0.1
Αραχιδικό	Έως 0.8
Βεχενικό	Έως 0.2
Λιγνοκερικό	Έως 1.0
Επταδεκανοϊκό	Έως 0.5
Επταδεκενοϊκό	Έως 0.6

Πηγή: International Olive Oil Council, 1984

Η καθυστέρηση συγκομιδής του ελαιοκάρπου έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των ακόρεστων λιπαρών οξέων του ελαιολάδου (ειδικά του λινελαϊκού) και τη μείωση του παλμιτικού, γεγονός που το καθιστά ευαίσθητο στην οξειδωση (Κυριτσάκης 1988, Βοσκου 1999).

Ορισμένοι επιστήμονες κατατάσσουν το ελαιόλαδο σε δυο κατηγορίες βάση της περιεκτικότητας σε λιπαρά οξέα: μια κατηγορία με χαμηλή περιεκτικότητα σε λινολεϊκό-παλμιτικό και υψηλή σε ελαϊκό και μια άλλη με υψηλή περιεκτικότητα σε λινολεϊκό-παλμιτικό και χαμηλή σε ελαϊκό. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν τα ελαιόλαδα που παράγονται στην Ισπανία, Ιταλία και Ελλάδα και στην δεύτερη ανήκουν τα ελαιόλαδα που παράγονται στην Τυνησία (Κυριτσάκης, 1988, Βοσκου, 1996).

1.1.2 Τριγλυκερίδια

Λόγω της σύνθεσης των λιπαρών οξέων θα αναμενόταν να υπάρχουν πάνω από 70 είδη τριγλυκεριδίων στο ελαιόλαδο, ωστόσο ο αριθμός τους

είναι μικρότερος. Συγκεκριμένα τα πλήρως κορεσμένα τριγλυκερίδια όπως τα PPP, SSS, PSP, SOS κτλ δεν έχουν ανιχνευτεί στο ελαιόλαδο. Το ίδιο συμβαίνει και με τα τριακόρεστα τριγλυκερίδια του λινολεϊκού οξέος, όλα τα τριγλυκερίδια του στεατικού οξέος με τέσσερις διπλούς δεσμούς, τα γλυκερίδια του στεατικού και παλμιτικού οξέος με 5-6 διπλούς δεσμούς. Το στεατικό οξύ δεν απαντά ποτέ στη θέση 2 των τριακόρεστων τριγλυκεριδίων ενώ το στεατικό και τα παλμιτικό δεν απαντούν ποτέ στην θέση 2 των τετρακόρεστων τριγλυκεριδίων (Κυριτσάκης 1988, Boskou 1996).

Τα τριγλυκερίδια που απαντώνται στο ελαιόλαδο είναι τα : OOO (40-59 %), POO (12-20 %), OOL (12.5-20 %), POL (5.5-7 %) και SOO (3-7 %), με P:παλμιτικό, S:στεατικό, L: λινολεϊκό, O: Ολεϊκό. Τα γλυκερίδια του ελαϊκού οξέος ξεπερνούν το 70-80 % του βάρους του ελαιολάδου (Κυριτσάκης 1988, Boskou 1996).

1.1.3 Δευτερεύοντα συστατικά του ελαιολάδου

Το ελαιόλαδο περιέχει και άλλα συστατικά εκτός από τα παραπάνω σε μικρότερες ποσότητες. Τα συστατικά αυτά αρχικά ερευνήθηκαν στο ασαπυνοποίητο μέρος του ελαιολάδου που παραμένει μετά από τον διαχωρισμό των λιπαρών οξέων με σαπυνοποίηση και εκχύλιση με αιθέρα. Η διαδικασία αυτή δεν επιτρέπει την σωστή μελέτη όλων των συστατικών γιατί ένα μέρος καταστρέφεται κατά την σαπυνοποίηση. Για το λόγο αυτό προτιμάται η διαδικασία της κρυσταλλοποίησης σε ένα πολικό διαλύτη κατά την οποία σε χαμηλές θερμοκρασίες διαχωρίζονται τα γλυκερίδια ενώ παράλληλα παραμένει ένα συμπύκνωμα από τα δευτερεύοντα συστατικά. Από το συμπύκνωμα αυτό διαχωρίζονται οι διάφορες κλάσεις των συστατικών με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και αναλύονται με τις κλασικές μεθόδους της οργανικής χημείας (Κυριτσάκης 1988, Boskou 1996).

1.1.4 Υδρογονάνθρακες

Οι υδρογονάνθρακες απαντούν στο ελαιόλαδο σε ποσοστό 0.5 % (το υψηλότερο σε όλα τα έλαια). Δύο υδρογονάνθρακες παρατηρούνται στο ελαιόλαδο, το σκουαλένιο και το β-καροτένιο (το τελευταίο θα αναλυθεί εκτενέστερα στις χρωστικές) (Lercker and Rodriguez-Estrada, 2000).

Το σκουαλένιο είναι ένας τριτερπενικός υδρογονάνθρακας που αποτελεί πρόδρομο της βιοσύνθεσης των στερολών. Είναι ένας πολυακόρεστος υδρογονάνθρακας με 30 άτομα άνθρακα (Κυριτσάκης 1988, Boskou 1996).

Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε σκουαλένιο κυμαίνεται από 0.8 έως 12 g/kg (Μυρκονίτς *et al.*, 2004). Το ελαιόλαδο περιέχει περισσότερο σκουαλένιο από κάθε άλλο φυτικό έλαιο έτσι χρησιμοποιείται η περιεκτικότητά του για τον έλεγχο νοθείας του από τα άλλα έλαια (Boskou, 1996).

1.1.5 Τοκοφερόλες

Οι τοκοφερόλες είναι ετεροκυκλικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους και απαντούν σε όλα τα φυτικά έλαια και σε μικρότερο ποσοστό στα ζωικά λίπη. Η υψηλή διατροφική αξία του ελαιολάδου οφείλεται και στην αντιοξειδωτική και βιταμινική δράση των τοκοφερολών (Lercker and Rodriguez-Estrada, 2000).

Διάφορα είδη τοκοφερολών έχουν προσδιοριστεί και είναι γνωστές σαν α-β-γ-δ και ζ. Οι τοκοφερόλες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τη θέση στην οποία βρίσκονται οι μεθυλικές ομάδες. Στο ελαιόλαδο απαντά η α τοκοφερόλη σε ποσοστό 88.5 % η β και η γ σε ποσοστό 9.9 % και η δ σε ποσοστό 1.6 %. Αναφέρεται δε ότι σε ελαιόλαδα χαμηλής οξύτητας η περιεκτικότητα των τοκοφερολών είναι χαμηλή. Τέλος οι τοκοφερόλες χρησιμοποιούνται και στον έλεγχο νοθείας του ελαιολάδου. Συγκεκριμένα η ανίχνευση τοκοφερόλης γ αποδεικνύει την νοθεία του ελαιολάδου με αραβοσιτέλαιο (Κυριτσάκης 1988, Boskou 1996).

1.1.6 Φαινόλες

Οι φαινολικές ενώσεις που παρατηρούνται στο ελαιόλαδο έχουν ισχυρά αντιοξειδωτική δράση. Στο ελαιόλαδο παρατηρούνται κυρίως η τυροσόλη, η υδρόξυ-τυροσόλη και η ελευρωπαΐνη (Murkovic *et al.*, 2004).

Η περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε φαινόλες εξαρτάται από τις καλλιεργητικές φροντίδες, τις περιβαλλοντικές συνθήκες, το βαθμό ωριμότητας του καρπού, τις συνθήκες διατήρησης και τον τύπο του ελαιουργείου. Η διάλυση των φαινολών στο νερό επεξεργασίας του ελαιοκάρπου που χρησιμοποιείται στο ελαιουργείο έχει ως αποτέλεσμα να απομακρύνεται μεγάλη ποσότητα αυτών στα απόνερα του ελαιουργείου. Για το λόγο αυτό συνίσταται προσεκτική χρήση νερού (Κυριτσάκης 1988, Βοσκου 1996).

1.1.7 Φωσφολιπίδια

Το ελαιόλαδο περιέχει μικρή συγκέντρωση φωσφολιπιδίων περίπου 30-136 mg/kg ενώ η μεγαλύτερη ποσότητα αυτών προέρχεται από τον πυρήνα του ελαιοκάρπου. Συναντώνται συνήθως λεκιθίνη και κεφαλίνη. Το ελαϊκό οξύ είναι το κυριότερο οξύ που συμμετέχει στο σχηματισμό των φωσφολιπιδίων (Κυριτσάκης 1988, Βοσκου 1996).

1.1.8 Χρωστικές

Το χρώμα του ελαιολάδου ποικίλει από κιτρινοπράσινο σε χρυσό και εξαρτάται από την ποικιλία και το βαθμό ωρίμασης του ελαιοκάρπου. Οι χρωστικές εκτός από το ότι καθορίζουν το χρώμα του ελαιολάδου, που αποτελεί ένα από τα εμπορικά κριτήρια, έχουν και αντιοξειδωτικό ρόλο. Υπάρχουν δύο ειδών φυσικών χρωστικών στο ελαιόλαδο:

α) Χλωροφύλλες: χλωροφύλλη α και β και φαιοφυτίνη α και β η δε περιεκτικότητά τους ποικίλει από 1-20 ppm. Το ελαιόλαδο που προέρχεται από μαύρες ελιές περιέχει κυρίως φαιοφυτίνες.

β) Καροτενοειδή: κυρίως απαντώνται η λεπτίνη, το β-καροτένιο, η βιολαξανθίνη και η νεοξανθίνη. Κατά την ωρίμανση του καρπού η λεπτίνη είναι αυτή που κυριαρχεί δεδομένου ότι οι χλωροφύλλες καταστρέφονται. Τα καροτενοειδή απαντούν σε ποσότητες 1-20 ppm (Κυριτσάκης 1988, Boskou 1996).

1.1.9 Στερόλες

Κυρίως απαντώνται σιτοστερόλη, σιγμαστερόλη, Δ^5 -ανεμαστερόλη αλλά και χοληστερόλη, καμπεστερόλη, σιγμαστερόλη, β-σιτοστερόλη και ανεμαστερόλη. Η συνολική περιεκτικότητα του ελαιολάδου σε στερόλες κυμαίνεται από 180-265 mg/100g. Όσο αυξάνεται ο χρόνος αποθήκευσης μειώνεται η περιεκτικότητα σε στερόλες (Κυριτσάκης 1988, Boskou 1996).

1.1.10 Αρωματικά συστατικά

Το χαρακτηριστικό του άρωμα και η ευχάριστη γεύση του ελαιολάδου οφείλονται στην παρουσία γευστικών και αρωματικών συστατικών. Σε 40 περίπου συστατικά αποδίδεται το χαρακτηριστικό άρωμα του ελαιολάδου. Τα συστατικά που επιδρούν στη γεύση και το άρωμα του ελαιολάδου είναι αλειφατικοί και αρωματικοί υδρογονάνθρακες, αλειφατικές και τερπενικές αλκοόλες, κετόνες, αιθέρες, εστέρες, φουράνιο, αλδεΐδες κ.α.. Με τον χρόνο αποθήκευσης τα παραπάνω συστατικά καταστρέφονται. Η περιεκτικότητα των πτητικών αυτών ουσιών διαφοροποιείται ανάλογα με την ποικιλία, την περιοχή και το βαθμό ωρίμανσης (Κυριτσάκης 1988, Lercker and Rodriguez-Estrada, 2000).

1.1.11 Άλλα συστατικά

Διάφορες άλλες ενώσεις όπως μη γλυκεριδικοί εστέρες λιπαρών οξέων, δι-υδροξυ-τερπενικές αλκοόλες, 4 α μεθυλικές στερόλες, λιπαρές αλκοόλες, μονό και διγλυκερίδια απαντώνται στο ελαιολάδο (Boskou 1996).

2. ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΤΑΠΟΛΕΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΧΘΡΩΝ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Οι κυριότεροι εντομολογικοί εχθροί της ελιάς είναι ο δάκος (*Bactrocera oleae* Bern.), ο πυρηνοτρήτης (*Prays Olea* Bern.) και το λεκάνιο (*Saissetia oleae* Bern.). Ωστόσο ο σημαντικότερος εχθρός της ελιάς θεωρείται ο δάκος και ο μεγαλύτερος όγκος χημικών σκευασμάτων που χρησιμοποιείται σκοπό έχει την αντιμετώπιση του (Ποντίκης, 2001).

Η χημική καταπολέμηση του δάκου χωρίζεται σε θεραπευτική και προληπτική. Η θεραπευτική βασίζεται στην προνυμφοκτόνο δράση ορισμένων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (fenthion, dimethoate) εντός του ελαιοκάρπου. Η προληπτική βασίζεται στην προσήλωση και τη θανάτωση με πρωτεϊνούχους δολωματικούς ψεκασμούς (υδρολυμένη πρωτεΐνη και οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο), των ακμαίων του δάκου το καλοκαίρι. Παλαιότερα η προληπτική μέθοδος εφαρμόζονταν και από αέρος με αεροπλάνο (αεροψεκασμοί) (Πελεκάσης, 1991).

Από το 1995 έστω και καθυστερημένα η πολιτεία απαγόρευσε τους αεροψεκασμούς κατά του δάκου (απόφαση 3953/95 του Συμβουλίου Επικρατείας). Η απαγόρευση αυτή κρίθηκε αναγκαία δεδομένου της δυσμενούς επίδρασης των αεροψεκασμών στην πανίδα των ωφέλιμων εντομοφάγων αλλά και στους πληθυσμούς των μελισσών. Οι αεροψεκασμοί πέρα από τη διατάραξη της βιολογικής ισορροπίας του οικοσυστήματος, ευθύνονταν και για ποικίλες άλλες παρενέργειες δεδομένου ότι περίπου 150 tn διαφόρων οργανοφωσφορικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων διασκορπίζονταν στο παρελθόν κάθε χρόνο στον ελλαδικό χώρο (Πολυράκης, 2003).

Σήμερα η καταπολέμηση του δάκου γίνεται κυρίως με δολωματικούς ψεκασμούς από εδάφους με τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα fenthion και dimethoate. Οι ψεκασμοί συντονίζονται από το Υπουργείο Γεωργίας και τις κατά τόπους Διευθύνσεις Γεωργίας. Ενώ είναι στην ευχέρεια του κάθε παραγωγού να εφαρμόσει ψεκασμούς κάλυψης από εδάφους.

Πίνακας 2. Εγκεκριμένα φυτοφάρμακα για την καλλιέργεια της ελιάς

Μυκητοκτόνα	Εντομοκτόνα	Ζιζανιοκτόνα
Calcium copper sulfate	1,3-dichloropropene	Fenoxycarb
Copper hydroxide	1,7-dioxaspiro-5,5-undecan	Fenthion
Copper oxide	Alpha cypermethrin	λ-cyhalothrin
Copper oxychloride	Azinphos-methyl	Malathion
Copper sulfate	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i>	Methidathion
Copper sulfate, tri-basic	<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>	Methomyl
Dodine	Buprofezin	Petroleum oil
Ethylene-1,2-bisdithiocarbamates	Carbaryl	Spiroketal
Mancozeb	Chlorpyrifos-methyl	Teflubenzuron
Maneb	Cypermethrin	Triflumuron
Manganese	Deltamethrin	
Zinc	Diazinon	
Ziram	Diflubenzuron	
	Dimethoate	
	Endosulfan	

Πηγή: (Υπουργείο Γεωργίας, 2005)

Τα τελευταία χρόνια δοκιμάστηκαν και τα παρακάτω σκευάσματα: z-cypermethrin, b-cypermethrin, deltamethrin, b-cyfluthrin, l-cyhalothrin, spinosad . Το spinosad θεωρείται βιολογικό σκευάσμα με δραστική ουσία την τοξίνη του μύκητα *Saccharopolyspora spinosa* και οι συγκριτικές έρευνες του Υπουργείου Γεωργίας σήμερα εστιάζονται στην αντικατάσταση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων με αυτό (Πρακτικά Ημερίδας δακοκτονίας Χανιά, 2003).

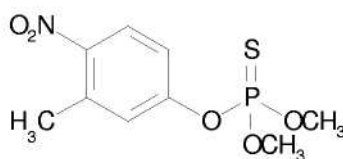
Αξίζει να αναφερθεί ότι στην Καλιφόρνια το 2001 για την προστασία της ελαιοκαλλιέργειας έγινε χρήση των παρασιτοκτόνων, Spinosad 3, Carbaryl, και Petroleum distillate δεδομένου ότι στην περιοχή αυτή η χρήση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων έχει απαγορευτεί (www.olivesource.com).

2.1 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που εξετάστηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν τα οργανοφωσφωρικά εντομοκτόνα fenitrothion, malathion, fenthion και parathion. Παράλληλα σαν εσωτερικό πρότυπο κατά την διαδικασία της αναλυτικής τεχνικής χρησιμοποιήθηκε το επίσης οργανοφωσφωρικό ethoprophos.

2.1.1 Fenitrothion (Sumithion, Folithion)

Το fenitrothion [O, O-dimethyl O-(4-nitro-m-tolyl) phosphorothioate] δρα ως παρεμποδιστής της χολινεστεράσης και έχει ακαραιοκτόνο και εντομοκτόνο δράση (Redden *et al.*, 1996).



