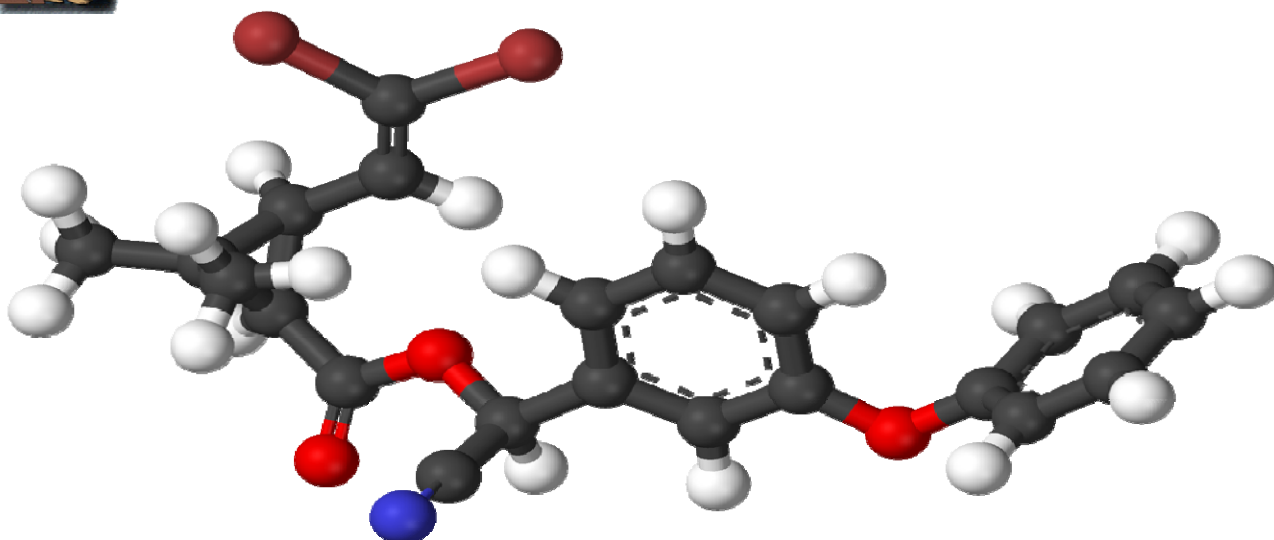




ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Διπλωματική Εργασία

«Προσδιορισμός φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε περίπλοκα περιβαλλοντικά δείγματα ,με την χρήση καινοτόμων μεθόδων ανάλυσης .»

Εξεταστική Επιτροπή:

Επικ. Ψυλλάκη Ε. (επιβλέπουσα)

Καθ. Καλογεράκης Ν.

Λεκτ. Κατσαούνης Α.

Λεκτ. Παρανυχιανάκης Ν.



*Αφιερώνω αυτή την εργασία στην οικογένεια μου,
που με στήριξε στην επίτευξη των στόχων μου.*

*«Αν μπόρεσα να δω λίγο πιο περά από εκεί που βλέπουν οι άλλοι άνθρωποι ,
αυτό οφείλεται στο ότι στηρίχτηκα στους ώμους γιγάντων.»*

Νεύτωνας.

Α. ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Επικ. Καθηγήτρια του Τμήματος Μηχανικών Περιβάλλοντος και επιβλέποντα της παρούσας εργασίας κα. Ψυλλάκη Ελευθερία, για τις πολύτιμες πληροφορίες που μου προσέφερε, την καθοδήγηση και την άφρογη συνεργασία κατά τη διεκπεραίωση αυτής της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής Καθηγητή Καλογεράκη Ν., Λέκτορα Κατσαούνη Α. και Λέκτορα Παρανυχιανάκη Ν., τόσο για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την διπλωματική μου όσο και για την συμμετοχή τους στην εξέταση της.

Αισθάνομαι επίσης την ανάγκη να ευχαριστήσω την μεταδιδακτορική ερευνήτρια στο τμήμα μας Dr.Lucia Sanchez-Prado, και την υπεύθυνη του εργαστηρίου Δρ. Τυροβολά Κωνσταντίνη, για τις γνώσεις και την εμπειρία που μου μετέδωσαν σχετικά με την αναλυτική χημεία.

Επίσης ευχαριστώ ιδιαίτερα την συνάδελφο και φίλη μου, Πάλασιογιάννη-Μπέλλου Άρτεμη για το χρόνο που μου διέθεσε και την πολύτιμη βοήθειά της κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων στο εργαστήριο. Χωρίς τη δική της συμβολή, η διεκπεραίωση της παρούσας εργασίας θα ήταν αδύνατη.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Πολυτεχνείο Κρήτης και το πρόγραμμα Unister Plus για την χρηματοδότηση της παρούσας εργασίας και την στήριξη τους τόσο κατά την διάρκεια της έρευνας, όσο και μετά για την συμμετοχή μου σε Ευρωπαϊκό Συνέδριο στην Γάλλια.

B. Σύντομη αναφορά-Περίληψη

Το αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι να αναπτυχθεί ένα απλό και γρήγορο πρωτόκολλο, βασισμένο στην καινοτόμο μέθοδο της μικροεκχύλισης, για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτό-προστατευτικών ενώσεων-πυρεθροειδών στα δείγματα ελαιολάδου. Η δυσκολία του εγχειρήματος δεν έγκειται τόσο στην μέθοδο όσο στην μήτρα του ελαιολάδου η οποία χρησιμοποιήθηκε. Η γενική ονομασία της μεθόδου είναι Μικροεκχύλιση Υγρής Φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME) και αναπτύχθηκε αρχικά από τους Rasmussen και Pederson-Bjergaard.

Για πρώτη φορά η τεχνική της μικροεκχύλισης θα επιλύσει ένα τέτοιο σύγχρονο και κρίσιμο θέμα, διότι ύπαρξη των ενώσεων αυτών αποτελεί κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών, μιας και έχουν την ικανότητα να διαταράσσουν το ενδοκρινικό σύστημα προκαλώντας καρκινογενέσεις αλλά ακόμα και θανάτους. Πρέπει να σημειωθεί ότι σήμερα για τον προσδιορισμό των ενώσεων αυτών, απαιτείται εξειδικευμένος και ιδιαίτερα ακριβός εξοπλισμός με αποτέλεσμα οι αναλύσεις αυτές να είναι ιδιαίτερα δαπανηρές και να γίνονται σε συγκεκριμένα εργαστήρια της Ελλάδας. Με τη ενσωμάτωση της τεχνικής μικροεκχύλισης στο αναλυτικό πρωτόκολλο η διαδικασία ανίχνευσης των τοξικών αυτών ενώσεων θα απλουστευθεί και θα είναι έτσι εφικτή η επιτόπου ανάλυση πολλών δειγμάτων σε εργαστήρια τα οποία δεν διαθέτουν ιδιαίτερα ανεπτυγμένες τεχνικές χρωματογραφίας, όπως αυτά που βρίσκονται στη Κρήτη.

Η οικογένεια των πυρεθροειδών αναπτύχθηκε αρκετά τα τελευταία χρόνια και συναντάται σε ένα πλήθος φυτοφαρμάκων. Είναι χημικά συγγενή με τα φυσικά εντομοκτόνα (πυρεθρίνες) που βρίσκονται σε ορισμένα άνθη. Συνήθως χρησιμοποιούνται σε αρκετά χαμηλότερες δόσεις από τα οργανοφωσφορικά και καρβαμιδικά. Τα περισσότερα έχουν χαμηλή τοξικότητα στα θηλαστικά παρόλο που ορισμένα σκευάσματα προκαλούν ερεθισμούς και αλλεργικές επιδράσεις στον άνθρωπο. Επίσης, τα περισσότερα είναι πολύ τοξικά για τα ψάρια. Πυρεθροειδή που κυκλοφορούν σήμερα είναι το fenvalerate, bifenthrin, deltamethrin, cypermethrin, acrinathrin, fluvalinate, beta-cyfluthrin, lambda-cyhalothrin κ.ά.

Ο προσδιορισμός των πυρεθροειδών που χρησιμοποιήθηκαν (deltamethrin, cypermethrin, lambda-cyhalothrin, fenvalerate) στα πρότυπα διαλύματα, έγινε με αέρια χρωματογραφία μέσω ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων στο σύστημα Shimadzu GC-17A -ECD (GC-ECD system, equipped with a split/splitless injector).

Κατά την διάρκεια διεξαγωγής της μεθόδου έγιναν διάφορα πειράματα για το προσδιορισμό των καλύτερων δυνατών συνθηκών και μελετήθηκαν αρκετές παράμετροι όπως ο καθορισμός του κατάλληλου διαλύτη που προσθέταμε στο μίγμα ελαιολάδου-πυρεθροειδών, ο καθορισμός του κατάλληλου διαλύτη εμβάπτισης της μεμβράνης, η επίδραση της ταχύτητας ανάδευσης και άλλα.

Τέλος η μέθοδος εφαρμόστηκε σε διάφορα είδη λαδιών όπως καλαμποκέλαιο, ηλιέλαιο, σογιέλαιο και ελαιόλαδο έτσι ώστε να διαπιστωθούν τυχόν επιδράσεις μήτρας αλλά και η δυνατότητα και αξιοπιστία εφαρμογής της μεθόδου.

Το αποτέλεσμα της όλης προσπάθειας ήταν η εύρεση μιας μεθόδου για την ανάλυση των πυρεθροειδών στο ελαιόλαδο, η οποία είναι χαμηλού κόστους, αξιόπιστη και αποτελεσματική.

Γ. Πίνακας Περιεχομένων

A.	Ευχαριστίες	Σελ.2
B.	Σύντομη αναφορά	Σελ.3
Γ.	Πινάκας περιεχομένων	Σελ.4
Δ.	Λίστα σχημάτων	Σελ.7
Ε.	Λίστα διαγραμμάτων	Σελ.8
Ζ.	Λίστα Πινάκων	Σελ.8
1.	Εισαγωγή	Σελ.9
2.	Κατηγορίες και ποιότητες λαδιών	Σελ.10
2.1	Παραγωγή ελαιολάδου	Σελ.10
2.2	Ελαιόλαδο	Σελ.10
2.2.1	Διατροφική αξία	Σελ.10
2.2.2	Τα είδη ελαιολάδου	Σελ.11
2.2.3	Επιλογή λαδιού	Σελ.11
2.2.4	Περιοχές που παράγουν το καλύτερο λάδι	Σελ.12
3.	Φυτοπροστατευτικές ενώσεις	Σελ.13
3.1.	Εισαγωγή-Ιστορική εξέλιξη φυτοπροστατευτικών προϊόντων	Σελ.13
3.2.	Αναγκαιότητα χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων	Σελ.13
3.3.	Βιολογική δράση φυτοπροστατευτικών προϊόντων	Σελ.16
3.3.1.	Τρόπος και μηχανισμός δράσης	Σελ.17
3.3.2.	Αποτελεσματικότητα, τοξικότητα και εκλεκτικότητα	Σελ.17
3.4.	Τύποι φυτοπροστατευτικών προϊόντων	Σελ.18
3.4.1.	Εντομοκτόνα.	Σελ.18
3.5.	Υπολείμματα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων	Σελ.21
3.5.1.	Νομικό Πλαίσιο που καλύπτει τα MRLs στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) αλλά και στην Ελλάδα	Σελ.23
3.5.2.	Εθνικά MRLs	Σελ.23
3.6.	Ανάλυση Υπολειμμάτων	Σελ.24
4.	Νομοθεσία φυτοφαρμάκων	Σελ.25
4.1.	Ευρωπαϊκή Νομοθεσία	Σελ.26
4.2.	Αειφόρος χρήση των φυτοφαρμάκων	Σελ.26