Σχήμα 1. Μοριακή δομή του fenitrothion (Redden *et al.*, 1996)

- Συντακτικός Τύπος : $C_9H_{12}NO_5PS$
- Μοριακό Βάρος : 277.2

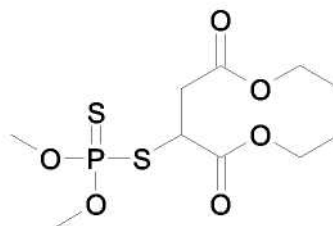
Το fenitrothion έχει κίτρινο καφέ χρώμα και αποσυντίθεται στους 140-145°C (0.1 mmHg) η πυκνότητα του είναι 1.32-1.34. Η διαλυτότητα του στο νερό στους 20°C είναι 5 mg/kg. Ενώ η διαλυτότητα του fenitrothion στη μεθανόλη και στην ακετόνη στους 22-25°C είναι >50 % w/w και στο εξάνιο <10 % w/w. Ο συντελεστής οκτανόλης νερού για το fenitrothion είναι $\log_{10}K_{ow}=3.43$ (οι ενώσεις με $K_{ow}>10^4$ θεωρούνται εξαιρετικά λιποδιαλυτές ενώ οι ενώσεις με $K_{ow}<10$ θεωρούνται υδρόφιλες) (Redden *et al.*, 1996).

Η μέση θανατηφόρος δόση LD₅₀ (η ικανή δόση να θανατώσει το 50 % των ζώων στα οποία θα δοκιμαστεί, εκφράζεται σε mg δραστικής ουσίας ανά kg ζώντος βάρους του πειραματόζωου) για το fenitrothion είναι LD₅₀=503 mg/kg (www.illo.org).

Ο FAO (Food and Agricultural Organization) έχει θεσπίσει τα ανώτερα όρια φυτοφαρμάκων τα οποία είναι αποδεκτά για τα τρόφιμα τις καλλιέργειες και το περιβάλλον. Σαν ανώτατα όρια υπολειμμάτων MRLs (Maximum Residue Levels or Limits) θεωρείται η ποσότητα των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων που επιτρέπεται να παραμένει στα γεωργικά (ή και κτηνοτροφικά) προϊόντα χωρίς να δημιουργείται κίνδυνος για την δημόσια υγεία και εκφράζεται σε mg/kg (Πολυράκης 2003). Η τιμή αυτή είναι πολύ χαμηλότερη από την θεωρητική ασφαλή τιμή. Η μέγιστη τιμή υπολειμμάτων είναι γνωστή και ως Residue Tolerance Level (Oudejans, 1991). Η τιμή του MRLs για το fenitrothion για το ελαιόλαδο είναι 0.5 mg/kg (76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC, και 90/642/EEC).

2.1.2 Malathion (Carbofos, Maliter)

Το malathion ή diethyl [(dimethoxyphosphino -thioyl)thio] butanedioate έχει εντομοκτόνο δράση. Η καθαρή ουσία είναι άχρωμη και η πυκνότητα του είναι 1.23. Η διαλυτότητα του στο νερό στους 20°C είναι 145 mg/l ενώ είναι διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Ο συντελεστής οκτανόλης νερού για το malathion είναι log₁₀K_{ow}=2.75 (EPA, 1996).



Σχήμα 2. Μοριακή δομή του malathion (EPA, 1996)

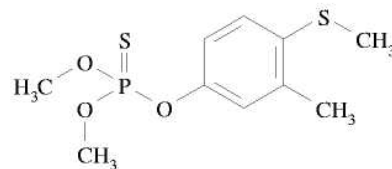
- Συντακτικός Τύπος : $C_{10}H_{19}O_6PS_2$
- Μοριακό Βάρος : 330.3

Η μέση θανατηφόρος δόση για το malathion είναι $LD_{50} = 2100 \text{ mg/kg}$ (www.illo.org)

Η τιμή του MRLs για το malathion για το ελαιόλαδο είναι 0.5 mg/kg (76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC, και 90/642/EEC).

2.1.3 Fenthion (Lebaycid, Baytex)

Το fenthion ή [O,O-dimethyl O-(4-(methylthio)-m-tolyl)phosphorothioate] έχει εντομοκτόνο δράση. Η καθαρή ένωση είναι άχρωμη και η πυκνότητα του είναι 1.25. Η διαλυτότητα του στο νερό είναι 55 mg/l ενώ είναι διαλυτό σε όλους τους οργανικούς διαλύτες. Ο συντελεστής οκτανόλης νερού για το fenthion είναι $\log K_{ow} = 4.09$ (Hazel *et al.*, 1999).



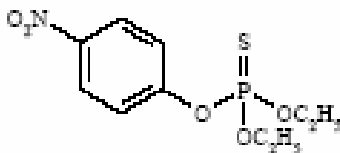
Σχήμα 3. Μοριακή δομή του fenthion (Hazel *et al.*, 1999).

- Συντακτικός Τύπος : $C_{10}H_{15}O_3PS$
- Μοριακό Βάρος : 278.3

Η μέση θανατηφόρος δόση για το fenthion είναι $LD_{50} = 586 \text{ mg/kg}$ (www.illo.org), ενώ η τιμή του MRLs για το ελαιόλαδο είναι 1 mg/kg (Tsatsakis *et al.*, 2003).

2.1.4 Parathion (Folidol, Forferno, Niran)

Το parathion ή [O,O-diethyl O-p-nitrophenyl phosphorothioate] έχει εντομοκτόνο δράση. Η καθαρή ένωση έχει απαλό κίτρινο χρώμα και η πυκνότητά του είναι 1.26. Η διαλυτότητα του parathion στο νερό στους 25°C είναι 24 mg/kg, ενώ διαλύεται στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Ο συντελεστής οκτανόλης νερού για το parathion είναι $\log K_{ow}=3.83$ (Dockter *et al.*, 1999).



Σχήμα 4. Μοριακή δομή του parathion (Dockter *et al.*, 1999)

- Συντακτικός Τύπος : $C_{10}H_{14}NO_5PS$
- Μοριακό Βάρος : 291.26

Η μέση θανατηφόρος δόση για το parathion είναι $LD_{50}=13$ mg/kg (www.illo.org), ενώ τη τιμή του MRLs για το ελαιόλαδο είναι 0.5 mg/kg (76/895/EEC, 86/362/EEC, 86/363/EEC, και 90/642/EEC).

2.2 Τοξικότητα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων

Η τοξικότητα των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων οφείλεται κυρίως στην ικανότητα τους να παρεμποδίζουν την δράση του ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης στο νευρικό σύστημα. Η ακετυλοχολινεστεράση είναι υπεύθυνη για την αποδόμηση της ακετυλοχολίνης, που λειτουργεί σαν διαβιβαστής των νευρικών διεγέρσεων. Η μη αποδόμηση της ακετυλοχολίνης έχει ως αποτέλεσμα την ελευθέρωση της στους νευρώνες του Κεντρικού Νευρικού Συστήματος με πιθανή κατάληξη την παράλυση. Επίσης αρκετά

οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα έχουν κατηγορηθεί για καρκινογένεση και τερατογένεση (Hughes, 1996).

Ωστόσο τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα που εξετάζονται στην παρούσα μελέτη ανήκουν σε μια ευρύτερη κατηγορία ενώσεων που δύνανται να προκαλέσουν ενδοκρινικές διαταραχές (Endocrine Disrupting Compounds). Οι ενώσεις της κατηγορίας αυτής χαρακτηρίζονται ως εξωγενείς παράγοντες που παρεμβάλλονται στην παραγωγή, απελευθέρωση, μεταφορά, μεταβολισμό, δράση και καταστροφή των φυσικών ορμονών του σώματος που είναι υπεύθυνες για την διατήρηση της ομοιόστασης και της ρύθμισης της διεργασίας της ανάπτυξης (Birkett and Lester, 2003).

Έχει αποδειχθεί σύμφωνα με σχετικές έρευνες ότι το fenthion και το fenitrothion έχουν αντιανδρογόνο δράση (Kitamura *et al.*, 2003). Το parathion θεωρείται ότι δρα σαν παρεμποδιστής της αδρεναλίνης και το malathion ότι προκαλεί ενδοκρινικές διαταραχές (MRC Institute for Environment and Health, 2005).

3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΕΛΑΙΟΛΑΔΟ

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που έχουν την τάση να συσσωρεύονται στο ελαιόλαδο είναι τα λιποδιαλυτά. Σημαντικό είναι οι μέθοδοι ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε έλαια, να μπορούν να εντοπίσουν πολλά είδη διαφορετικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε μια μόνο ανάλυση.

Η πλέον συνηθισμένη μέθοδος ανίχνευσης υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων γενικά, είναι η αέρια χρωματογραφία (GC), μια μέθοδος που προαπαιτεί το διαχωρισμό των λιπιδίων από τη μήτρα του ελαιολάδου. Αυτό είναι ένα πολύ σημαντικό βήμα αφού έστω και μια αμελητέα ποσότητα λιπιδίων μπορεί να καταστρέψει τον εισαγωγέα, την τριχοειδή στήλη αλλά και τον ανιχνευτή. Οι περισσότερες μέθοδοι βασίζονται στο διαχωρισμό με εξάνιο ή ακετονιτρίλιο. Το κύριο μειονέκτημα των μεθόδων αυτών οφείλεται στο μεγάλο όγκο τοξικών οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται. Έτσι το τελικό προϊόν της εκχύλισης (που περιέχει και τον αναλύτη) έχει επίσης μεγάλο όγκο και πρέπει να ακολουθήσει εξάτμιση προκειμένου να γίνει εφικτή η εισαγωγή του, μέσω ένεσης, στην αέρια χρωματογραφία. Αυτό μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια του αναλύτη (Sanchez *et al.*, 2004).

Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων που εξετάστηκαν στην παρούσα εργασία εκτίθενται στη συνέχεια:

3.1 Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων ελαιολάδου για την ανίχνευση υπολειμμάτων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων malathion, fenitrothion, fenthion, parathion

Οι περισσότερες μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων ελαιολάδου που έχουν αναπτυχθεί είναι ουσιαστικά τροποποιήσεις της μεθόδου υγρής υγρής εκχύλισης (LLE) και σκοπό έχουν την δημιουργία φάσεως ελαιολάδου-διαλύτη και την μεταφορά των ρυπαντών ενώσεων στη φάση του διαλύτη.

3.1.1 Κλασσική μέθοδος υγρής υγρής εκχύλισης (Liquid Liquid Extraction, LLE)

Μια από τις κλασσικές μεθόδους LLE είναι αυτή που στηρίζεται στην εκχύλιση μέσω μίγματος ακετονιτριλίου κορεσμένου σε εξάνιο και μικρής ποσότητας νερού. Την πρώτη εκχύλιση ακολουθεί μια δεύτερη διαδοχική και οι δύο φάσεις του ακετονιτριλίου μαζί ξηραίνονται και αφού διαλυθούν σε ακετόνη εισάγονται στην στήλη της χρωματογραφίας. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τους Hiskia *et al.* (1998) για την ανίχνευση των parathion, malathion και fenthion. Οι Tsatsakis *et al.* (2002) χρησιμοποίησαν την μέθοδο αυτή για την ανίχνευση του fenthion. Οι Botitsi *et al.* (2004) χρησιμοποίησαν την ίδια μέθοδο για την ανίχνευση 8 οργανοφωσφορικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων μεταξύ των οποίων και τα fenthion και parathion. Τέλος οι Cabras *et al.* (1997) χρησιμοποίησαν την μέθοδο αυτή χωρίς την προσθήκη νερού και εφαρμόζοντας μια μόνο εκχύλιση.

Σε μια παραλλαγή της μεθόδου που έχει αναπτυχθεί και ο διαλύτης είναι μόνο ακετονιτρίλιο, η εκχύλιση γίνεται δύο φορές και ακολουθεί φυγοκέντρηση των δύο φάσεων ακετονιτριλίου και εισαγωγή στην στήλη της αέριας χρωματογραφίας. Την μέθοδο αυτή χρησιμοποίησαν οι Dugo *et al.* (2005) για την ανίχνευση 17 οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων μεταξύ των οποίων και τα fenthion και parathion.

Μια άλλη διαφοροποίηση της μεθόδου LLE είναι αυτή που στηρίζεται στην κλασσική μέθοδο LLE με εκχύλιση με εξάνιο αλλά ο καθαρισμός γίνεται με την βοήθεια στήλης πχ Extrelut-3. Την έκλουση βοηθάει ποσότητα ακετονιτριλίου και μεθανόλης. Το προϊόν της εκχύλισης εξατμίζεται, διαλύεται με ακετόνη και εισάγεται στην στήλη της αέριας χρωματογραφίας. Οι Rastrelli *et al.* (2002) ανέπτυξαν την μέθοδο αυτή για 18 οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα μεταξύ των οποίων ήταν και τα malathion, fenthion και parathion.

3.1.2 Μέθοδος εκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Κατά την προετοιμασία δειγμάτων ελαιολάδου μέσω SPE σκοπός είναι η απομάκρυνση των λιπιδίων από το δείγμα μέσω του υλικού με το οποίο έχει γεμίσει η στήλη.

Οι Niessner *et al.* (1999) χρησιμοποίησαν γυάλινη στήλη γεμισμένη με Poly(styrene-divinylbenzene). Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε για 10 φυτοπροστατευτικά προϊόντα (όχι μόνο οργανοφωσφορικά) συμπεριλαμβανομένου και του malathion.

Μια νέα καινοτόμος τεχνική είναι αυτή της μικροεκχύλισης στερεής φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή δεν απαιτείται καθαρισμός του δείγματος από τα λιπίδια επειδή η εκχύλιση γίνεται μέσω μιας ίνας. Το δείγμα θερμαίνεται και οι ενώσεις εξατμίζονται και παγιδεύονται στον υπερκείμενο χώρο του ελαιολάδου, όπου εκχυλίζονται μέσω μιας ίνας. Οι Tsoutsi *et al.* (2004) χρησιμοποίησαν την μέθοδο αυτή για την ανίχνευση 7 οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων μεταξύ των οποίων ήταν και τα fenthion, parathion και fenitrothion.

3.1.2 Συνδυασμένες τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων ελαιολάδου

Πολλές καινοτόμες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον καθαρισμό των λιπιδίων από τη μήτρα του ελαιολάδου με κοινό στόχο την απλοποίηση της διαδικασίας της εκχύλισης.

Οι Rizos *et al.* (2001) ανέπτυξαν μια μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων ελαιολάδου που στηρίζεται στην κατακρήμνιση των λιπιδίων του ελαιολάδου σε χαμηλή θερμοκρασία και τον διαχωρισμό αυτών με φιλτράρισμα. Η μέθοδος αναπτύχθηκε για 17 οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα μεταξύ των οποίων ήταν και τα fenthion και parathion.

Η τεχνική Gel Permeation Chromatography (GPC) έχει χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία δειγμάτων ελαιολάδου. Οι Vreuls *et al.* (1996) ανέπτυξαν την μέθοδο αυτή για 17 οργανοφωσφορικά σκευάσματα μεταξύ των οποίων ήταν και τα fenthion, parathion και fenitrothion.

Μια άλλη μέθοδος προετοιμασίας δειγμάτων ελαιολάδου στηρίζεται στον συνδυασμό αέριας και υγρής χρωματογραφίας. Οι Sanchez *et al.* (2004) ανέπτυξαν σχετική μέθοδο για 7 φυτοπροστατευτικά προϊόντα (όχι μόνο οργανοφωσφορικά) μεταξύ των οποίων και τα parathion και fenitrothion. Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή η υγρή χρωματογραφία συνδέεται με αέρια μέσω ενός φούρνου. Στην υγρή χρωματογραφία γίνεται απευθείας ένεση του ελαιολάδου χωρίς να προηγηθεί οποιαδήποτε προετοιμασία. Στην υγρή χρωματογραφία το στερολικό, γλυκεριδικό και σκουαλενικό κλάσμα απορρίπτεται στα απόβλητα, ενώ μόλις αρχίσει να εκλούεται το κλάσμα των φυτοφαρμάκων μια βαλβίδα το προωθεί προς τον φούρνο. Η αύξηση της θερμοκρασίας αεριοποιεί τις ενώσεις και τις προωθεί στη στήλη της αέριας χρωματογραφίας.

3.2 Μέθοδοι ενόργανης ανάλυσης για την ανίχνευση υπολειμμάτων των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων malathion, fenitrothion, fenthion, parathion

Κατά κύριο λόγο οι αναλύσεις δειγμάτων ελαιολάδου για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων γίνονται μέσω της τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας. Ο τύπος του ανιχνευτή που είναι συνδεδεμένος με την αέρια χρωματογραφία ποικίλει και διαδραματίζει καθοριστικό ρόλο στον καθορισμό των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου. Ανάλογα με το είδος της προετοιμασίας των δειγμάτων του ελαιολάδου και της αναλυτικής τεχνικής έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τύποι ανιχνευτών (Πίνακας 3).