5.	Πυρεθροειδή	Σελ.27
5.1.	Εισαγωγή	Σελ.27
5.2.	Ιστορική ανάδρομη και προέλευση	Σελ.27
5.3.	Βασικές κατηγορίες πυρεθροειδών	Σελ.27
5.3.1.	Φυσικά Πυρεθροειδή –Πυρεθρίνες	Σελ.28
5.3.2.	Συνθετικά Πυρεθροειδή	Σελ.29
5.4.	Πυρεθροειδή που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο	Σελ.30
5.4.1.	Cypermethrin	Σελ.30
5.4.2.	Fenvalerate	Σελ.31
5.4.3.	Deltamethrin	Σελ.32
5.4.4.	λ-Cyhalothrin	Σελ.34
5.5.	Ισομερή	Σελ.35
5.6.	Επιτρεπόμενα όρια	Σελ.36
6.	Σύγχρονες μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης	Σελ.37
6.1.	Εισαγωγή	Σελ.37
6.2.	Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME)	Σελ.38
6.3.	Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (SDME)	Σελ.39
6.4.	Μικροεκχύλιση μεμβράνης	Σελ.40
6.5.	Μικροεκχύλιση υγρής φάσης(LPME)	Σελ.40
7.	Ανάλυση μεθόδου μικροεκχύλισης υγρής φάσης (HF-LPME)	Σελ.42
7.1.	Εισαγωγή	Σελ.42
7.2.	Ανάλυση διατάξεων της ίνας για την LPME	Σελ.42
7.3.	Ανάλυση LPME ενεργού μεταφοράς	Σελ.43
7.4.	Ανάλυση δυναμικής LPME	Σελ.44
7.5.	Ανάδευση του δείγματος	Σελ.44
7.6.	Επιλογή της ίνας (hollow fiber)	Σελ.44
7.7.	Επιλογή του διαλύτη	Σελ.45
7.8.	Επίδραση της σχέσης των όγκων του διαλύματος δότη και δέκτη	Σελ.45
7.9.	Ρύθμιση του pH	Σελ.46
7.10.	Διάρκεια της εκχύλισης	Σελ.46
7.11.	Αξιολόγηση της τεχνικής	Σελ.47
7.12.	Εφαρμογές της LPME	Σελ.48

8.	Χρωματογραφική ανάλυση	Σελ.49
8.1.	Εισαγωγή	Σελ.49
8.2.	Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών	Σελ.49
8.3.	Χρωματογραφικοί παράμετροι	Σελ.50
8.4.	Διάταξη αέριου χρωματογράφου	Σελ.51
8.5.	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της αέριας χρωματογραφία	Σελ.52
8.6.	Εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας	Σελ.53
9.	Πειραματικό μέρος	Σελ.54
9.1.	Αντιδραστήρια και οργανολογία	Σελ.54
9.2.	Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων	Σελ.55
9.2.1.	Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων σε ακετόνη	Σελ.55
9.2.2.	Παρασκευή Μίγματος Πυρεθροειδών σε ακετόνη	Σελ.55
9.2.3.	Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων σε εξάνιο	Σελ.55
9.2.4.	Παρασκευή Μίγματος Πυρεθροειδών σε εξάνιο	Σελ.55
9.3.	Περιγραφή- εφαρμογή της μεθόδου HF-LPME	Σελ.56
9.4.	Χρωματογραφική ανάλυση με αέριο χρωματογράφο GC-ECD	Σελ.59
10.	Αποτελέσματα	Σελ.60
10.1.	Συνθήκες εκχύλισης με την τεχνική μικροεκχύλισης υγρής φάσης(HF-LPME.)	Σελ.60
10.1.1.	Πειραματικός έλεγχος για τον καθορισμό του κατάλληλου διαλύτη που προσθέταμε στο μίγμα ελαιολάδου – πυρεθροειδών	Σελ.60
10.1.2.	Πειραματικός έλεγχος για τον καθορισμό του κατάλληλου διαλύτη για Εκχύλιση	Σελ.61
10.1.3.	Μελέτη του διαλυτή εμβάπτισης της μεμβράνης	Σελ.62
10.1.4.	Μελέτη του όγκου του διαλυτή που προστίθεται στο μίγμα προς Ανάλυση	Σελ.63
10.1.5.	Μελέτη για την επιλογή της καταλληλότερης μάζας λαδιού στο προς ανάλυση δείγμα	Σελ.64
10.1.6.	Μελέτη της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης	Σελ.65
10.1.7.	Μελέτη της επίδρασης του χρόνου εμβάπτισης της μεμβράνης	Σελ.66
10.1.8.	Μελέτη της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης	Σελ.67
10.2.	Εκτίμηση μεθόδου	Σελ.69
10.3.	Έλεγχος της ικανότητας εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου σε πραγματικά δείγματα	Σελ.70
10.4.	Συμπεράσματα –Σύγκριση μεθόδων	Σελ.70
10.5	Μελλοντικές προοπτικές στη χρήση της HF- LPME	Σελ.73
11.	Βιβλιογραφία	Σελ.74