Πίνακας 3. Μέθοδοι ανίχνευσης υπολειμμάτων οργανοφωσφορικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ελαιόλαδο

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΜΗΧΑΝΗΜΑ ΕΝΟΡΓΑΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ
LLE (Acetonitrile-hexane διπλή εκχύλιση)	GC-FPD (Botitsi <i>et al.</i> , 2004)
LLE (Acetonitrile-hexane μονή εκχύλιση)	GC-NPD (Cabras <i>et al.</i> , 1997)
LLE (Acetonitrile διπλή εκχύλιση)	GC-FPD (Dugo <i>et al.</i> , 2005)
LLE (hexane-acetonitrile με βοήθεια στήλης)	GC-NPD (Rastrelli <i>et al.</i> , 2002)
Low Temperature Clean up Method (acetonitrile-hexane-acetone)	GC-NPD (Rizos <i>et al.</i> , 2001)
GPC- GC (αζεοτροπικό ethyl acetate-cyclohexane)	GC-FID, GC-NPD (Vreuls <i>et al.</i> , 1996)
RPLC-GC TOTAD	GC-FID (Sanchez <i>et al.</i> , 2004)
SPE (Acetonitrile-hexane)	GC-ECD, GC-NCI-MS (Niessner <i>et al.</i> , 1999)
SPME	GC-FTD (Tsoutsi <i>et al.</i> , 2004)

4. ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ LPME (Liquid-Phase Microextraction)

Σύμφωνα με τους Psillakis and Kalogerakis (2003) παρά την πρόοδο που έχει γίνει στον τομέα της αναλυτικής χημείας, τα περισσότερα όργανα της αναλυτικής χημείας δεν μπορούν να χειριστούν τα δείγματα μαζί με την μήτρα από την οποία προέρχονται, έτσι το στάδιο της απομάκρυνσης των προς μελέτη ενώσεων (από τη μήτρα).

Οι κλασσικές μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων όπως η LLE έχουν χρησιμοποιηθεί υπερβολικά παρά το ότι θεωρούνται χρονοβόρες, πολύπλοκες και χρησιμοποιούν μεγάλη ποσότητα τοξικών οργανικών διαλυτών.

Η έρευνα γύρω από τις τεχνικές προετοιμασίας του δείγματος οδήγησε στην σμίκρυνση της κλασσικής μεθόδου LLE με την γενική ιδέα της σμίκρυνσης του όγκου της φάσης δότη (δείγμα) – δέκτη (διαλύτης).

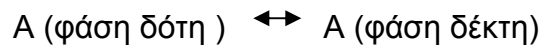
Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, οι δύο κύριες μέθοδοι που στηρίζονται στην παραπάνω τεχνική είναι η SDME (Single Drop Microextraction) στην οποία η φάση του δέκτη είναι μια σταγόνα διαλύτη και η LPME (Liquid Phase Microextraction) στην οποία η φάση του δέκτη είναι ένα λεπτό φιλμ διαλύτη. Η τελευταία χωρίζεται σε LPME δύο φάσεων και LPME τριών φάσεων. Ο όρος LPME αναφέρθηκε για πρώτη φορά για την τεχνική των δύο φάσεων.

Η πρώτη εφαρμογή της LPME αναπτύχθηκε από τους Rasmussen and Pedersen- Bjerregaard (1999), οι οποίοι χρησιμοποίησαν μια πορώδη κοίλη υδρόφοβη ίνα που περιείχε τον οργανικό διαλύτη. Η μέθοδος αυτή θεωρείται επαναστατική σε σχέση με τις προγενέστερες της επειδή περιλαμβάνει και τις δύο μεθόδους μικροεκχύλισης (LPME και SPME). Συγχρόνως είναι γρήγορη, οικονομική, κάνει ελάχιστη χρήση διαλύτη και μειώνει το φαινόμενο της μεταφοράς ουσιών από τον ένα προσδιορισμό στον άλλο (η ίνα αντικαθίσταται από μια νέα σε κάθε εκχύλιση).

4.1 Μέθοδος LPME α) δυο φάσεων β) τριών φάσεων

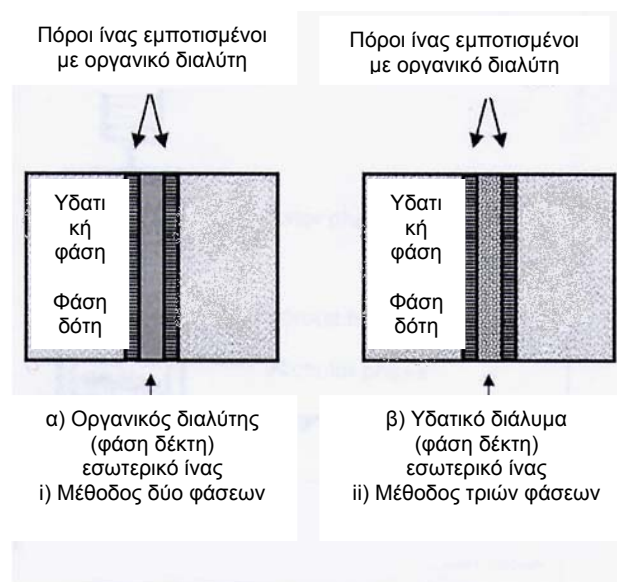
Ο όρος μικροεκχύλιση υγρής φάσης εισήχθη αρχικά για να περιγράψει το διφασικό σύστημα στην μικροεκχύλιση διαλυτών. Στην συνέχεια επικράτησε να χρησιμοποιείται στις διατάξεις που ανέπτυξαν οι Rasmussen και Pedersen-Bjerggaard (1999) (Psillakis and Kalogerakis, 2003).

α) LPME δύο φάσεων: Στην περίπτωση αυτή ο αναλύτης A εκχυλίζεται από ένα υδατικό δείγμα (δότης) μέσω ενός αδιάλυτου στο νερό διαλύτη ο οποίος βρίσκεται στους πόρους της ίνας και μεταφέρεται στο εσωτερικό της ίνας που περιέχεται ο ίδιος διαλύτης (δέκτης) (Σχήμα 6α). Η εκχύλιση περιγράφεται ως εξής:



και χαρακτηρίζεται από τον συντελεστή κατανομής $K_{org/d} = \frac{C_{eq,org}}{C_{eq,d}}$, ο οποίος

προσδιορίζεται σαν ο λόγος των συγκεντρώσεων του αναλύτη A στην φάση του δέκτη (org) και στη φάση του δότη (d) σε συνθήκες ισορροπίας (Ho *et al.* 2002).



Σχήμα 6 . Τομή κοίλης ίνας μέσα σε υδατική φάση δότη κατά τη μέθοδο i) δύο φάσεων και ii) τριών φάσεων (Psillakis and Kalogerakis, 2003).

Η LPME δύο φάσεων ενδείκνυται για αναλύτες που είναι περισσότερο διαλυτοί στην οργανική φάση από ότι στο υδατικό διάλυμα. Για την

επιτυχημένη εφαρμογή της μεθόδου δύο φάσεων απαιτείται υψηλός συντελεστής διανομής ο οποίος αντιστοιχεί σε πολύ υδροφοβικές ενώσεις. Το τελικό προϊόν της μεθόδου αυτής είναι οργανικής φάσης και είναι συμβατό με τις αναλυτικές μεθόδους GC, ενώ για να ακολουθήσει ανάλυση με HPLC και CE πρέπει να προηγηθεί εξάτμιση και νέα διάλυση σε υδατικό διάλυμα (Rasmussen and Pedersen-Bjergaard, 2004).

β) LPME τριών φάσεων: Στην περίπτωση αυτή ο αναλύτης A εκχυλίζεται από την υδατική φάση (δότης) μέσω ενός αδιάλυτου στο νερό οργανικού διαλύτη που είναι σταθεροποιημένος στους πόρους της ίνας και μεταφέρεται στο εσωτερικό της ίνας που περιέχει μια υδατική φάση (δέκτης). Η οργανική φάση δρα σαν μεταφορέας του αναλύτη και εμποδίζει την μίξη του δότη-δέκτη (Σχήμα 6β). Η εκχύλιση περιγράφεται ως εξής:



και χαρακτηρίζεται από τον συντελεστή διανομής $K_{org/d} = \frac{C_{eq,org}}{C_{eq,d}}$ και

$K_{a/org} = \frac{C_{eq,a}}{C_{eq,org}}$ μεταξύ οργανικής φάσης (org) και δότη (d) και μεταξύ δέκτη

(a) και οργανικής φάσης (org) αντίστοιχα.

Ο συνολικός συντελεστής διανομής μεταξύ δέκτη και δότη $K_{a/d}$ εκφράζεται ως:

$$K_{a/d} = \frac{C_{eq,a}}{C_{eq,d}} = K_{org/d} * K_{a/org}$$

Η σύνθεση του δέκτη και του δότη είναι πολύ σημαντική για την διεξαγωγή μιας επιτυχούς προσυγκέντρωσης με LPME τριών φάσεων (Ho *et al.* 2002).

Η εφαρμογή της LPME τριών φάσεων περιορίζεται στην περίπτωση βασικών και όξινων αναλυτών που έχουν την τάση να ιονίζονται. Στην περίπτωση που ο αναλύτης είναι βασικός το pH του διαλύματος του δότη πρέπει να είναι χαμηλό ώστε να μειωθεί η διαλυτότητα του αναλύτη σε αυτό, αντιστρόφως το pH του διαλύματος του δέκτη πρέπει να είναι όξινο ώστε να προάγεται η διαλυτότητα του αναλύτη. Με τον τρόπο αυτό οι βασικοί αναλύτες μπορούν να εκχυλιστούν στο διάλυμα του δέκτη χωρίς τον κίνδυνο της εκχύλισης τους ξανά στο διάλυμα του δότη. Εν αντιθέσει στην περίπτωση που ο αναλύτης είναι όξινος το pH του διαλύματος του δότη πρέπει να είναι

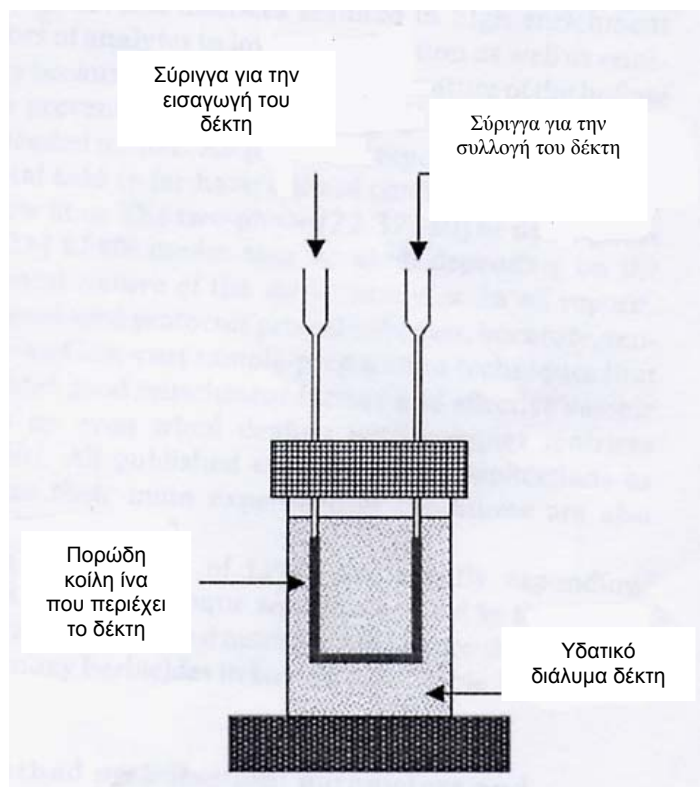
χαμηλό ενώ το pH του διαλύματος του δέκτη βασικό. Το τελικό προϊόν της μεθόδου είναι υδατικής φάσης και είναι συμβατό με τις μεθόδους HPLC και CE (Rasmussen and Pedersen-Bjergaard, 2004).

4.2 Περιγραφή χρήσης της ίνας στην LPME

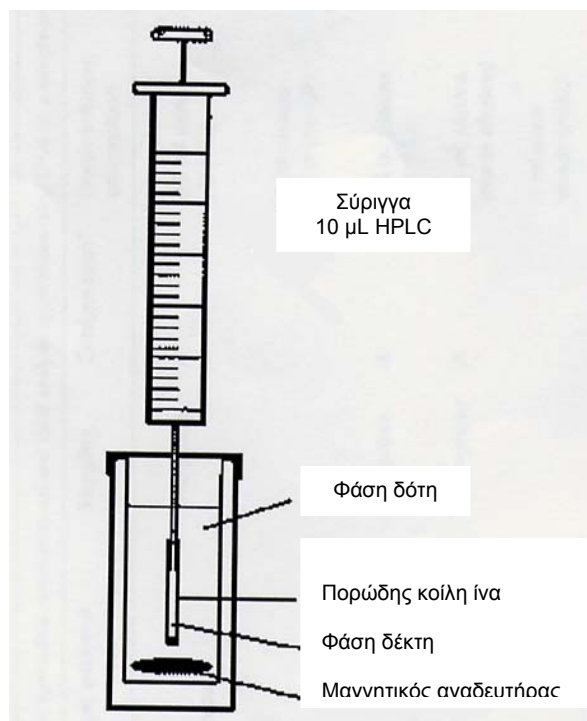
Υπάρχουν δύο τρόποι για να χρησιμοποιηθεί η ίνα στην μέθοδο LPME δύο ή τριών φάσεων.

Στην πρώτη περίπτωση δύο συνηθισμένες ιατρικές βελόνες από σύριγγες έχουν σταθεροποιηθεί σε ένα ελαστικό πώμα (septum) και έχουν συνδεθεί στις άκρες με ένα κομμάτι ίνας το μήκος της οποίας ποικίλει από 4-8 cm ή και περισσότερο. Η ίνα βυθίζεται για λίγα δευτερόλεπτα στον οργανικό διαλύτη για να εμποτιστεί με αυτόν. Ακολούθως ο σχηματισμός ίνας-βελονών βυθίζεται στο υδατικό διάλυμα του δότη που βρίσκεται μέσα σε γυάλινο δοχείο και ακινητοποιείται με κάποιο υλικό στο στόμιο του γυάλινου δοχείου (Σχήμα 7). Με τη βοήθεια μια μικροσύριγγας το διάλυμα του δέκτη εισάγεται στο κοίλο χώρο της ίνας και αφού η μικροεκχύλιση ολοκληρωθεί το πλέον εμπλουτισμένο με τον αναλύτη διάλυμα του δέκτη συλλέγεται και υποβάλλεται σε ανάλυση (Psillakis and Kalogerakis, 2003). Η χρήση της παραπάνω διάταξης έχει δώσει άριστα αποτελέσματα, ωστόσο θεωρείται αρκετά δύσχρηστη (Rasmussen and Pedersen-Bjergaard, 2004).

Στην δεύτερη περίπτωση μια βελόνα ιατρικής σύριγγας στερεοποιείται σε ένα ελαστικό πώμα (septum) και στην άκρη της συνδέεται ένα κομμάτι πορώδους κοίλης ίνας ενώ το άλλο άκρο της ίνας είναι ελεύθερο (Σχήμα 8). Αφού όπως και παραπάνω οι πόροι της ίνας τροφοδοτηθούν με τον κατάλληλο οργανικό διαλύτη, εισάγεται το διάλυμα του δέκτη στην βελόνα μέσω μιας μικροσύριγγας. Μετά την ολοκλήρωση της εκχύλισης το διάλυμα του δέκτη επαναρροφάται και υποβάλλεται σε ανάλυση (Psillakis and Kalogerakis, 2003).



Σχήμα 7. Σχηματική αναπαράσταση κοίλης πορώδους ίνας όταν συνδέεται με δύο βελόνες (Psillakis and Kalogerakis, 2003).



Σχήμα 8. Σχηματική αναπαράσταση πορώδους κοίλης ίνας συνδεδεμένη με μια μικροσύριγγα (Psillakis and Kalogerakis, 2003)

4.3 Χαρακτηριστικά πορώδους κοίλης ίνας

Η ίνα πρέπει να είναι υδρόφοβη και συμβατή με τον διαλύτη που χρησιμοποιείται. Συνίσταται η τριχοειδής μεμβράνη πολυπροπυλενίου. Συνήθως η διάμετρος της ίνας είναι περίπου της τάξεως των 600 μm , και η διάμετρος των τοιχωμάτων της είναι της τάξεως των 200 μm . Η διάμετρος των πόρων της κυμαίνεται από 0.2 έως 0.64 μm έτσι ώστε να διασφαλίζεται επαρκές φιλτράρισμα, ενώ παράλληλα να επιτρέπεται η είσοδος των μορίων του αναλύτη (Psillakis and Kalogerakis, 2003).

4.4 Οργανικός διαλύτης

Η επιλογή του κατάλληλου οργανικού διαλύτη είναι πολύ σημαντική για την επιτυχία της μεθόδου. Είναι γνωστό ότι οι διάφοροι οργανικοί διαλύτες έχουν διαφορετική πολικότητα και διαφορετική διαλυτότητα στο νερό, έτσι τα παραπάνω θα πρέπει να διερευνηθούν πριν την τελική επιλογή. Μπορεί να χρησιμοποιηθούν και μίγματα οργανικών διαλυτών (Psillakis and Kalogerakis, 2003).

Η μικρή διαλυτότητα του διαλύτη στο νερό είναι αναγκαία ώστε να αποφεύγεται η διάλυση του στην υδατική φάση. Συγχρόνως απαραίτητο είναι η μειωμένη πητικότητα του διαλύτη έτσι ώστε να μην εξατμίζεται κατά την διάρκεια της εκχύλισης. Στην περίπτωση της μεθόδου δύο φάσεων ο οργανικός διαλύτης πρέπει να παρέχει υψηλή διαλυτότητα για τις προσδιοριζόμενες ουσίες ενώ στην περίπτωση της μεθόδου τριών φάσεων ο οργανικός διαλύτης πρέπει να εξασφαλίζει υψηλό $K_{org/d}$ και κυρίως υψηλό $K_{a/org}$. Επιπλέον όταν ακολουθεί ανάλυση με GC ο διαλύτης πρέπει να έχει εξαιρετική χρωματογραφική συμπεριφορά. Τέλος και στις δύο περιπτώσεις η πολικότητα του οργανικού διαλύτη πρέπει να ταιριάζει με αυτή της ίνας πολυπροπυλενίου έτσι ώστε να τροφοδοτεί γρήγορα τους πόρους της. (Psillakis and Kalogerakis, 2003).

4.5 Άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την μέθοδο

Σύμφωνα με τους Psillakis and Kalogerakis (2003), άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν την μέθοδο είναι:

- Ανάδευση του δείγματος: κρίνεται πολύ σημαντική για την αύξηση της κινητικής της εκχύλισης, επιπλέον ο αναλύτης έρχεται σε επαφή με την επιφάνεια της ίνας. Στην μέθοδο αυτή η ανάδευση γίνεται είτε με μαγνήτη είτε με δονητή, που προτιμάται γιατί με τη χρήση μαγνήτη ενδέχεται να ρυπανθεί το δείγμα από το τεφλόν το οποίο περιβάλλει τον μαγνήτη. Συγχρόνως μεγάλες ταχύτητες ανάδευσης με μαγνήτη πιθανόν να δημιουργήσουν ανεπιθύμητες φυσαλίδες αέρα που επικάθονται στην επιφάνεια της ίνας επηρεάζοντας έτσι την ακρίβεια των μετρήσεων.
- Προσθήκη άλατος: ανάλογα με τους σκοπούς της ανάλυσης η προσθήκη άλατος μπορεί να μειώσει την διαλυτότητα του αναλύτη στο δότη και να προάγει την εκχύλιση. Ωστόσο έρευνα που έχει γίνει έδειξε ότι η προσθήκη άλατος μπορεί να προάγει, να μην επηρεάσει ή και να περιορίσει την εκχύλιση και αυτό οφείλεται στην αύξηση του ιονικού δυναμικού του υδατικού διαλύματος.
- Όγκοι δότη και δέκτη: γενικότερα και στις δύο μεθόδους δύο και τριών φάσεων η ευαισθησία αυξάνεται μειώνοντας τον λόγο των όγκων δέκτη-δότη. Όμως ο όγκος του δέκτη εξαρτάται και από την αναλυτική τεχνική που θα ακολουθήσει, για παράδειγμα η HPLC μπορεί να αναλύσει μεγαλύτερες ποσότητες διαλύτη (10-25 μ l) από ότι το GC (<5 μ l).
- Ρύθμιση pH: μπορεί να προάγει την εκχύλιση δεδομένου ότι η ισορροπία αλλά και ο διαχωρισμός επηρεάζεται από τη διαλυτότητα του όξινου ή βασικού αναλύτη. Υπάρχουν πολλές αναφορές για αύξηση της προσυγκέντρωσης με ρύθμιση του pH.
- Χρόνος εκχύλισης: η μεταφορά της μάζας εξαρτάται από το χρόνο και το ποσοστό της μειώνεται όσο το σύστημα φτάνει σε ισορροπία. Αν και μεγαλύτεροι χρόνοι εξασφαλίζουν καλύτερη εκχύλιση η πρακτική αυτή

δεν εφαρμόζεται. Συνήθως εφαρμόζονται χρόνοι εκχύλισης μικρότεροι από το συνολικό χρωματογραφικό χρόνο. Οι Rasmussen and Pedersen-Bjergaard, (2004) αναφέρουν ότι μικροί χρόνοι εκχύλισης πριν το σύστημα φτάσει σε ισορροπία (10 min) είναι ισοδύναμοι με χρόνους εκχύλισης κατά τους οποίους το σύστημα έχει φτάσει σε ισορροπία (30-45 min), σε ότι αφορά τη γραμμικότητα και την επαναληψιμότητα.

4.6 Εφαρμογές της LPME

α) Βιοϊατρική: Τα πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσης που εξασφαλίζει η μέθοδος αυτή ($\mu\text{g/l}$) την καθιστούν ιδανική για την ανίχνευση ναρκωτικών σε βιολογικά υγρά όπως αίμα, πλάσμα, ούρα κ.α. Σημαντικό είναι ότι η μέθοδος αυτή καθαρίζει το δείγμα κατά την προσυγκέντρωση από μακρομόρια και άλλες ενώσεις που μπορεί να παρέμβουν στην ανάλυση. Για τις περισσότερες βιοϊατρικές εφαρμογές χρησιμοποιείται η μέθοδος των τριών φάσεων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα περισσότερα ναρκωτικά έχουν χαμηλό ποσοστό διανομής $K_{org/d}$, συνήθως χρησιμοποιούνται και οι δύο σχηματισμοί της κοίλης ίνας (Σχήμα 7, 8) (Psillakis and Kalogerakis, 2003).

β) Περιβαλλοντικές, ανάλυση τροφίμων: η μεγάλη ικανότητα προσυγκέντρωσης των αναλυτών και η μεγάλη επιλεκτικότητα της μεθόδου αυτής καθιστούν ιδανική την εφαρμογή της στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων από διάφορες μήτρες. Συνήθως χρησιμοποιείται ο σχηματισμός με την μια μικροσύριγγα (Σχήμα 8). Η επιλογή της μεθόδου δύο ή τριών φάσεων εξαρτάται από το είδος των αναλυτών που επιθυμείται να ανιχνευτούν (Psillakis and Kalogerakis, 2003).

Στην περίπτωση της ανάλυσης τροφίμων η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε αγελαδινό γάλα (Rasmussen and Pedersen-Bjergaard, 2004). Οι Gonzales-Penas *et al.* (2004) χρησιμοποίησαν την μέθοδο LPME για την ανίχνευση της Α-ωχρατοξίνης σε δείγματα κρασιού.

5. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

5.1 Εισαγωγή

Ως χρωματογραφία ορίζεται η τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μίγματος, κατά την οποία τα συστατικά κατανέμονται ανάμεσα σε δύο μη αναμειγνυόμενες φάσεις, η μια από τις οποίες είναι η στατική, ενώ η άλλη κινούμενη (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεά ή υγρή υποστηριζόμενη από ένα στερεό ή μια πηκτή και μπορεί να βρίσκεται πακτωμένη σε στήλη, τοποθετημένη ως στιβάδα ή ως υμένιο. Η κινητή φάση μπορεί να είναι υγρή ή αέρια, ή υπερκρίσιμο ρευστό (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

Οι διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την φύση της κινητής φάσης, τη φύση και τη μορφή της στατικής φάσης, ως προς τον μηχανισμό που γίνεται ο διαχωρισμός και ως προς τον τρόπο εισαγωγής του δείγματος στη στατική φάση (Χατζηιωάννου και Κουππάρης, 2002).

Πίνακας 4. Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών (Χατζηγιάννου και Κουτπάρης, 2002)

ΦΥΣΗ ΤΗΣ ΚΙΝΗΤΗΣ ΚΑΙ ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ	Liquid Chromatography	Liquid Solid Chromatography Liquid Liquid Chromatography
	Gas Chromatography	Gas Solid Chromatography Gas Liquid Chromatography
ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟΥ	Adsorption Chromatography	
	Ion Exchange Chromatography	
	Partition Chromatography	
	Molecular Exclusion Chromatography	
	Affinity Chromatography	
ΦΥΣΙΚΗ ΜΟΡΦΗ ΣΤΑΤΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ	Column Chromatography	Packed Column Chromatography Open Capillary Chromatography
	Planar Chromatography	
ΤΡΟΠΟΣ ΕΙΣΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΚΙΝΗΣΕΩΣ ΤΟΥ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	Frontal Chromatography	
	Elution Chromatography	

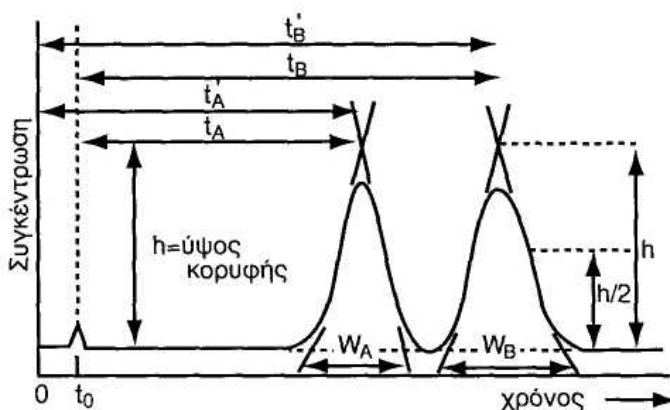
5.2 Ανάπτυξη χρωματογραφικού διαχωρισμού, η έννοια του χρωματογραφήματος

Κατά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό ενός μίγματος το συστατικό με τη μεγαλύτερη συγγένεια προς τη στατική φάση παραμένει στη στήλη για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα για το λόγο αυτό κάθε συστατικό μετακινείται με διαφορετική ταχύτητα, το τελευταίο αποτελεί και τη βάση του χρωματογραφικού διαχωρισμού (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

Η διεργασία διέλευσης της κινητής φάσης από τη χρωματογραφική στήλη καλείται **έκλουση** και για το λόγο αυτό η κινητή φάση καλείται και **εκλουστικό διάλυμα**. Τα συστατικά που εξέρχονται από την

χρωματογραφική στήλη ανιχνεύονται με διάφορους ανιχνευτές με βάση κάποια ιδιότητα (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

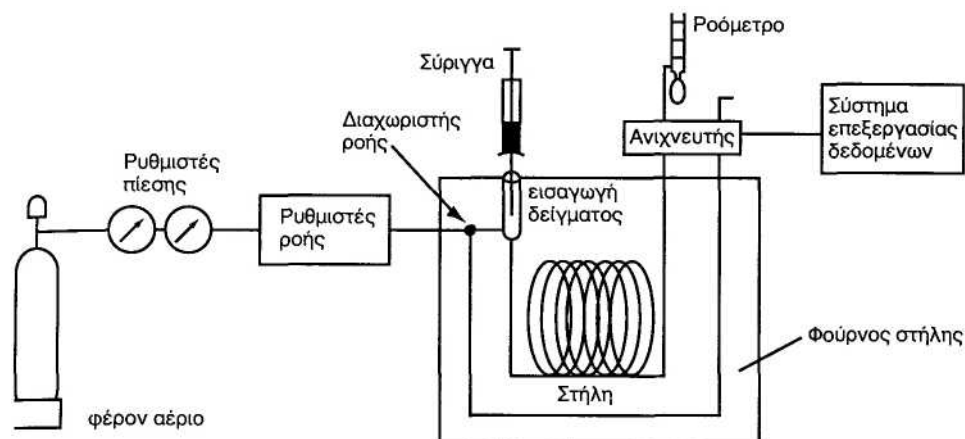
Κάθε συστατικό του διαλύματος αυτού δίνει μια κορυφή με τη μορφή της καμπύλης του Gauss. Η γραφική παράσταση της απόκρισης του ανιχνευτή ως προς το χρόνο έκλουσης αποτελεί το χρωματογράφημα. Ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό για να εξέλθει από τη στήλη και να φτάσει στον ανιχνευτή ονομάζεται χρόνος συγκράτησης t_R (retention time), ενώ ο όγκος της κινητής φάσης που απαιτείται για την έκλυση ενός συγκεκριμένου συστατικού από τη χρωματογραφική στήλη, ονομάζεται όγκος συγκράτησης V_R . Άλλες σημαντικές παράμετροι είναι το ύψος της κορυφής h και το εύρος της κορυφής W όπως φαίνεται στο Σχήμα 9 (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).



Σχήμα 9. Παράμετροι που περιγράφουν τις κορυφές ενός χρωματογραφήματος (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)

5.3 Διάταξη αέριου χρωματογράφου

Η διάταξη ενός αέριου χρωματογράφου δίνεται στο Σχήμα 10.



Σχήμα 10. Διάταξη Αέριου Χρωματογράφου (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)

Το σύστημα ενός αέριου χρωματογράφου αποτελείται από δύο τμήματα (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001):

- Το φέρον αέριο και το κύριο μέρος του χρωματογράφου, όπου γίνεται ο διαχωρισμός. Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί στον ανιχνευτή από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Συνήθως χρησιμοποιείται ήλιο, αργό, άζωτο και υδρογόνο, αλλά αυτό εξαρτάται από τον τύπο του ανιχνευτή που θα χρησιμοποιηθεί. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από προσμίξεις, υγρασία και οξυγόνο γιατί το τελευταίο δύναται να οξειδώσει την στατική φάση και να καταστρέψει τη στήλη. Το φέρον αέριο από τη φιάλη και τους ρυθμιστές παροχής οδηγείται στη στήλη. Μετά την εισαγωγή του δείγματος με τη σύριγγα το φέρον αέριο συμπαρασύρει και κινεί τα συστατικά του δείγματος κατά μήκος της στήλης όπου γίνεται ο διαχωρισμός αυτών.

Η στήλη αποτελεί και το κύριο μέρος του χρωματογράφου. Οι στήλες που

χρησιμοποιούνται είναι γυάλινες ή χαλύβδινες γεμισμένες με διάφορα υλικά ανάλογα με τα συστατικά που επιθυμείται ο διαχωρισμός τους. Τελευταία χρησιμοποιούνται τριχοειδείς γυάλινες στήλες μήκους μέχρι και 25 m και διαμέτρου μερικών mm. Η στήλη βρίσκεται μέσα σε φούρνο ακριβείας και οι αλλαγές της θερμοκρασίας του φούρνου επηρεάζουν την ταχύτητα και την ικανότητα διαχωρισμού.

- Το σύστημα ανίχνευσης, καταγραφής και αποτίμησης του σήματος. Ο ανιχνευτής τοποθετείται στο τέλος της στήλης και ανιχνεύοντας τα διάφορα συστατικά δίνει ηλεκτρικά σήματα. Τα σήματα αυτά ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μικροϋπολογιστή.

5.4 Φασματομετρία Μάζας

Η αναλυτική τεχνική ταυτοποίησης και προσδιορισμού μιας ουσίας από τις πληροφορίες που παρέχει το φάσμα των μαζών της, ονομάζεται φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry, MS). Η μορφή του φάσματος των μαζών, που λαμβάνεται κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες, είναι χαρακτηριστικό της αρχική ουσίας και στο γεγονός αυτό στηρίζεται η τεχνική αυτή (Χατζηιωάννου και Κουππάρης, 2002).

Ο φασματογράφος μάζας αποτελείται από:

- A) Σύστημα εισαγωγής, όπου επιτυγχάνεται η εξάτμιση των ενώσεων.
- B) Πηγή ιόντων ή σύστημα ιονισμού δείγματος, όπου παράγονται ιόντα από ουδέτερα μόρια στην αέρια φάση.
- Γ) Αναλυτή μάζας, όπου διαχωρίζονται τα ιόντα ανάλογα με το λόγο μάζας/φορτίο (m/z).
- Δ) Ανιχνευτή και καταγραφικό, όπου ανιχνεύονται και καταγράφονται τα διαχωρισμένα ιόντα.

Τα τέσσερα βασικά στάδια λειτουργίας ενός φασματογράφου μάζας είναι:

- I. Ο ιονισμός του δείγματος.
- II. Η επιτάχυνση των ιόντων από το ηλεκτρικό πεδίο.
- III. Η διασπορά των ιόντων με την αναλογία μάζα/φορτίο.

IV. Η ανίχνευση των ιόντων που παράγουν το αντίστοιχο ηλεκτρικό σήμα (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

5.5 Σύζευξη Φασματογράφου Μάζας με την Αέρια Χρωματογραφία

Σύμφωνα με τους Παπαδογιάννης και Σαμανίδου (2001) με την συνδυασμένη τεχνική GC-MS επιτυγχάνεται η κατεργασία και η εισαγωγή του δείγματος στον φασματογράφο μαζών με την αέρια χρωματογραφία, ενώ ο φασματογράφος μαζών αποτελεί τον ανιχνευτή της αέριας χρωματογραφίας.

Η σύζευξη τους αποτελεί ένα σημαντικό πρόβλημα δεδομένου ότι και τα δύο λειτουργούν με διαφορετική πίεση. Το GC λειτουργεί σε υψηλή πίεση ενώ το MS λειτουργεί σε υψηλό κενό. Η διάταξη σύζευξης (interface) αποτελείται από μια διάταξη εμπλουτισμού επειδή η συγκέντρωση του συστατικού που μεταφέρει το φέρον αέριο είναι πολύ μικρή. Η διάταξη αυτή μπορεί να είναι διαχωρισμός έκχυσης, άνοιγμα εκροής ή μεμβράνη. Με τον τρόπο αυτό το φέρον αέριο και τα συστατικά χαμηλού μοριακού βάρους απομακρύνονται και δεν εισέρχονται στον ανιχνευτή.

5.6 Εφαρμογές της Αέριας Χρωματογραφίας

Σύμφωνα με τους Χατζηγιάννου και Κουππάρης (2002), η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται ευρύτατα για ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, για ανίχνευση, για ταυτοποίηση και για προσδιορισμό οργανικών ουσιών σε πολύπλοκα δείγματα. Χρησιμοποιείται επίσης και στον προσδιορισμό διαφόρων φυσικοχημικών μεγεθών. Βασική προϋπόθεση για την εφαρμογή της τεχνικής είναι η πτητικότητα της χρωματογραφούμενης ουσίας στη θερμοκρασία της στήλης.