Δ. Λίστα Σχημάτων

Σχήμα 1	Συμμετοχή διαφόρων περιοχών της γης στην παγκόσμια εφικτή παραγωγή γεωργικών προϊόντων η οποία επιτυγχάνεται χωρίς τη χρήση Φ.Π.	Σελ.14
Σχήμα 2	Συμμετοχή διαφόρων περιοχών της γης στην παγκόσμια εφικτή παραγωγή γεωργικών προϊόντων η οποία επιτυγχάνεται με χρήση Φ.Π.	Σελ.14
Σχήμα 3	Δαπάνες για αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην Ελλάδα το 2001 (Ε.ΣΥ.Φ., 2001)	Σελ.15
Σχήμα 4	Δαπάνες για αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη Δυτική Ευρώπη το 1995 (ECPA Industry Statistics, 1995).	Σελ.15
Σχήμα 5	Δείκτης κόστους Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων (ΦΠ) προς εργατικά χέρια (ΕΧ) (Bridges, 1994)	Σελ.16
Σχήμα 6	Βαθμίδες ορίων υπολειμμάτων	Σελ.22
Σχήμα 7	Νέος κανονισμός για τα MRLs στην Ε.Ε	Σελ.24
Σχήμα 8	Διαφορετικά είδη από χρυσάνθεμα	Σελ.28
Σχήμα 9	Chrysanthemic Acid Synthesis	Σελ.28
Σχήμα 10	Μοριακή δομή του cypermethrin	Σελ.31
Σχήμα 11	Μοριακή δομή του Fenvalerate	Σελ.32
Σχήμα 12	Μοριακή δομή του Deltamethrin	Σελ.33
Σχήμα 13	Μοριακή δομή του λ-Cyhalothrin	Σελ.35
Σχήμα 14	Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευή SPME.	Σελ.38
Σχήμα 15	Σχηματική αναπαράσταση συστήματος μικροεκχύλισης σταγόνας	Σελ.39
Σχήμα 16	Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης της ίνας	Σελ.42
Σχήμα 17	Διάταξη με μικροσύριγγα για την στήριξη της ίνας	Σελ.43
Σχήμα 18	Γενική μορφή χρωματογραφήματος	Σελ.50
Σχήμα 19	Βασικά τμήματα ενός αέριου χρωματογράφου	Σελ.51
Σχήμα 20	Σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο HF-LPME	Σελ.56
Σχήμα 21	Απεικόνιση του συστήματος που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα	Σελ.57
Σχήμα 22	Απεικόνιση της διαδικασίας της μεθόδου HF-LPME	Σελ.58
Σχήμα 23	Σχηματική επεξήγηση της μεθόδου	Σελ.61

Ε. Λίστα διαγραμμάτων

Διαγρα.1.	Επιλογή διαλύτη εμβάπτισης	Σελ.62
Διαγρα.2.	Επιλογή όγκου του διαλύτη που προστίθεται στο μίγμα προς ανάλυση	Σελ.63
Διαγρα.3.	Επιλογή της καταλληλότερης μάζας λαδιού στο προς ανάλυση δείγμα	Σελ.64
Διαγρα.4.	Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης	Σελ.65
Διαγρα.5.	Επιλογή του χρόνου εμβάπτισης της μεμβράνης	Σελ.66
Διαγρα.6.	Επιλογή του χρόνου εκχύλισης	Σελ.67
Διαγρα.7.	Έλεγχος επίδρασης μήτρας σε διαφορετικά είδη λαδιού	Σελ.70

Ζ. Λίστα Πινάκων

Πινак. 1	Κατηγορίες φυτών και παραγόμενα προϊόντα	Σελ.27
Πινак. 2	Μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο ελαιόλαδο	
Πινак. 3	Πρόγραμμα ανάλυσης πυρεθροειδών στον αέριο χρωματογράφο GC-ECD	Σελ.59
Πινак. 4	Αποτελέσματα έλεγχου για τον καθορισμό κατάλληλου διαλύτη που προστέθηκε στο μίγμα ελαιολάδου-πυρεθροειδών	Σελ.60
Πινак. 5	Βέλτιστες συνθήκες για την μέθοδο HF- LPME	Σελ.68
Πινак. 6	Αποτελέσματα Σχετικής σταθερής απόκλισης και Συντελεστή συσχετισμού που λαμβάνονται από τα πειράματα	Σελ.69
Πινак. 7	Ουσίες που αναλύθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων .	Σελ.71
Πινак. 8	Σχετική σταθερή απόκλιση που πρόεκυψε από τις αναλύσεις των διαφόρων δειγμάτων λαδιών	Σελ.72
Πινак. 9	Αναφερόμενες μέθοδοι για την ανίχνευση πυρεθροειδών σε λιπαρά δείγματα	Σελ.75

1. Εισαγωγή

Το ελαιόδεντρο είναι ένα αναπόσπαστο κομμάτι στη ζωή των ανθρώπων της Μεσογείου εδώ και πολλούς αιώνες. Ο ρόλος του είναι πολυμορφικός, διατροφικός, κοινωνικός, πολιτιστικός, οικονομικός και πολιτικός. Το ελαιόλαδο και οι επιτραπέζιες ελιές είναι βασικά αγροτικά προϊόντα για τις περισσότερες χώρες της λεκάνης της Μεσογείου και σε πολλές ορεινές περιοχές αποτελούν το μοναδικό γεωργικό έσοδο. Η Ελλάδα είναι η τρίτη πιο σημαντική ελαιοπαραγωγός χώρα στον κόσμο (μετά την Ισπανία και την Ιταλία), κατέχοντας το 17% της παγκόσμιας παραγωγής ελαιολάδου και επιτραπέζιας ελιάς [21]. Η καλλιέργεια ελαιόδεντρου είναι επίσης ένα συνεχώς αυξανόμενο τμήμα της οικονομικής δραστηριότητας της Κύπρου, όπου καλλιεργείται στα 383 από τα συνολικά 408 χωριά που υπάρχουν [22].