Οι σπουδαιότερες εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας μπορούν να απαριθμηθούν παρακάτω:

- Τρόφιμα (λιπίδια, πρωτεΐνες, συντηρητικά, αρωματικές ύλες κ.α.)
- Φάρμακα
- Προϊόντα πετρελαίου
- Βιομηχανίες αρωματοποιίας

- Περιβαλλοντικά δείγματα (PCBs, PAHs, καρβαμιδικές ενώσεις, οργανοφωσφορικές ενώσεις, οργανοχλωριωμένες ενώσεις)
- Τοξικολογία, δικονομική ανάλυση (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001)

Η ποιοτική ανάλυση ενός άγνωστου δείγματος γίνεται μέσω της σύγκρισης ενός χρωματογραφήματος γνωστού συνθετικού δείγματος που πάρθηκε στις ίδιες συνθήκες με το άγνωστο δείγμα (Χατζηιωάννου και Κουππάρης, 2002).

Για να χρησιμοποιηθεί ένα χρωματογράφημα ως βάση για την ποσοτική ανάλυση πρέπει α) το σήμα που δίνει να είναι ανάλογο της συγκεντρώσεως β) οι πειραματικές συνθήκες να είναι σταθερές γ) η απόκριση της γραφίδας του καταγραφέα να προσαρμόζεται προς το χρόνο απόκρισης του ανιχνευτή. Το εμβαδόν μια χρωματογραφικής κορυφής υπό ορισμένες προϋποθέσεις είναι ανάλογο της ποσότητας ενός συστατικού και χρησιμοποιείται για την χάραξη της καμπύλης αναφοράς (Χατζηιωάννου και Κουππάρης, 2002).

6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

6.1 Αντιδραστήρια και οργανολογία

- Ακετονιτρίλιο (SupraSolv grade), Merck (Darmstadt, Germany)
- Τολουόλιο (SupraSolv grade), Merck (Darmstadt, Germany)
- Απιονισμένο νερό, από σύστημα EASYpure RF της Barnstead/Thermolyne (Dubuque, USA)
- Ethoprophos 93.1 % HPLC, Riedel de Haen
- Malathion, 97.3 %, HPLC, Riedel de Haen
- Fenitrothion, 95.40 %, HPLC, Riedel de Haen
- Fenthion, 97.7 %, HPLC, Riedel de Haen
- Parathion, neat, Supelco
- Κοίλη μεμβράνη πολυπροπυλενίου (Accurel Q 3/2), πάχος τοιχωμάτων 200 μm , εσωτερική διάμετρος 600 μm , (Membrana, Wuppertal, Germany)
- Σύριγγα 10 μl Hamilton Gastight (Hamilton Bonaduz, Switzerland), Model 1701RNR, με αμβλεία βελόνα (5.1 cm length; 0.071 cm O.D.; 0.015 cm I.D.)
- Σύστημα GC-MS (Shimadzu GC-17A version 3, QP-5050A), Τριχοειδής στήλη 30 m x 0.25 mm HP-5MS (Agilent Technologies)
- Ελαστικό πώμα για το GC, Thermogreen LB-2 (Supelco)
- He (>99.999 % pure) ως φέρον αέριο στο GC με ρυθμό 1.2 ml/min
- Γυάλινα φιαλίδια των 7 ml (Supelco, Bellefonte USA)
- Μαγνητικός αναδευτήρας με γυάλινη επικάλυψη (8 x 3 mm)
- Συσκευή ανάδευσης Heidolph MR3001K, 800 W
- Έξτρα παρθένο ελαιόλαδο βιολογικής καλλιέργειας (Πιστοποίηση ΔΗΩ) Μονής Τοπλού Σητεία Κρήτης

6.2 Περιγραφή της μεθόδου

Τα δείγματα του ελαιολάδου “επιμολύνονταν” με τα 4 εντομοκτόνα σε συγκέντρωση 50 mg/kg για τις ανάγκες των καθημερινών αναλύσεων. Κατά τις αναλύσεις που έγιναν για την βελτιστοποίηση των παραμέτρων της μεθόδου, χρησιμοποιήθηκε έξτρα παρθένο ελαιόλαδο (Μονή Τοπλού, Σητεία) αφού προηγουμένως είχε ελεγχθεί με τη μέθοδο LPME για τυχόν υπολείμματα των τεσσάρων εντομοκτόνων.

Τα δείγματα του ελαιολάδου βάρους 5 g τοποθετούνταν σε γυάλινο φιαλίδιο των 7 ml. Στα δείγματα εφαρμόζονταν ανάδευση με χρήση μικρού μαγνητικού αναδευτήρα επικαλυμμένου με γυαλί στις 1000 στροφές ανά λεπτό (rpm).

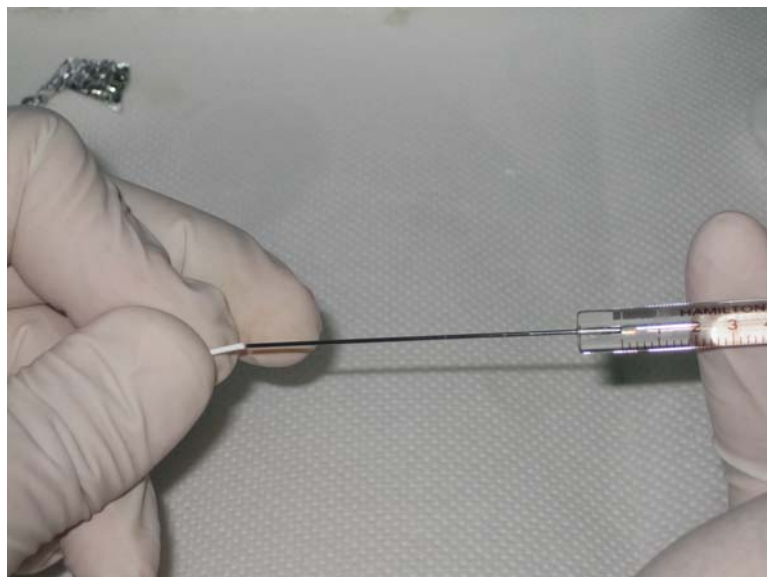
Στα πειράματα ποσοτικοποίησης έγινε χρήση της τεχνικής του εσωτερικού προτύπου κατά την οποία η καμπύλη αναφοράς κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας το λόγο του σήματος του συστατικού προς το σήμα του εσωτερικού προτύπου (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001). Συγκεκριμένα έγινε χρήση του λόγου A_i/A_{IS} όπου A_i είναι το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εντομοκτόνο και A_{IS} είναι το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στο εσωτερικό πρότυπο. Η χρήση του εσωτερικού προτύπου επιλέγεται για να ξεπεραστούν προβλήματα που προέρχονται από τυχαία και συστηματικά σφάλματα, καθώς τα σήματα του δείγματος και του εσωτερικού προτύπου θα επηρεάζονται στον ίδιο βαθμό, με αποτέλεσμα ο λόγος των σημάτων να είναι πιο σταθερός και επαναλήψιμος (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001).

Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 25 mg/kg από το εντομοκτόνο ethoprophos σε τολουόλιο. Το διάλυμα του εσωτερικού προτύπου αλλά και οι αμπούλες των εντομοκτόνων φυλάσσονταν σε σκοτεινό θάλαμο στους 4°C.

6.3 Εφαρμογή της τεχνικής μικροεκχύλισης LPME στα δείγματα του ελαιολάδου

Πρώτο βήμα ήταν η κοπή της μεμβράνης στο κατάλληλο μήκος. Κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν ίνες μήκους 1.3, 1.9, 2.6 cm. Το χαμηλό κόστος της ίνας επέτρεπε την χρησιμοποίηση μια νέας ίνας για κάθε ανάλυση. Μετά τον τεμαχισμό της ίνας ακολουθούσε καθαρισμός της μέσα σε ακετόνη σε υπέρηχους για 15 min.

Κατά την μικροεκχύλιση εισάγονταν στην σύριγγα 7 μ l οργανικού διαλύτη και εφαρμόζονταν η κοίλη ίνα στην άκρη της βελόνας (Εικόνα 1, 2) . Ακολούθως εμβαπτίζονταν η κοίλη ίνα στο φιαλίδιο με τον οργανικό διαλύτη για μερικά δευτερόλεπτα. Στο επόμενο βήμα πιέζοντας το έμβολο απομακρύνονταν η περίσσεια του οργανικού διαλύτη και διατηρούνταν 0.5 μ l διαλύτη μέσα στη σύριγγα. Η εισαγωγή της ίνας στο φιαλίδιο που έφερε το προς ανάλυση ελαιόλαδο γίνονταν γρήγορα και αφού με πίεση στο έμβολο ελευθερωνόταν η μικρή ποσότητα (0.5 μ l) του οργανικού διαλύτη, η εκχύλιση ξεκινούσε (Εικόνα 3). Το τελευταίο είχε σκοπό την ελαχιστοποίηση της εξάτμισης του οργανικού διαλύτη κατά την μεταφορά της ίνας από το ένα φιαλίδιο στο άλλο και την παρεμπόδιση δημιουργίας φυσαλίδας αέρος στο εσωτερικό μέρος της σύριγγας.

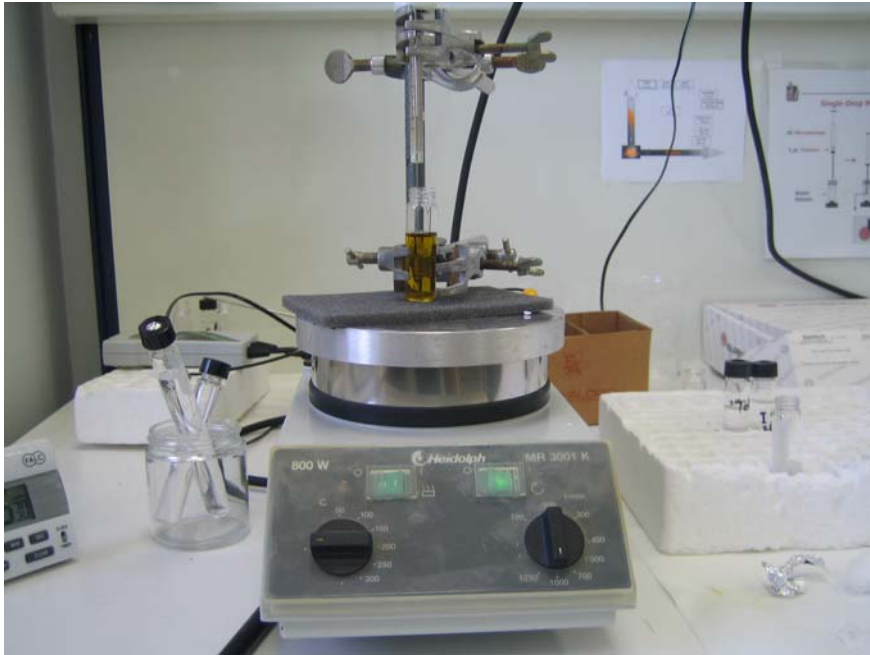


Εικόνα 1. Τοποθέτηση της κοίλης ίνας στην μικροσύριγγα

Με το πέρας του χρόνου εκχύλισης, 1.4 μl οργανικού διαλύτη αποτραβιόταν στο εσωτερικό της σύριγγας. Μετά την σταθεροποίηση του εμβόλου η κοίλη ίνα απομακρύνονταν από την μικροσύριγγα. Πριν την εισαγωγή του διαλύτη στο σύστημα GC-MS για ανάλυση καθαρίζονταν τα υπολείμματα ελαιολάδου από την άκρη της μικροσύριγγας με βαμβάκι με ακετόνη.



Εικόνα 2. Διάταξη της μικροσύριγγας με την ίνα



Εικόνα 3. Διάταξη εκχύλισης με LPME

6.4 Χρωματογραφική ανάλυση με αέρια χρωματογραφία με φασματογράφο μάζας (GC-MS)

Στο μηχάνημα GC-MS που χρησιμοποιήθηκε στις αναλύσεις το σύστημα εισαγωγής του δείγματος (injector) λειτουργούσε στους 270°C χωρίς διαμελισμό του δείγματος (splitless), με τη δίοδο διαχωρισμού να παραμένει κλειστή για 5 min.

Το φέρον αέριο, He διοχετεύονταν με ρυθμό 1.2 ml/min, ενώ το ελαστικό πώμα (septum) αλλάζονταν καθημερινά αφού προηγουμένως είχε τρυπηθεί.

Η θερμοκρασία του φούρνου αρχικά είχε ρυθμιστεί στους 80°C ενώ προγραμματιζόταν να αυξάνεται στους 250°C με ρυθμό 10°C/min.

Η θερμοκρασία της διεπιφάνειας (interface) ήταν ρυθμισμένη στους 300°C και η τάση του ανιχνευτή στα 1.40 V.

Ο ιονισμός των συστατικών του δείγματος γινόταν με σύγκρουση με ηλεκτρόνια (Electron Impact, EI).

Η ποσοτικοποίηση έγινε με τη χρήση ελέγχου επιλεγμένων ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM) και βασίζονταν στο σχηματισμό των ιονικών

θραυσμάτων (m/z), ethoprophos: 158, fenitrothion: 125 , malathion: 173 , fenthion: 277 , parathion: 291.

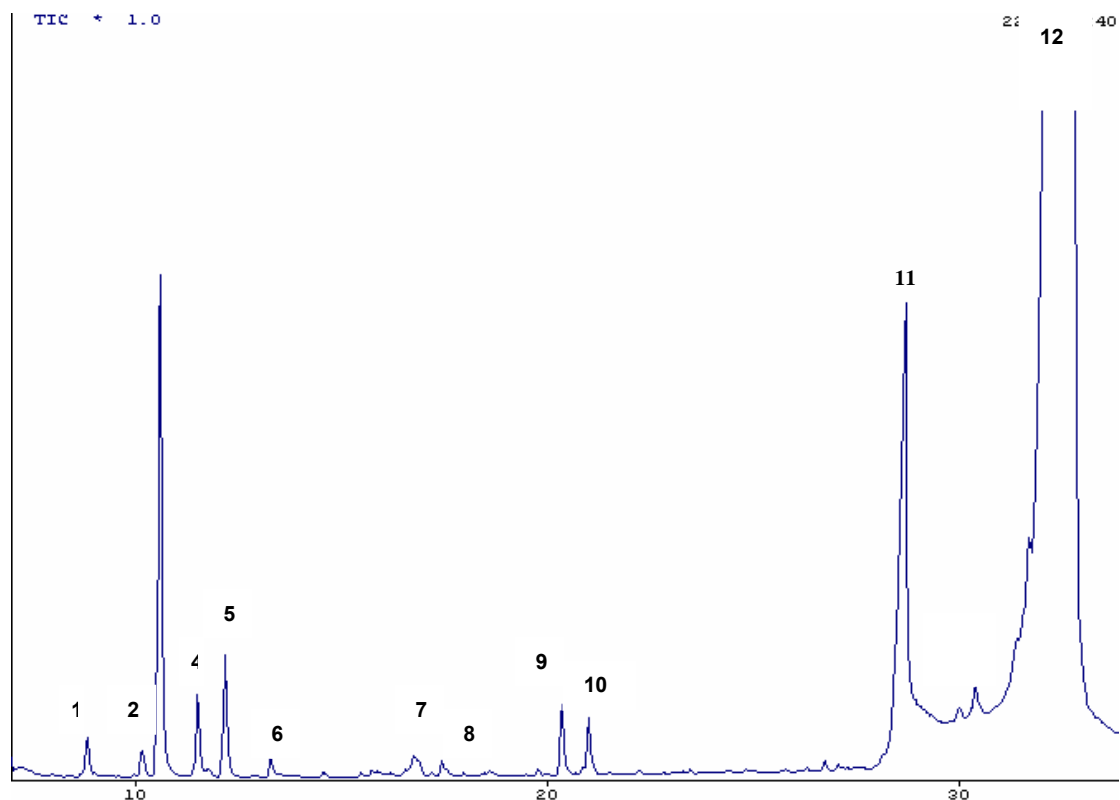
Πριν την χρήση της μεθόδου SIM για την ποσοτικοποίηση χρησιμοποιήθηκε πλήρες φάσμα (m/z: 50-465) για την ποιοτική αναγνώριση όλων των συστατικών.

7. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Συστατικά του ελαιολάδου που εκλούνται

Τα συστατικά του ελαιολάδου έχουν περιγραφεί εκτενώς στο Κεφάλαιο 2. Από τα συστατικά αυτά αρκετά εμφάνισαν καλή συγγένεια με τον οργανικό διαλύτη τολουόλιο και εκχυλίστηκαν κατά την εφαρμογή της LPME σε δείγμα ελαιολάδου βάρους 5 g, με μήκος ίνας 1.3 cm, χρόνο εκχύλισης 10 min και ανάδευση 1000 rpm.