Το έντομο, *Bactrocera oleae*, κοινώς δάκος της ελιάς, είναι ο πιο σημαντικός εχθρός της ελιάς. Υπολογίζεται ότι η μείωση στην παραγωγή του λαδιού, συνέπεια του δάκου, μπορεί να φθάσει μέχρι και το 30% της ετήσιας παραγωγής με ανάλογες επιπτώσεις και στη ποιότητα της βρώσιμης ελιάς [23]. Για τον χημικό έλεγχο του δάκου χρησιμοποιούνται κυρίως οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή σκευάσματα. Η χρήση των χημικών εντομοκτόνων, πάντως, εμπεριέχει πολλούς και γνωστούς κινδύνους. Μεταξύ αυτών μπορούν να αναφερθούν: Πρώτον, οικολογικές διαταραχές της σχέσης θηρευτή-θηράματος στο σύστημα, συχνά προς όφελος των εντόμων εχθρών. Δεύτερον, δημιουργία και εξάπλωση της ανθεκτικότητας στα εντομοκτόνα. Τρίτον, εξάρσεις πληθυσμών δευτερευόντων εχθρών, Τέταρτον, επιβλαβείς τοξικολογικές επιδράσεις λόγω της μόλυνσης εδάφους, υδάτων και αέρος και την εισαγωγή τους στην τροφική αλυσίδα ως τοξικά υπολείμματα στα ζώα, πτηνά και ψάρια. Και, τέλος, βλαβερές συνέπειες στην υγεία του ανθρώπου, είτε αυτός είναι ο καλλιεργητής είτε ο καταναλωτής. Πολλοί από αυτούς του κινδύνους είναι πια φανεροί όχι μόνο στους επιστήμονες αλλά και στους καλλιεργητές και τους καταναλωτές που απαιτούν καθαρότερο και ασφαλέστερο περιβάλλον καθώς επίσης και ποιότητα τροφίμων [23].

Η μη ορθολογική χρήση των εντομοκτόνων τα τελευταία 20 χρόνια οδήγησε σε μια δραματική αύξηση της ανθεκτικότητας των εντόμων με αποτέλεσμα τα εντομοκτόνα να γίνονται αναποτελεσματικά. Έτσι υπάρχει ένας φαύλος κύκλος με μια συνεχή ανάγκη χρησιμοποίησης όλο και μεγαλύτερων ποσοτήτων εντομοκτόνων για την αντιμετώπιση των όλο και ανθεκτικότερων εντόμων [23].

Ως εκ τούτου, είναι φανερή η ανάγκη ελέγχου τόσο των υπολειμμάτων των εντομοκτόνων στην τροφική αλυσίδα που διέρχονται μέσω των προϊόντων του ελαιόδεντρου, ελαιόλαδο και ελιές, όσο και στη φύση.

Η παρούσα έρευνα, λοιπόν, αποσκοπούσε αφενός στη δημιουργία μεθόδου για τον έλεγχο υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων-πυρεθροειδών στο ελαιόλαδο και αφετέρου στη γνωστοποίηση των αποτελεσμάτων στους αρμόδιους φορείς συμβάλλοντας έτσι στην βελτίωση της ποιότητας του ελληνικού ελαιολάδου.

2. Κατηγορίες και ποιότητες λαδιών

2.1. Παραγωγή ελαιολάδου

Ο καρπός μαζεύεται από το Νοέμβριο έως και το Μάρτιο, δηλαδή έξι με οχτώ μήνες μετά την εμφάνιση της ανθοφορίας του δένδρου. Για την παραγωγή της καλύτερης ποιότητας λαδιού, ο καρπός πρέπει να μαζεύεται όταν αλλάζει το χρώμα του, τότε δηλαδή που υπάρχει η μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε λάδι και η καλύτερη γεύση. Μολονότι έχουν κάνει την εμφάνισή τους μηχανές, το μάζεμα του καρπού γίνεται στις περισσότερες χώρες με τον παραδοσιακό τρόπο, με τα χέρια. Οι εργάτες τινάζουν τα κλαδιά με ραβδιά, αφού απλώσουν πανιά ή δίχτυα για τη συλλογή του καρπού, και συγκεντρώνουν τον καρπό σε τσουβάλια. Σε κάποιες περιοχές, δεν κάνουν ούτε αυτό, αλλά περιμένουν τον καρπό να ωριμάσει και να πέσει μόνος του από το δένδρο (π.χ., στην Κέρκυρα). Βέβαια, το λάδι αυτό δεν είναι πολύ καλής ποιότητας. Όταν μαζευτεί ο καρπός, πρέπει να μεταφερθεί στο ελαιοτριβείο όσο γίνεται πιο γρήγορα (1-2 μέρες). Αυτό συμβαίνει, γιατί αν αφεθεί ο καρπός οι ελιές αρχίζουν να αλλοιώνονται (επέρχεται ζύμωση) [24].

Κατά επεξεργασία του καρπού, για να πάρουμε το λάδι, ο καρπός συνθλίβεται με μηχανικά μέσα. Τα παλιά χρόνια, οι άνθρωποι χρησιμοποιούσαν μεγάλους πέτρινους τροχούς για να συνθλίσουν τον καρπό και να πάρουν το λάδι του. Σήμερα οι ελιές μπαίνουν σε μηχανές με ανοξείδωτους τροχούς, αφού πρώτα πλένονται και διαχωρίζονται από τα φύλλα, και στη συνέχεια πολτοποιούνται και συμπιέζονται. Προστίθεται νερό στον πολτό και, αφού περάσει από μηχανές που φιλτράρουν τυχόν ιζήματα, το νερό και το λάδι διαχωρίζονται. Η διαδικασία είναι φυσική χωρίς να προστίθενται άλλα υλικά (πέρα από το νερό). Το ελαιόλαδο είναι στην πραγματικότητα το μόνο είδος λαδιού που μπορεί να φαγωθεί, όπως βγαίνει από τον καρπό [23].

Όπως και το καλό κρασί, έτσι και κάθε ποικιλία ελαιόλαδου κρίνεται από τη γεύση, το χρώμα, το άρωμα και την οξύτητά του. Κάθε είδος ελαιόλαδου είναι μοναδικό αφού είναι προϊόν εντελώς συγκεκριμένων συνθηκών (έδαφος, κλίμα, τύπος και ηλικία ελαιόδεντρων, εποχή που μαζεύτηκε ο καρπός και επεξεργασία του). Το χρώμα του είναι βασικά πράσινο, αλλά οι αποχρώσεις του πολλές.

Η γεύση μπορεί να είναι έντονη ή απαλότερη, ακόμα και λίγο καυτερή. Όταν γίνεται σωστά η επεξεργασία του ελαιόλαδου, διατηρεί πλήρως το άρωμα, τις βιταμίνες και τη γεύση του καρπού από τον οποίο προήλθε [24].

2.2. Ελαιόλαδο

2.2.1. Διατροφική αξία

Το ελαιόλαδο είναι το μόνο λάδι που καταναλώνεται στη φυσική του κατάσταση με αποτέλεσμα να διατηρεί όλα τα ευγενή πρωτογενή συστατικά του καρπού και να είναι τροφή πραγματικά βιογενής. Χάρη στην ισορροπημένη σύνθεση του σε κορεσμένα και ακόρεστα λιπαρά οξέα ανταποκρίνεται απόλυτα στις απαιτήσεις διατροφής του οργανισμού [24].

2.2.2. Τα είδη ελαιολάδου

1. Παρθένα ελαιόλαδα : Έλαια που λαμβάνονται από τον ελαιόκαρπο αποκλειστικά με μηχανικές ή άλλες φυσικές μεθόδους υπό συνθήκες ιδίως θερμικές, οι οποίες δεν συνεπάγονται αλλοίωση του ελαίου και τα οποία δεν έχουν υποστεί άλλη επεξεργασία πλυν της πλύσης, της καθίζησης, της φυγοκέντρησης και της διήθησης, εξαιρουμένων των ελαίων που έχουν ληφθεί μετά από επεξεργασία με διαλύτη ή με μεθόδους επανεστεροποίησης και κάθε μίγματος με έλαια άλλης φύσης.

Τα έλαια αυτά κατατάσσονται στις ακόλουθες κατηγορίες και λαμβάνουν τις ακόλουθες ονομασίες:

α) Εξαιρετικό παρθένο ελαιόλαδο: Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 6.5 του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 0,8 g ανά 100 g και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

β) Παρθένο ελαιόλαδο: Παρθένο ελαιόλαδο του οποίου ο βαθμός οργανοληπτικής αξιολόγησης είναι ίσος ή ανώτερος του 5.5 του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι κατά μέγιστο 2,0 g ανά 100 g και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή. (μπορεί να χρησιμοποιείται και ο χαρακτηρισμός "εκλεκτό" στο στάδιο της παραγωγής και του χονδρικού εμπορίου).

γ) Λαμπατέ ελαιόλαδο: Πρόκειται για παρθένο ελαιόλαδο του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, είναι ανώτερη των 2,0 g ανά 100 g και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

2. Εξευγενισμένο (ραφινέ) ελαιόλαδο: Ελαιόλαδο λαμβανόμενο από εξευγενισμένο παρθένο ελαιόλαδο, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει τα 0,3 g ανά 100 g και του οποίου χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα με τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

3. Ελαιόλαδο αποτελούμενο από εξευγενισμένα ελαιόλαδα και παρθένα ελαιόλαδα

Ελαιόλαδο προερχόμενο από ανάμιξη εξευγενισμένου ελαιολάδου και παρθένου ελαιολάδου εξαιρουμένου του μειονεκτικού, του οποίου η ελεύθερη οξύτητα, εκφραζόμενη σε ελαϊκό οξύ, δεν υπερβαίνει το 1,0 g ανά 100 g και του οποίου τα λοιπά χαρακτηριστικά είναι σύμφωνα προς τα προβλεπόμενα για την κατηγορία αυτή.

2.2.3.Επιλογή λαδιού

Δεν χρειάζεται να έχουμε γνώσεις χημικού ή να καταγόμαστε από ελαιοπαραγωγική περιοχή για να ξεχωρίσουμε το καλό λάδι. Ευαίσθητος ουρανίσκος και μύτη είναι αυτά που χρειάζονται για να μπορεί ο οποιοσδήποτε να διαγνώσει την ποιότητα του λαδιού που βάζει στο φαγητό του. Κι αυτό γιατί η γεύση και το άρωμα είναι τα χαρακτηριστικά που σε συνδυασμό με το χρώμα μπορούν να αποτελέσουν τα πιο αξιόπιστα κριτήρια αξιολόγησης. Το καλό λάδι φαίνεται από άρωμα, όπως και στο κρασί οι γευσιγνώστες αναζητούν στο λάδι οσμές ευχάριστες και ξεχωριστές, που αποκαλύπτουν την ποικιλία του καρπού και όχι μόνο. Ευαίσθητες μύτες εντοπίζουν φρουτώδη αρώματα, έντονη αλλά ταυτόχρονη ευχάριστη μυρωδιά λαδιού. Επίσης από την γεύση οπού το καλό λάδι δημιουργεί μια γλυκιά και ευχάριστη αίσθηση στα χείλη. Αν δοκιμάσετε ελαιόλαδο και φέρνοντας το στο βάθος της γλώσσας σας νιώσετε μετά από μερικά δευτερόλεπτα ένα ευχάριστο κάψιμο αυτό είναι καλό σημάδι [24].