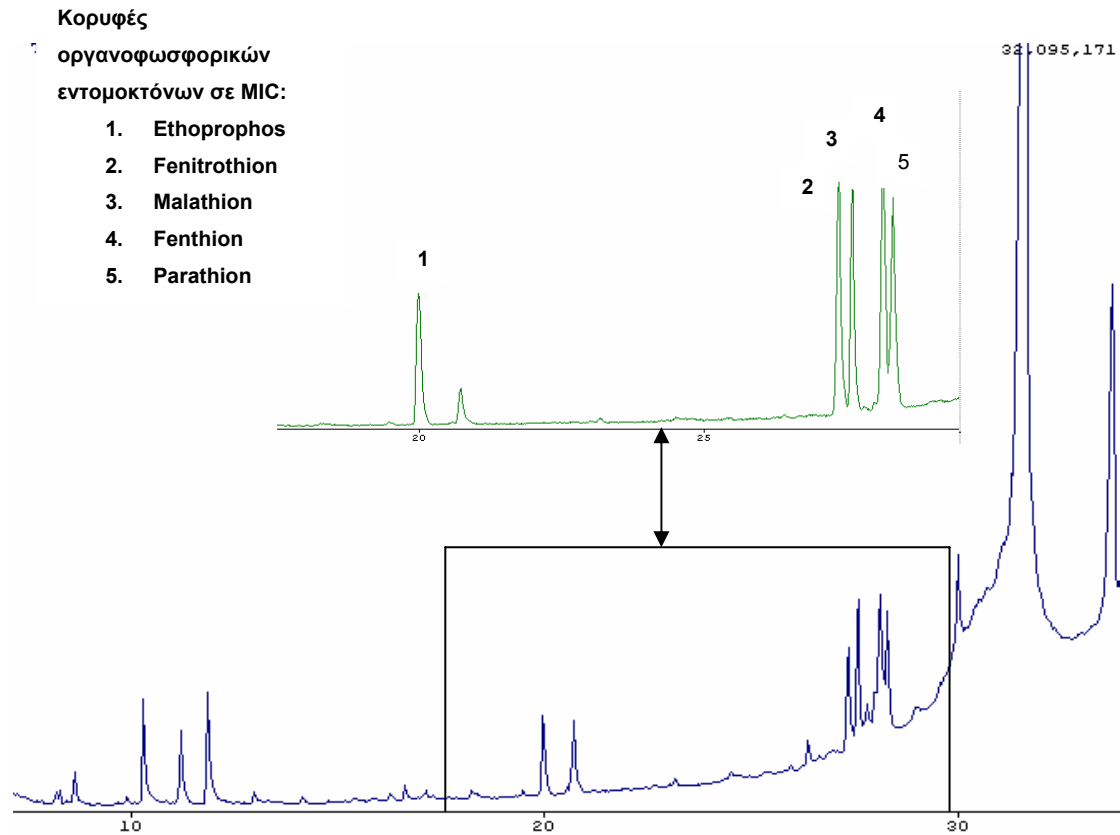
Τα εκλουόμενα συστατικά μετά από πλήρες φάσμα (full scan) αντιστοιχούν στις κορυφές της Εικόνας 4. Εν συνεχεία τα συστατικά αυτά ταυτοποιήθηκαν από το MS. Στον Πίνακα 5 αναγράφονται τα συστατικά που αντιστοιχούν στις κορυφές του χρωματογραφήματος της Εικόνας 4. Ο Συντελεστής Ομοιότητας (SI) εκφράζει την βεβαιότητα με την οποία μια ένωση ταυτοποιείται από την ηλεκτρονική βιβλιοθήκη του MS.



Εικόνα 4. Κορυφές που παρατηρούνται μετά από εκχύλιση LPME σε δείγμα ελαιολάδου

Πίνακας 5. Πιθανά εκλουόμενα συστατικά σε ένα χρωματογράφημα πλήρες φάσματος (full scan) δείγματος ελαιολάδου

Αριθμός	Όνομα Ένωσης	Μοριακό Βάρος	Χημικός Τύπος	Συντελεστής Ομοιότητας
1.	2 tridecene	182	C ₁₃ H ₂₆	94 %
	1 tridecanol	200	C ₁₃ H ₂₈ O	94 %
	2 tetradecene	196	C ₁₄ H ₂₈	93 %
	5 tetradecene	196	C ₁₄ H ₂₈	93 %
	2 dodecene	168	C ₁₂ H ₂₄	93 %
2.	2 methylene-cyclopentanol	98	C ₆ H ₁₀ O	85 %
	bicycle[3.1.1]hepta-3-ol, 2,6,6 trimethyl	154	C ₁₀ H ₁₈ O	85 %
	2 octenal	126	C ₈ H ₁₆ O	84 %
3.	2 decanal	154	C ₁₀ H ₁₈ O	96 %
	2 nonenal	140	C ₉ H ₁₆ O	92 %
	2 dodecanal	182	C ₁₂ H ₂₂ O	91 %
	2 tridecanal	196	C ₁₃ H ₂₄ O	91 %
	2 undecanal	168	C ₁₁ H ₂₀ O	91 %
4.	2,4-decadienal	152	C ₁₀ H ₁₆ O	95 %
	2 dodecanal	182	C ₁₂ H ₂₂ O	92 %
5.	2,4-decadienal,	152	C ₁₀ H ₁₆ O	97 %
6.	2 undecenal, undec2-onal	168	C ₁₁ H ₂₀ O	96 %
	2 dodecenal, dodece-1-al	182	C ₁₂ H ₂₂ O	94 %
	2 tridecenal	196	C ₁₃ H ₂₄ O	92 %
7.	benzeneethanol 4 hydroxy,	138	C ₈ H ₁₀ O ₂	95 %
	d tyrosine	181	C ₉ H ₁₁ NO ₃	85 %
8.	2,6,10-dodecatrien-1-ol 3,7,11 trimethyl,	222	C ₁₅ H ₂₆ O	85 %
9.	ethoprophos	242	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂	90 %
10.	8 heptadecene	238	C ₁₇ H ₃₄	97 %
	1 heptadecene	238	C ₁₇ H ₃₄	96 %
11.	n hexadecanoic acid	256	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	95 %
12.	oleic acid	282	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	80 %
	linoleic acid	280	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	80 %



Εικόνα 5. Κορυφές που αντιστοιχούν στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα μετά από εκχύλιση με LPME σε δείγμα ελαιολάδου

7.2 Επιλογή του διαλύτη

Η επιλογή του οργανικού διαλύτη συνιστά ένα πολύ σημαντικό βήμα για την βελτιστοποίηση της μεθόδου. Όπως ήδη αναφέρθηκε στο Κεφάλαιο 4.4 η πολικότητα του οργανικού διαλύτη οφείλει να ταιριάζει με αυτή της ίνας πολυπροπυλενίου έτσι ώστε να εμποτίζει γρήγορα τους πόρους της.

Πρέπει να αναφερθεί ότι στη μέθοδο LPME η ίνα πολυπροπυλενίου προστατεύει τον οργανικό διαλύτη και εμποδίζει την διαλυτοποίηση του στο δείγμα.

Κατά την πειραματική διερεύνηση για την εύρεση του βέλτιστου διαλύτη χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιολάδου βάρους 5 g “επιμολυσμένα” με 50

mg/kg από τα τέσσερα εντομοκτόνα, ενώ ο χρόνος εκχύλισης ήταν 10 min, η ταχύτητα ανάδευσης 1000 rpm και το μήκος ίνας 1.3 cm.

Οι διαλύτες που εξετάστηκαν πειραματικά ήταν το τολουόλιο, το εξάνιο το ακετονιτρίλιο και το μίγμα ακετονιτρίλιο και τολουόλιο σε αναλογία 1:1. Επίσης εξετάστηκε και η περίπτωση χρήσης διαφορετικού διαλύτη στο εσωτερικό της ίνας και διαφορετικού διαλύτη για εμποτισμό της ίνας. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η εισαγωγή ακετονιτριλίου μέσα στην ίνα και ο εμποτισμός αυτής με τολουόλιο είτε με εξάνιο.

Το πρόβλημα των περισσότερων οργανικών διαλυτών που εξετάστηκαν ήταν ότι εκχύλιζαν και άλλα συστατικά του ελαιολάδου όπως έχει ήδη αναφερθεί στο Κεφάλαιο 7.1. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα πολλές φορές να δημιουργείται αλληλοεπικάλυψη των κορυφών των διάφορων συστατικών του ελαιολάδου με τις κορυφές που αντιστοιχούσαν στα εντομοκτόνα. Το πρόβλημα αυτό λύθηκε με την χρήση του πίνακα MIC (Εικόνα 5).

Το ακετονιτρίλιο δεν εμφάνιζε το παραπάνω φαινόμενο λόγω της διαφορετικής πολικότητας με τα συστατικά του ελαιολάδου. Όμως δεν παρατηρήθηκε εκχύλιση των τεσσάρων εντομοκτόνων οπότε και απορρίφθηκε.

Οι υπόλοιποι διαλύτες που εξετάστηκαν εκχύλιζαν τα τέσσερα εντομοκτόνα ωστόσο η υπεροχή του τολουολίου έναντι αυτών, ήταν εμφανής.

Η επιλογή του τολουολίου ως βέλτιστου διαλύτη για τη μέθοδο LPME, έγινε βάση της καλύτερης συγγένειας του με τη συγκεκριμένη ίνα (καλύτερος εμποτισμός, μικρές απώλειες, εξάλειψη φυσαλίδων) καθώς και της καλύτερης δράσης του κατά την εκχύλιση.

Οι Labropoulou and Albanis (2005) κατά την εφαρμογή της μεθόδου LPME για την ανίχνευση εντομοκτόνων σε υδατικά δείγματα εξέτασαν τους διαλύτες εξάνιο, ισοοκτάνιο και τολουόλιο και κατέληξαν και αυτοί στο ότι ο βέλτιστος διαλύτης είναι το τολουόλιο. Αρκετές έρευνες που έχουν γίνει και αφορούν την εφαρμογή της μεθόδου LPME σε υδατικά δείγματα για άλλες ενώσεις έχουν καταλήξει και αυτές στο ίδιο συμπέρασμα (Charalabaki *et al.*, 2005), (Basher *et al.*, 2003), (Psillakis and Kalogerakis (b), 2003), (Pan and Ho, 2004).

7.3 Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης

Στα πειράματα που έγιναν για να επιλεχθεί η βέλτιστη ταχύτητα ανάδευσης χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιολάδου βάρους 5 g, “επιμολυσμένα” με 50 mg/kg από τα τέσσερα εντομοκτόνα. Εξετάστηκαν οι ταχύτητες ανάδευσης 0, 350, 500, 750, 1000, 1250 rpm με χρόνο ανάδευσης 10 min και μήκος ίνας 1.3 cm. Η ανάδευση γινόταν με μικρό μαγνητικό αναδευτήρα με γυάλινη επικάλυψη για την αποφυγή της μεταφοράς των εντομοκτόνων (carry over) από την μια ανάλυση στην άλλη και την αποφυγή της έκπλυσης ενώσεων από το πλαστικό περίβλημα του αναδευτήρα.

Όπως ήδη έχει αναφερθεί και στο Κεφάλαιο 4.5, η αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης ενδυναμώνει την εκχύλιση και αυξάνει την απόδοση, λόγω της αυξημένης διάχυσης των συστατικών διαμέσου της κοίλης ίνας. Η προστασία που παρέχει η ίνα στον διαλύτη επιτρέπει την εφαρμογή μεγάλων ταχυτήτων ανάδευσης χωρίς τον κίνδυνο της διαλυτοποίησής του στο δείγμα.

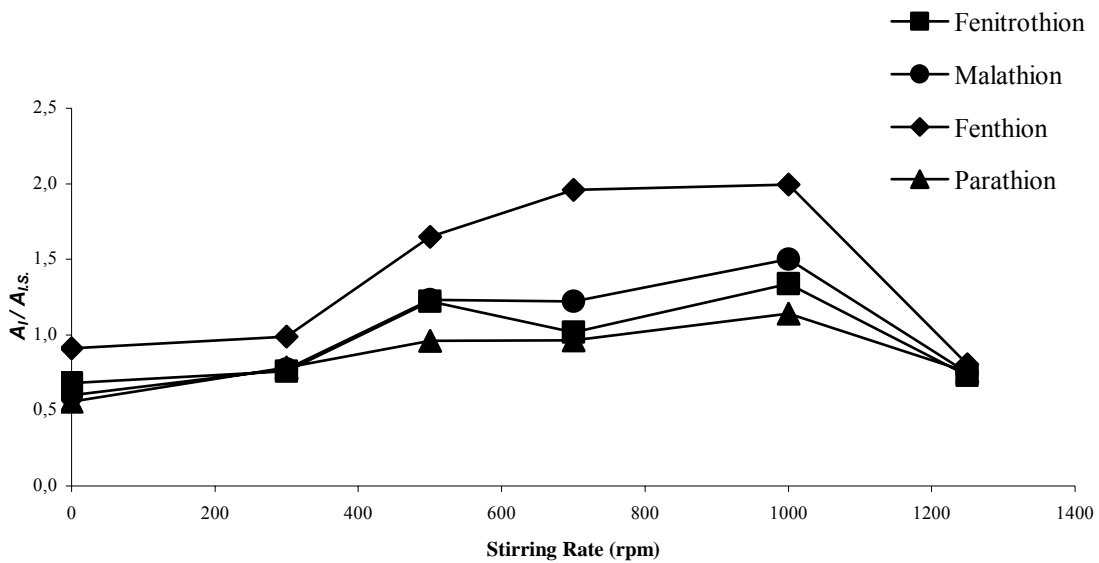
Στην περίπτωση εφαρμογής της LPME στο ελαιόλαδο, η σταδιακή αύξηση της ανάδευσης από τα 0 έως τα 1000 rpm επέφερε και αύξηση του λόγου A_i/A_{IS} (εμβαδόν κορυφής εντομοκτόνου / εμβαδό κορυφής εσωτερικού προτύπου) (Σχήμα 11). Η περαιτέρω αύξηση της ταχύτητας στα 1250 rpm επέφερε μια μικρή μείωση στον λόγο A_i/A_{IS} .

Η μείωση αυτή οφείλεται στις ανομοιόμορφες συνθήκες που δημιουργήθηκαν λόγω της έντονης ανάδευσης (στροβιλώδη ροή). Το παραπάνω προκάλεσε τη διαλυτοποίηση του διαλύτη στο δείγμα.

Οι Pan and Ho (2004) και οι Labropoulou and Albanis (2005) κατά την εφαρμογή της μεθόδου για την ανίχνευση μυκητοκτόνων και εντομοκτόνων σε υδατικά δείγματα αναφέρουν ότι η αυξημένη ταχύτητα ανάδευσης (> 800 rpm) προκαλούσε την δημιουργία φυσαλίδων πάνω στην ίνα με αποτέλεσμα να μειώνεται η ακρίβεια των μετρήσεων.

Επιπλέον έχει αναφερθεί ότι κατά τη εφαρμογή της μεθόδου LPME σε υδατικά δείγματα για άλλες οργανικές ενώσεις ότι ταχύτητες μεγαλύτερες των 1000 rpm μειώνουν την ακρίβεια των μετρήσεων (Psillakis and Kalogerakis (b), 2003, Charalabaki *et al.*, 2005).

Κατά συνέπεια, επιλέχθηκε σαν βέλτιστη ταχύτητα αυτή των 1000 rpm.



Σχήμα 11. Επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης στον λόγο A_i/A_{iS}

7.4 Επιλογή του βάρους δείγματος

Κατά την επιλογή του βέλτιστου βάρους δείγματος χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιολάδου βάρους 5, 7, 15 g “επιμολυσμένα” με 50 mg/kg με τα τέσσερα εντομοκτόνα, με μήκος ίνας 1.3 cm, χρόνος εκχύλισης 10 min και ανάδευση 1000 rpm.

Οι Rasmussen and Pedersen-Bjergaard (2004) αναφέρουν ότι η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνει όσο αυξάνεται ο λόγος του όγκου του δότη προς το δέκτη.

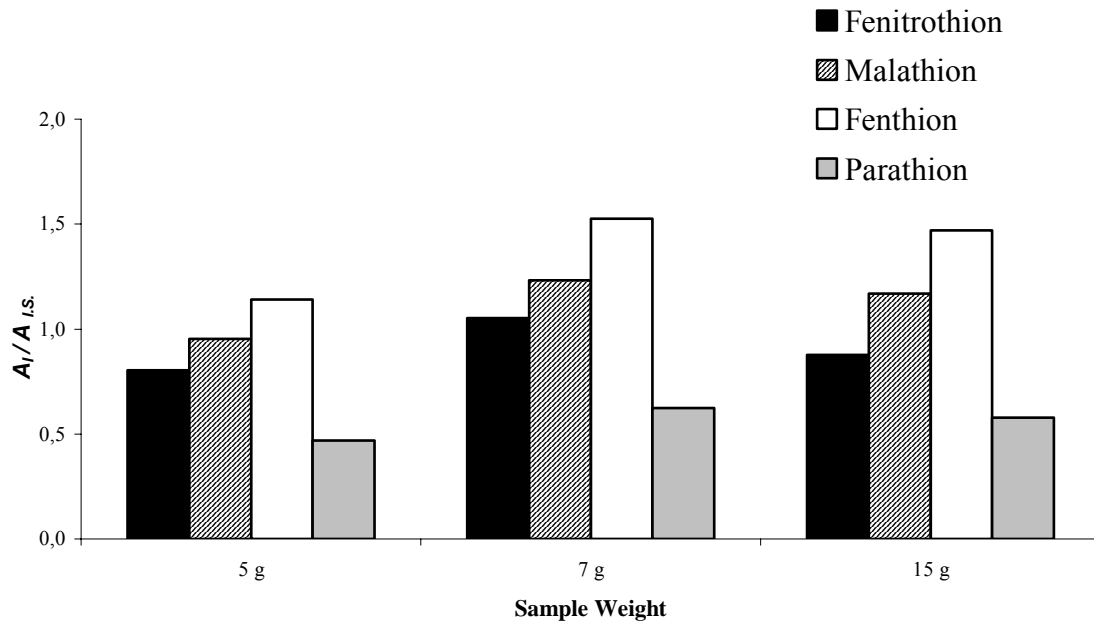
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 12, με την αύξηση του βάρους του δείγματος από 5 σε 7 g παρατηρήθηκε αύξηση του λόγου A_i/A_{iS} . Ενώ η περαιτέρω αύξηση του βάρους του δείγματος σε 15 g δεν επέφερε την αναμενόμενη αύξηση του λόγου A_i/A_{iS} .

Το παραπάνω μπορεί να εξηγηθεί λόγω της ανεπαρκούς ανάδευσης του δείγματος 15 g που βρίσκεται κατανεμημένο σε φιαλίδιου όγκου 40 ml.

Οι Labropoulou and Albanis (2005) κατά την εφαρμογή της μεθόδου σε υδατικά δείγματα για την ανίχνευση εντομοκτόνων αναφέρουν ότι η αύξηση του όγκου του δείγματος από 5 ml και πάνω επιφέρει μείωση στην απόδοση

των εκχυλιζόμενων εντομοκτόνων. Κατά την βελτιστοποίηση της μεθόδου χρησιμοποιήσαν 3 μl διαλύτη (ίνα 1.3 cm) όπως και στην παρούσα εργασία.

Κατά συνέπεια, επιλέχθηκαν τα 5 g ως βέλτιστο βάρος δείγματος.



Σχήμα 12. Επίδραση του βάρους του δείγματος στο λόγο $A_i/A_{i.s.}$

7.5 Επιλογή του μήκους ίνας

Η επιλογή του βέλτιστου μήκους ίνας είναι πολύ σημαντική για την εφαρμογή της μεθόδου LPME εφόσον στο εσωτερικό και στους πόρους της εμπεριέχεται η ποσότητα του οργανικού διαλύτη. Έχει υπολογιστεί ότι τα 1.3 cm ίνας πολυπροπυλενίου έχουν χωρητικότητα περίπου 3 μl οργανικού διαλύτη. Στην διερεύνηση για την επιλογή του μήκους της ίνας έγινε έλεγχος σε επιπλέον μήκη 1.9 cm και 2.6 cm, χωρητικότητας 4.4 και 6 μl οργανικού διαλύτη αντιστοίχως.

Κατά την πειραματική διερεύνηση χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ελαιολάδου βάρους 5 g, “επιμολυσμένα” με 50 mg/kg από τα τέσσερα εντομοκτόνα, με ταχύτητα ανάδευσης 1000 rpm και χρόνο εκχύλισης 10 min.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί ο όγκος της φάσης του δέκτη στην LPME εξαρτάται από την τεχνική ανάλυσης που ακολουθείται. Επιπλέον όπως

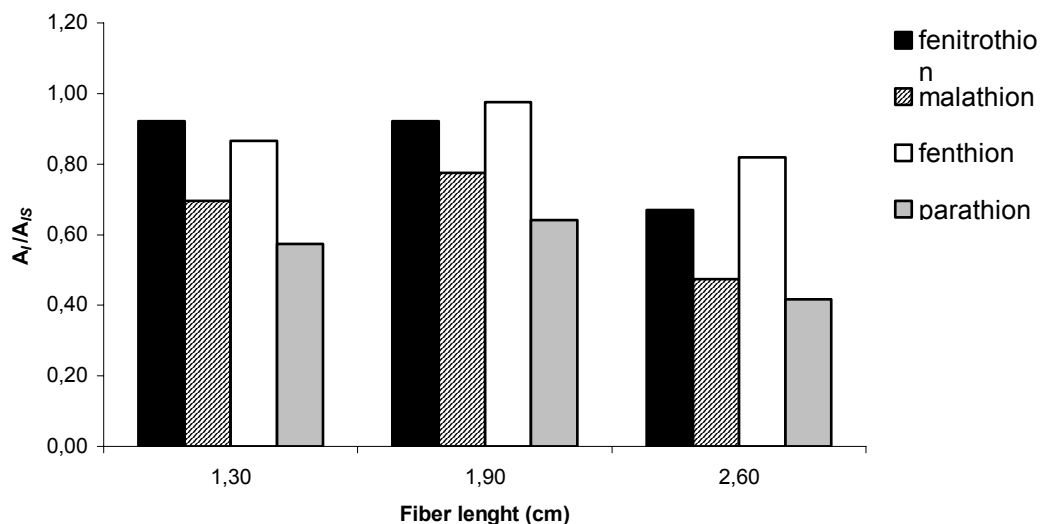
αναφέρουν οι Rasmussen and Pedersen-Bjergaard, (2004), ο λόγος των όγκων δέκτη προς δότη επηρεάζει κατά πολύ την εκχύλιση. Έτσι όσο πιο μεγάλος είναι αυτός τόσο μικρότερο είναι και το ποσοστό της εκχύλισης. Οφείλεται να σημειωθεί ότι ο όγκος διαλύτη που εισάγεται στο GC κάθε φορά είναι σταθερός και ίσος με 1.4 μl .

Στο Σχήμα 13 φαίνεται ότι η αύξηση του μήκους της ίνας από 1.3 cm σε 1.9 cm δεν επηρέασε σημαντικά το λόγο A_i/A_{iS} . Εν αντιθέσει η περαιτέρω αύξηση του μήκους της ίνας σε 2.6 cm επέφερε μείωση του λόγου A_i/A_{iS} .

Δεδομένου ότι το βέλτιστο βάρος δείγματος είναι σταθερό (5 g) όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος της ίνας τόσο μεγαλύτερος θα είναι ο λόγος δέκτη προς δότη. Έτσι αναμένεται και μείωση του λόγου A_i/A_{iS} .

Ένας επιπλέον λόγος που εξηγεί το φαινόμενο αυτό, είναι το μεγάλο μήκος της ίνας (αναλογικά με το δείγμα που φέρεται σε γυάλινο φιαλίδιο των 7 ml), η οποία πλησιάζει πολύ κοντά στον γυάλινο αναδευτήρα προκαλώντας την διαλυτοποίηση του διαλύτη στο δείγμα.

Επομένως, σαν βέλτιστο μήκος ίνας επιλέχθηκαν τα 1.3 cm και κατά συνέπεια σαν βέλτιστος όγκος διαλύτη τα 3 μl .



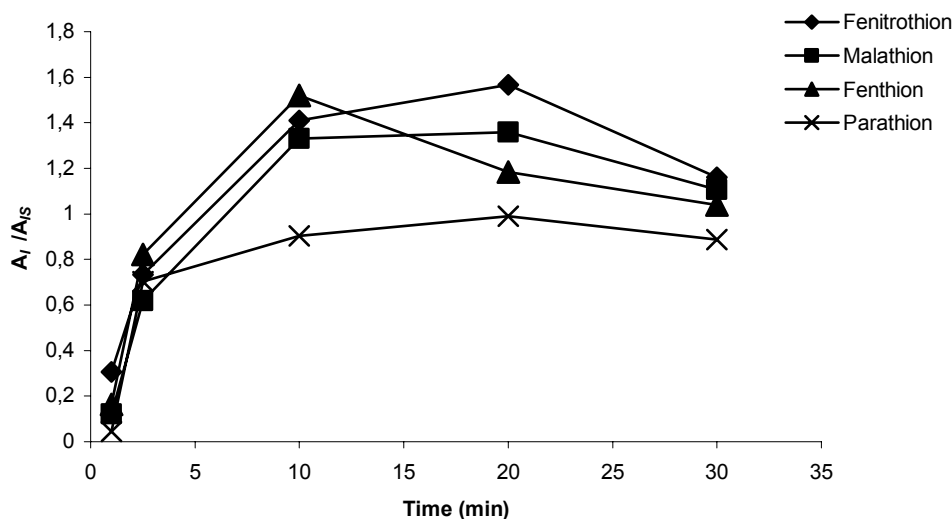
Σχήμα 13. Επίδραση του μήκους της ίνας στον λόγο A_i/A_{iS}

7.5 Επιλογή του χρόνου εκχύλισης

Κατά την διερεύνηση της εφαρμογής LPME σε δείγματα ελαιολάδου η εφαρμογή μεγάλων χρόνων εκχύλισης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της εκχύλισης επιπλέον συστατικών του ελαιολάδου, γεγονός που προκαλούσε αλληλοεπικάλυψη των κορυφών του χρωματογραφήματος. Επίσης, οι μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης είχαν ως αποτέλεσμα την διαλυτοποίηση του διαλύτη στο δείγμα.

Κατά την πειραματική διερεύνηση του βέλτιστου χρόνου μελετήθηκαν οι χρόνοι εκχύλισης 1, 2.5, 10, 20, 30 min σε δείγματα ελαιολάδου βάρους 5 g που είχαν “επιμολυνθει” με 50 mg/kg από τα τέσσερα εντομοκτόνα, με ανάδευση 1000 rpm, χρόνο εκχύλισης 10 min και μήκος ίνας 1.3 cm.

Αρχικά η αύξηση του χρόνου εκχύλισης από 1 έως 20 min είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου A_i/A_{IS} . Η περαιτέρω αύξηση του χρόνου σε 30 min επέφερε την μείωση του λόγου A_i/A_{IS} (Σχήμα 14).



Σχήμα 14. Επίδραση του χρόνου εκχύλισης στον λόγο A_i/A_{IS}

Άλλες μελέτες που έχουν γίνει για την βελτιστοποίηση της LPME σε υδατικά δείγματα (Psillakis and Kalogerakis (b), 2003), (Charalabaki *et al.*, 2005), (Balasubramanian *et al.*, 2003) έχουν αναφέρει ανάλογη επίδραση του χρόνου εκχύλισης στην απόδοση.

Επιπλέον όπως φαίνεται στο Σχήμα 14 το σύστημα έφτασε σχεδόν σε ισορροπία στα 10 min εκχύλισης. Έτσι, επιλέχθηκε σαν βέλτιστος χρόνος εκχύλισης τα 10 min.

7.6 Εκτίμηση της μεθόδου

Η εκτίμηση της μεθόδου σκοπό είχε την διερεύνηση της γραμμικότητας με την δημιουργία των καμπυλών βαθμονόμησης, την εύρεση των ορίων ανίχνευσης (LOD) και την διερεύνηση της επαναληψιμότητας της μεθόδου.

Πραγματοποιήθηκε διήμερη μελέτη βαθμονόμησης σε δείγματα ελαιολάδου “επιμολυσμένα” με τα τέσσερα εντομοκτόνα σε συγκεντρώσεις από 0.5 mg/kg έως 100 mg/kg. Οι καμπύλες βαθμονόμησης που προέκυψαν εμφάνισαν πολύ καλή γραμμικότητα και για τις τέσσερις ενώσεις με τον συντελεστή συσχέτισης r^2 να κυμαίνεται από 0.9847 έως 0.9999 (Πίνακας 6).

Τα όρια ανίχνευσης LOD προσδιορίστηκαν ορίζοντας το λόγο του σήματος προς το θόρυβο ίσο με τρία (S/N=3). Τα LOD των αναλυτών βρέθηκαν από 0.070 έως 0.428 mg/kg (Πίνακας 7).

Πίνακας 6. Μέσος συντελεστής συσχέτισης καμπυλών βαθμονόμησης

Αναλύτης	1 ^η Μέρα r^2	2 ^η Μέρα r^2
Fenitrothion	0.9999	0.9969
Malathion	0.9983	0.9987
Fenthion	0.9937	0.9899
Parathion	0.9947	0.9847

Πίνακας 7. Όρια ανίχνευσης της μεθόδου

Αναλύτης	LOD (mg/kg)
Fenitrothion	0.070
Malathion	0.053
Fenthion	0.093
Parathion	0.428

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκφράζεται με τη σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD). Η εκτίμηση της επαναληψιμότητας έγινε με την ανάλυση έξι πανομοιότυπων δειγμάτων ελαιολάδου (Πίνακας 8). Οι τιμές του RSD κυμάνθηκαν από 4.9 έως 13.9 % με μέση τιμή το 9.5 %.

Πίνακας 8. Επαναληψιμότητα της μεθόδου

Αναλύτης	Ακρίβεια (RSD %)
	Επαναληψιμότητα
Fenitrothion	13.9
Malathion	14.9
Fenthion	5.3
Parathion	4.9

7.7 Σύγκριση της LPME με άλλες μεθόδους εκχύλισης οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε ελαιόλαδο

Η σύγκριση των ορίων ανίχνευσης της μεθόδου LPME με τις άλλες μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί για τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα fenitrothion, malathion, fenthion, parathion δείχνει ότι η μέθοδος LPME υστερεί στα όρια ανίχνευσης (Πίνακας 9). Εν τούτοις τα συγκεκριμένα όρια ανίχνευσης είναι χαμηλότερα από τις τιμές MRLs του FAO και για τα τέσσερα εντομοκτόνα.

Το κύριο πλεονέκτημα της μεθόδου LPME έναντι των άλλων μεθόδων είναι η ταχύτητα δεδομένου ότι η εκχύλιση διαρκεί μόνο 10 min, γεγονός το

οποίο αυξάνει σημαντικά των αριθμό των δειγμάτων που μπορούν να εξεταστούν σε μια μέρα. Επίσης η μέθοδος αυτή είναι πιο οικονομική από τις άλλες δεδομένου ότι η τιμή της ίνας πολυπροπυλενίου είναι πολύ χαμηλή και η ποσότητα του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται είναι αμελητέα (μόλις 3 μl ανά ανάλυση).

Γενικότερα, η μέθοδος αυτή είναι ευέλικτη και φιλική προς το χρήστη, δεν απαιτεί πολύπλοκες συνδέσεις μηχανημάτων και επίσης με την άμεση εισαγωγή του διαλύτη στο GC περιορίζεται η απώλεια του αναλύτη.

Τέλος σημαντικό είναι ότι κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιείται μικρή ποσότητα τοξικών οργανικών διαλυτών.

Πίνακας 9. Σύγκριση των διαφόρων μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί για τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα fenitrothion, malathion, fenthion, και parathion

ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΟΡΙΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΙΜΟΤΗΤΑΣ	R²
LLE (Acetonitrile-hexane διπλή εκχύλιση) (Botitsi <i>et al.</i> , 2004)	0.003-0.01 µg/ml	>0.98
LLE (Acetonitrile-hexane μονή εκχύλιση) (Cabras <i>et al.</i> , 1997)	0.001-0.02 mg/kg	0.9995-0.9999
LLE (Acetonitrile διπλή εκχύλιση) (Dugo <i>et al.</i> , 2005)	0.003-0.015 mg/kg	-
LLE (hexane-acetonitrile με βοήθεια στήλης) (Rastrelli <i>et al.</i> , 2002)	0.001-0.02 mg/kg	-
Low Temperature Clean up Method (acetonitrile-hexane-acetone) (Rizos <i>et al.</i> , 2001)	0.005 mg/kg	-
GPC- GC (αζεοτροπικό ethyl acetate-cyclohexane) (Vreuls <i>et al.</i> , 1996)	20-60 µg/kg	0.997-0.999
RPLC-GC TOTAD (Sanchez <i>et al.</i> , 2004)	0.1 mg/kg	0.980-0.995
SPE (Acetonitrile-hexane) (Niessner <i>et al.</i> , 1999)	10-30 ng/g	-
SPME (Tsoutsi <i>et al.</i> , 2004)	0.005-0.01 mg/kg	0.980-0.996
Παρούσα μέθοδος	0.053-0.428 mg/kg	0.9847-0.9999

Όσον αφορά την γραμμικότητα της μεθόδου οι συντελεστές συσχέτισης που έχουν αναφερθεί κατά την ανάπτυξη άλλων μεθόδων δεν διαφέρουν σημαντικά με τους συντελεστές συσχέτισης που παρατηρήθηκαν στην μέθοδο LPME (Πίνακας 9).

8. ΦΥΣΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Μετά την βελτιστοποίηση της μεθόδου ακολούθησε η εφαρμογή της για την διερεύνηση της αποτελεσματικότητας της σε φυσικά δείγματα ελαιολάδου.

Τα φυσικά δείγματα ελήφθησαν από διάφορα σημεία της Κρήτης, ενώ το βασικό κριτήριο της επιλογής τους ήταν η προέλευση όλης της ποσότητας του εκάστοτε δείγματος από μια συγκεκριμένη περιοχή.

Η συλλογή των δειγμάτων έγινε κυρίως από το Νομό Χανίων (Εικόνα 6). Συγκεκριμένα από των νομό Χανίων εξετάστηκαν 24 δείγματα ελαιολάδου, (τα 22 αντιστοιχούσαν στις περιοχές του χάρτη της Εικόνας 6) ενώ από τις περιοχές Καλουδιανά και Παλαιόκαστρο της επαρχίας Κισάμου εξετάστηκαν επιπλέον δύο δείγματα. Τα υπόλοιπα 9 δείγματα προήλθαν από τους υπόλοιπους νομούς της Κρήτης: 1 δείγμα από Ρέθυμνο, 3 δείγματα από Ηράκλειο και 4 από το Λασιθί (Εικόνα 7). Όλα τα δείγματα ήταν προϊόντα της καλλιεργητικής περιόδου 2004-2005.