Αν όμως το τσούξιμο είναι πολύ έντονο σημαίνει ότι η οξύτητα του είναι αυξημένη. Η πικρή γεύση υποδηλώνει το πόσο ώριμος ήταν ο καρπός, ενώ η λεγόμενη "παχιά" και "λιπαρή" γεύση, χωρίς άλλα χαρακτηριστικά αποκαλύπτει τα ραφινάρισμα λάδια. Τέλος το χρώμα οπού το καλό λάδι έχει ζωντανό σκούρο πράσινο χρώμα, που υποδηλώνει το βαθμό ωρίμανσης των καρπών, αλλά και την ποικιλία από την οποία προήλθε [24].

2.2.4. Περιοχές που παράγουν το καλύτερο λάδι

Πρώτος σε συγκομιδή λαδιού έρχεται ο νομός Λέσβου, που καλύπτει το 15% της ετήσιας παραγωγής, όμως τα περισσότερα ελαιόδεντρα τα έχει η Πελοπόννησος. Το κλίμα της Κρήτης ευνοεί την ανάπτυξη της ελιάς και το κρητικό ελαιόλαδο είναι ίσως το πιο φημισμένο. Όμως, λάδι εκλεκτό παράγει και η Κέρκυρα, η Στερεά Ελλάδα και η Εύβοια [24].

Η κορωνέικη ελιά, που έλκει την καταγωγή της από την Κορώνη Μεσσηνίας είναι ίσως η κορυφαία σε ποιότητα ποικιλία. Η λεγόμενη λανιοελιά της Κρήτης, που καλλιεργείται στην Πελοπόννησο, αλλά και στις Κυκλάδες είναι ίσως η αμέσως επόμενη σε ποιότητα ποικιλία. Ακολουθεί η κολοβή ή βαλανολιά, η ποικιλία που αποτελεί το σήμα κατατεθέν της Λέσβου και της Χίου που δίνει πολύ καλό λάδι. Στη συνέχεια, έρχεται η τσουνάτη, που καλλιεργείται σε μερικές περιοχές του Ρεθύμνου και των Χανίων, αλλά και στη Λακωνία και έπειτα η κουτσουροελιά, ευρύτερα διαδεδομένη στην Πελοπόννησο, που έχει μεγάλη απόδοση σε λάδι, όχι όμως τόσο καλής ποιότητας. Στους Δελφούς και την Άμφισσα καλλιεργείται η ποικιλία μανάκι που δίνει επιτραπέζιες ελιές, αλλά και λάδι καλής ποιότητας. Ιδιαίτερα αξιόλογο για την ποιότητα του είναι και το λάδι που παράγεται στην Χαλκιδική που παράγεται από μεγάλες βρώσιμες ελιές που λέγονται γαιδουροελιές [24].

3. Φυτοπροστατευτικές ενώσεις

3.1.Εισαγωγή-Ιστορική εξέλιξη φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Η χρησιμοποίηση των χημικών ουσιών για την αντιμετώπιση των εχθρών και των παθογόνων μικροοργανισμών έχει τις ρίζες της στην αρχαιότητα. Οι Έλληνες χρησιμοποιούσαν το θείο (S) και οι Ρωμαίοι χρησιμοποιούσαν τη στάχτη φυτών και τα εκχυλίσματα από φυτά κυπαρισσιού για την αντιμετώπιση των μυκητολογικών προσβολών. Επιπλέον, ο Πλίνιος αναφέρει τη χρησιμοποίηση ενώσεων αρσενικού για την αντιμετώπιση εντομολογικών προσβολών [4].

Αργότερα, κατά τον δέκατο έβδομο και δέκατο όγδοο αιώνα, εκχυλίσματα φυτών όπως η νικοτίνη (καπνός) και το πύρεθρο (χρυσάνθεμο) χρησιμοποιήθηκαν σε ευρεία κλίμακα για την αντιμετώπιση των εντόμων. Το δέκατο ένατο αιώνα αναπτύχθηκαν ανόργανα εντομοκτόνα, κυρίως παράγωγα του αρσενικού, αλλά και μυκητοκτόνα που είχαν ως βάση το χαλκό (βορδιγάλιος πολτός το 1882 από τον Millardet). Αργότερα τον ίδιο αιώνα, παρασκευάστηκαν και άλλα μυκητοκτόνα που περιείχαν κασσίτερο και υδράργυρο [4].

Στις αρχές του εικοστού αιώνα παρασκευάστηκαν νέα ανόργανα εντομοκτόνα με βάση κυρίως το κυάνιο. Επιπλέον, ενώσεις θεικού σιδήρου και χλωρικού νατρίου χρησιμοποιήθηκαν ως ζιζανιοκτόνα. Αργότερα, η δημιουργία των διθειοκαρβαμιδικών μυκητοκτόνων θεωρείται ως το ορόσημο της παρασκευής Οργανικών Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων. Στη συνέχεια, η παρασκευή του δίχλωρο-διφαινυλο-τριχλωροαιθανίου (DDT) και των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων οδήγησε στην ταχεία εξάπλωση και στην ευρεία χρήση των ουσιών αυτών με σκοπό την προστασία της γεωργικής παραγωγής, αλλά και της δημόσιας υγείας. Τέλος, η παρασκευή των φαινοξυαλκανοϊκών ζιζανιοκτόνων και των καρβαμιδικών και πυρεθροειδών εντομοκτόνων συνέβαλε στην επικράτηση των χημικών μέσων ως την κυριότερη μέθοδο αντιμετώπισης των εχθρών και των παθογόνων μικροοργανισμών των καλλιεργούμενων φυτών [4].