Η φύλαξη τους έγινε σε γυάλινα μπουκάλια ερμητικά κλειστά, σε σκοτεινό χώρο για να προληφθεί η αποδόμηση των φυτοφαρμάκων.

Συνολικά εξετάστηκαν 31 δείγματα από διαφορετικούς ελαιώνες περιοχών που εμφανίζονται στις Εικόνες 6, 7.

Στα φυσικά δείγματα εφαρμόστηκε η μέθοδος LPME με τις βέλτιστες συνθήκες, ανάδευση 1000 rpm, χρόνο εκχύλισης 10 min, μήκος ίνας 1.3 cm και βάρος δείγματος 5 g.



Εικόνα 6. Τοποθεσίες δειγματοληψίας από το νομό Χανίων



Εικόνα 7. Τοποθεσίες δειγματοληψίας στους υπόλοιπους νομούς της Κρήτης

Η ποσοτικοποίηση έγινε με την μέθοδο SIM. Από τα δείγματα που εξετάστηκαν ένα περιείχε ποσότητα fenthion που εκτιμήθηκε γύρω στα 0.9 mg/kg. Η ποσότητα του Fenthion που βρέθηκε στο συγκεκριμένο δείγμα ήταν κάτω από την τιμή των MRLs (1 mg/kg) που ορίζει ο FAO για το συγκεκριμένο εντομοκτόνο. Ένα άλλο δείγμα εμφάνισε ποσότητα malathion που ήταν κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης των 0.5 mg/kg.

8.1 Ποσότητες των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων που έχουν ανιχνευτεί με άλλες μεθόδους

Σύμφωνα με τους Rastrelli *et al.* (2002) κατά την εφαρμογή της LLE (hexane-acetonitrile με βοήθεια στήλης) σε δείγματα ελαιολάδου εις το 27.6 % των δειγμάτων ανιχνεύτηκε fenthion σε μια μέση συγκέντρωση 0.073 mg/kg. Εξάλλου εις το 3 % των δειγμάτων ανιχνεύτηκε parathion σε μια μέση συγκέντρωση 0.080 mg/kg.

Σύμφωνα με τους Dugo *et al.* (2005) κατά την εφαρμογή LLE (Acetonitrile διπλή εκχύλιση) σε δείγματα ελαιολάδου ανιχνεύτηκε fenthion σε μια μέση συγκέντρωση 0.35 mg/kg σε ποσοστό 8.8 % των δειγμάτων.

Σύμφωνα με τους Tsatsakis *et al.* (2003) κατά την εφαρμογή της LLE (Acetonitrile-hexane διπλή εκχύλιση) σε δείγματα που προέρχονταν από οργανικές καλλιέργειες βρέθηκε ότι τα υπολείμματα του fenthion είχαν μέση τιμή συγκέντρωσης 0.0215 mg/kg κατά το έτος 1997, 0.0099 mg/kg κατά το έτος 1998 και 0.0035 mg/kg για το έτος 1999. Σύμφωνα με τους ίδιους μετά από εφαρμογή της ίδιας μεθόδου σε δείγματα που προέρχονταν από συμβατικές καλλιέργειες βρέθηκε ότι η μέση τιμή της συγκέντρωσης των υπολειμμάτων για το ίδιο εντομοκτόνο ήταν 0.1222 mg/kg για το έτος 1997, 0.1457 mg/kg για το έτος 1998 και 0.1702 mg/kg για το έτος 1999.

Οι Hiskia *et al.* (1998) κατά την εφαρμογή της LLE (Acetonitrile-hexane διπλή εκχύλιση) σε 48 δείγματα ελαιολάδου αναφέρουν ότι ανίχνευσαν στο 35 % των δειγμάτων fenthion σε μια μέση τιμή συγκέντρωσης 0.0443 mg/kg, ενώ στο 6.25 % ανιχνεύτηκε parathion σε μια μέση τιμή συγκέντρωσης 0.007 mg/kg.

Οι Botitsi *et al.* (2004) μετά την εφαρμογή της LLE (Acetonitrile-hexane διπλή εκχύλιση) αναφέρουν ότι κατά την καλλιεργητική περίοδο 1999-2000, το 54 % των δειγμάτων περιείχε ποσότητα fenthion ή/και των μεταβολιτών του σε συγκέντρωση κάτω των 0.1 mg/kg ενώ στο 38 % η αντίστοιχη συγκέντρωση κυμαίνονταν από 0.1 έως 0.35 mg/kg. Σύμφωνα με τους ίδιους, την καλλιεργητική περίοδο 2000-2001 στο 67 % των δειγμάτων ανιχνεύτηκε ποσότητα fenthion ή/και των μεταβολιτών του σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0.02-0.07 mg/kg. Τέλος κατά την καλλιεργητική περίοδο 2001-2002 στο 25 % των δειγμάτων ανιχνεύτηκε ποσότητα fenthion ή/και των μεταβολιτών του σε συγκεντρώσεις από 0.1-0.2 mg/kg ενώ στο 50 % των δειγμάτων οι αντίστοιχες συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν από 0.2 έως 1 mg/kg.

9. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η εφαρμογή χημικών σκευασμάτων για την προστασία της φυτικής παραγωγής τα τελευταία χρόνια αύξησε σημαντικά την παγκόσμια παραγωγή τροφίμων με αποτέλεσμα σήμερα να αντιστοιχεί σε κάθε άνθρωπο θερμιδικό πλεόνασμα. Η εμφάνιση θερμιδικού ελλείμματος σε διάφορες περιοχές του κόσμου οφείλεται σε πολιτικούς και κοινωνικούς λόγους και όχι στην έλλειψη τροφίμων.

Η μεγάλη διατροφική αξία του ελαιολάδου είναι πλέον παγκοσμίως αποδεκτή ενώ η παραγωγή του εν λόγω προϊόντος είναι στενά συνυφασμένη με την Ελλάδα. Τα παραπάνω καθιστούν αναγκαία την προστασία του ελαιολάδου από την ύπαρξη υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων και κυρίως εντομοκτόνων, τα οποία χρησιμοποιούνται εκτενώς λόγω των σοβαρών εντομολογικών εχθρών της ελαιοκαλλιέργειας.

Η συνεχής αύξηση του παγκόσμιου πληθυσμού κάνει σχεδόν ανέφικτη την ταχεία στροφή σε μεθόδους οργανικής καλλιέργειας. Συνεπώς, η ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο ελαιόλαδο μπορεί να γίνει εφικτή με την εφαρμογή των Κανόνων της Ορθής Γεωργικής Πρακτικής. Αυτός ο όρος προτάθηκε από την Ευρωπαϊκή Ένωση και περιγράφει σε γενικές γραμμές την διατήρηση της ισορροπίας μεταξύ της ευημερίας και της προστασίας του περιβάλλοντος. Ταυτόχρονα η εξεύρεση νέων μεθόδων ανίχνευσης των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο ελαιόλαδο είναι ο μόνος τρόπος για την προστασία των καταναλωτών.

Η ανίχνευση οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων σε δείγματα ελαιολάδου αποτελούσε μέχρι σήμερα ένα χρονοβόρο και δαπανηρό εγχείρημα. Η εφαρμογή της LPME σε δείγματα ελαιολάδου, αποδεικνύει ότι η έρευνα για την ανίχνευση των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων γενικά στο ελαιόλαδο, πρέπει να στραφεί στις νέες σύγχρονες μεθόδους μικροεκχύλισης που απλουστεύουν τις διαδικασίες εκχύλισης και ελαχιστοποιούν την χρήση των τοξικών για το περιβάλλον οργανικών διαλυτών.

Η καινοτομία που εισάγει η εφαρμογή της LPME σε δείγματα ελαιολάδου είναι ότι δεν απαιτείται ο διαχωρισμός των λιπιδίων από τη μήτρα του ελαιολάδου, γεγονός που αποτελούσε και το πιο δύσκολο βήμα κατά την ανάλυση του.

Η συμβατότητα της μεθόδου LPME με τα περισσότερα μηχανήματα ενόργανης ανάλυσης είναι ένα επιπλέον πλεονέκτημα εφόσον μπορεί να μελετηθεί η εφαρμογή της και σε άλλα μηχανήματα χαμηλότερου κόστους (GC-FID, GC-NPD, HPLC), από το GC-MS, τα οποία υπάρχουν στα περισσότερα εργαστήρια τεχνολογίας ελαιολάδου.

Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται για τον έλεγχο ελαιολάδου που προέρχεται από συμβατικές καλλιέργειες και είναι μεγάλης σημασίας δεδομένου ότι διασφαλίζει την υγεία του καταναλωτή. Αυτό ενισχύεται και από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, σύμφωνα με τα οποία τα όρια ανίχνευσης των τεσσάρων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων τα οποία εξετάστηκαν και βρέθηκαν να κυμαίνονται από 0.070 έως 0.428 mg/kg είναι πολύ χαμηλότερα από τα MRLs που ορίζει ο FAO.

10. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

B.C. Balasubramanian, R. Lee. 2003. Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fibre membrane/liquid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1016:11-20.

J.W. Birkett, J.N. Lester. 2003. *Endocrine Disrupters in Wastewater and Sludge Treatment Processes*. Lewis Publishers, CRC Press LLC.

D. Boskou. 1996. *Olive Oil Chemistry and Technology*. USA. AOCS Press.

E. Botitsi, P. Kormali, S. Kontou, A. Mourkojanni, E. Stavarakaki, D. Tsipi. 2004. Monitoring of Pesticides Residues in Olive Oil Samples: Results and Remarks Between 1999 and 2002. *International Journal of Analytical Chemistry*, Vol 84, 1-3:231-239.

P. Cabras, A. Angioni, M. Melis, E.V. Minelli, F.M. Pirisi. 1997. Simplified Multiresidue Method for the Determination of Organophosphorus Insecticides in Olive Oil. *Journal of Chromatography A*, 761: 327-331.

M. Charalabaki, E. Psillakis, D. Mantzavinou, N. Kalogerakis. 2005. Analysis of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Wastewaters Treatment Plant Effluents Using Hollow Fibre Liquid-phase Microextraction. *Chemosphere*, 60:690-698.

K. Dockter, A. Nielsen, R.F. Griffin. 1999. Ethyl parathion. Product Chemistry Chapter for the Reregistration Eligibility Decision [RED] Document.

G. Dugo, G. Di Bella, L. La Torre, M. Saitta. 2005. Rapid GC-FPD Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Sicilian and Apulian Olive Oil. *Food Control*, 16:435–438.

K. Farwell, S. Piper, C. Swartz, C. Joseph. 1999. Human Health Risk Assessment Ethoprophos. United States Environmental Protection Agency.

E. González-Peñas, C. Leache, M. Viscarret, A. Pérez de Obanos, C. Araguás, A. López de Cerain. 2004. Determination of ochratoxin A in wine using liquid-phase microextraction combined with liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1025:163–168.

W. Hazel, C. Olinger, C. Swartz, J. Dawson, J. Blondell, E. Mendez. 1999. Human Health Risk Assessment: Fenthion. United States Environmental Protection Agency.

A.E. Hiskia, M.E. Atmajidou, D.F. Tsipi. 1998. Determination of Organophosphorus Pesticides Residues in Greek Virgin Olive Oil by Capillary Gas Chromatography. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 46:570-574.

T. Si Ho, S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. 2002. Recovery, Enrichment and Selectivity in Liquid-phase Microextraction Comparison with Conventional Liquid-liquid Extraction. *Journal of Chromatography A*, 963: 3-17.

W.W. Hughes. *Essentials of Environmental Toxicology, The Effects of Environmentally Hazardous Substances on Human Health*. 1996. Taylor Frances.

S. Kitamura, T. Suzuki, S. Ohta, N. Fujimoto. 2003. Antiandrogenic Activity and Metabolism of the Organophosphorus Pesticide Fenthion and Related Compounds. *Environmental Health Perspectives*, Vol. 111, 4:503-508.

A.K. Κυριτσάκη. 1988. Το Ελαιόλαδο. Θεσσαλονίκη, Αγροτικές Συναιτεριστικές Εκδόσεις.

D.A. Lambropoulou, T.A. Albanis. 2005. Application of Hollow Fiber Liquid Phase Microextraction for the Determination of Insecticides in Water. *Journal of Chromatography A*, 1072:55-61.

Lercker, M.T. Rodriguez-Estrada. 2000. Chromatographic Analysis of Unsaponifiable Compounds of Olive Oils and Fat-containing Foods. *Journal of Chromatography A*, 881:105-129.

Leicester UK, MRC Institute for Environment and Health. March 2005. Chemicals Purported to be Endocrine Disrupters- A Compilation of Published Lists. IEH Web Report W20.

Ch. Lentza-Rizos, E.J. Avramides, F. Cherasco. Low-Temperature Clean-up Method for the Determination of Organophosphorus Insecticides in Olive Oil. 2001. *Journal of Chromatography A*, 912:135-142.

M. Murkovic, S. Lechner, A. Pietzka, M. Bratacos, E. Katzogiannos. 2004. Analysis of Minor Components in Olive Oil. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 61:155-160.

G. Niessner, W. Buchberger, R. Eckerstorfer. 1999. Multiresidue Screening Methods for the Determination of Pesticides in Plant Materials. *Journal of Chromatography A*, 846: 341-348.

J.H. Oudejans. 1991. *Agro-pesticides: Properties and Functions in Intergraded Crop Protection*. Bangkok. United Nation.

H.J. Pan, W.H. Ho. 2004. Determination of Fungicides in Water Using Liquid Phase Microextraction and Gas Chromatography With Electron Capture Detection. *Analytica Chimica Acta*, 527:61–67.

I.N. Παπαδογιάννης, Β.Φ. Σαμανιδου. 2001. *Ενόργανη Χημική Ανάλυση*. Εκδόσεις Πήγασος.

S. Pedersen-Bjergaard, K.E. Rasmussen. 1999. Liquid Liquid Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. *Analytical Chemistry*, 71:2650.

Κ.Ε.Δ. Πελεκάση. 1991. *Μαθήματα Γεωργικής Εντομολογίας, Ειδική Εντομολογία*. Τόμος Β. Εκδόσεις Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Γ.Θ. Πολυράκης. 2003. *Περιβαλλοντική Γεωργία*. Εκδόσεις Ψυχάλου.

Πρακτικά Ημερίδας δακοκτονίας. 2003. *Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα για την Αντιμετώπιση του Δάκου της Ελιάς-Προοπτικές*. Διεύθυνση Προστασίας Φυτικής Παραγωγής, Υπουργείο Γεωργίας.

E. Psillakis, N. Kalogerakis. 2003. Development in Liquid-Phase Microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, Vol. 22, 10:565-574.

E. Psillakis, N. Kalogerakis (b). 2003. Hollow-fibre Liquid-phase Microextraction of Phthalate Esters from Water. *Journal of Chromatography A*, 999:145-153.

Κ.Α Ποντίκης, 2001. *Ειδική Δενδροκομία, Ελαιοκομία*. Εκδόσεις Σταμούλη. Τόμος 3.

K.E. Rasmussen and S. Pedersen-Bjergaard. 2004. Developments in Hollow Fiber-based, Liquid Phase Microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, 23:1-10.

L. Rastrelli, K. Totaro, F. de Simone. 2002. Determination of Organophosphorus Pesticide Residues in Cilento (Campania, Italy) Virgin Olive Oil by Capillary Gas Chromatography. *Food Chemistry*, 79:303–305.

J.C. Redden, E. Saito, P. Fenner-Crisp. 1996. The HED Chapter of the Reregistration Eligibility Decision Document (RED) for Fenitrothion. United States Environmental Protection Agency.

H.M. Roche, M.J. Gibney, A. Kafatos, A. Zampelas, C.M. Williams. 2000. Beneficial Properties of Olive Oil. *Food Research International*, 33:227-231.

R. Sanchez, A. Vazquez, J.C. Andini, J. Villen. 2004. Automated Multiresidue Analysis of Pesticides in Olive Oil by on line Reversed Phase Liquid Chromatography- Gas Chromatography Using the Through Oven Transfer Adsorption-Desorption Interface. *Journal of Chromatography A*, 1029:167-172.

A.M. Tsatsakis, I.N. Tsakiris, M.N. Tzatzarakis, Z.B. Agourakis, M. Tutudaki and A.K. Alegakis. 2003. Three-year Study of Fenthion and Dimethoate Pesticides in Olive Oil from Organic and Conventional Cultivation. *Food Additives and Contaminants*, Vol. 20, 6:553–559.

C.S. Tsoutsis, T.A. Albanis. 2004. Optimization of Headspace Solid-Phase Microextraction Condition for the Determination of Organophosphorus Insecticides in Olive Oil. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, Vol 84, 1-3:3-13.

United States Environmental Protection Agency. 1996. Malathion Reregistration Eligibility Document Environmental Fate and Effects Chapter.

J.J. Vreuls, R.J.J. Swen, V.P. Goudriaan, M.A.T. Kerkhoff, G.A. Jongenotter, U.A.T. Brinkman. 1996. Automated on-line Gel Permeation Chromatography - Gas Chromatography for the Determination of Organophosphorus Pesticides in Olive Oil. *Journal of Chromatography A*, 750:275-286.

Θ.Π. Χαζηγιωάννου, Μ.Α. Κουπάρη. 2002. Ενόργανη Ανάλυση. Εκδόσεις Πανεπιστημίου Αθηνών.

Internet:

www.illo.org

www.olivesource.com