3.2. Αναγκαιότητα χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων

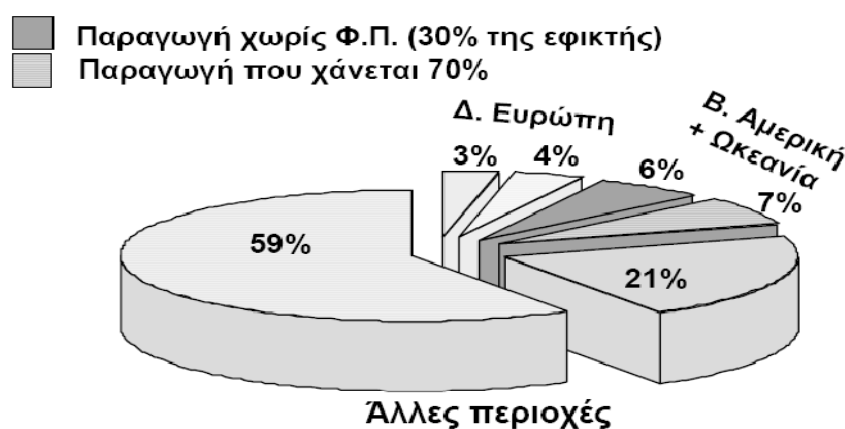
Σύμφωνα με το Νόμο 721/1977 ως **Γεωργικό Φάρμακο** ορίζεται «κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών, συμπεριλαμβανομένων και επεξεργασμένων ή μη φυτικών προϊόντων, δυναμένη να χρησιμοποιηθεί ως μέσον καταπολέμησης των εχθρών και ασθενειών των φυτών ή να βελτιώσει την αποτελεσματικότητα των εν λόγω ουσιών». Στα πλαίσια της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) ο όρος αυτός έχει αντικατασταθεί από εκείνο των Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων (Φ.Π.) [4,14].

Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα ονομάζονται οι δραστικές ουσίες και τα σκευάσματα τα οποία περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες και χρησιμοποιούνται για [4,14]:

- την προστασία των φυτών ή των φυτικών προϊόντων από επιβλαβείς οργανισμούς ή για να προλαμβάνουν τη δράση αυτών,
- να επηρεάζουν τις βιολογικές διεργασίες των φυτών (ρυθμιστές αύξησης),
- να διατηρούν τα φυτικά προϊόντα (όχι οι ουσίες που χαρακτηρίζονται ως συντηρητικά),
- να καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα φυτά και
- να καταστρέφουν μέρη των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη αυτών(Οδηγία 91/414/ΕΟΚ).

Η παρουσία των εχθρών και των παθογόνων μικροοργανισμών στα καλλιεργούμενα φυτά έχει ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση της φυτικής παραγωγής και την υποβάθμιση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων. Η μείωση αυτή της παραγωγής ανέρχεται περίπου στο 70% της παγκόσμιας εφικτής παραγωγής στις περιοχές που δε χρησιμοποιούνται φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Σχήμα 1). Επιπλέον, στις περιοχές όπου η παραγωγή των αγροτικών προϊόντων γίνεται με τη βοήθεια των φυτοπροστατευτικών προϊόντων χάνεται περίπου το 42% της παγκόσμιας εφικτής παραγωγής (Σχήμα 2) [3].

Από τα παραπάνω γίνεται κατανοητό ότι απαιτείται η χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων προκειμένου να παραχθούν αγροτικά προϊόντα σε επαρκείς για τον πληθυσμό ποσότητες, αλλά και επιβάλλεται η αποτελεσματικότερη χρήση αυτών, προκειμένου να φθάσει η παγκόσμια παραγωγή αγροτικών προϊόντων την μέγιστη δυνατή [21].

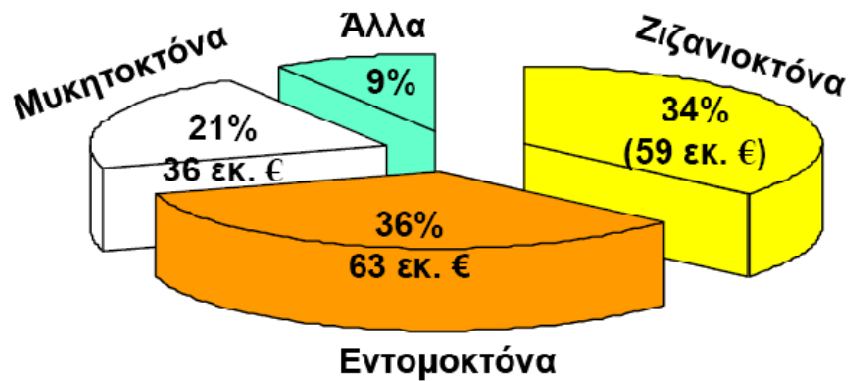


Σχήμα 1. Συμμετοχή διαφόρων περιοχών της γης στην παγκόσμια εφικτή παραγωγή γεωργικών προϊόντων η οποία επιτυγχάνεται χωρίς τη χρήση Φ.Π. (Oerke)

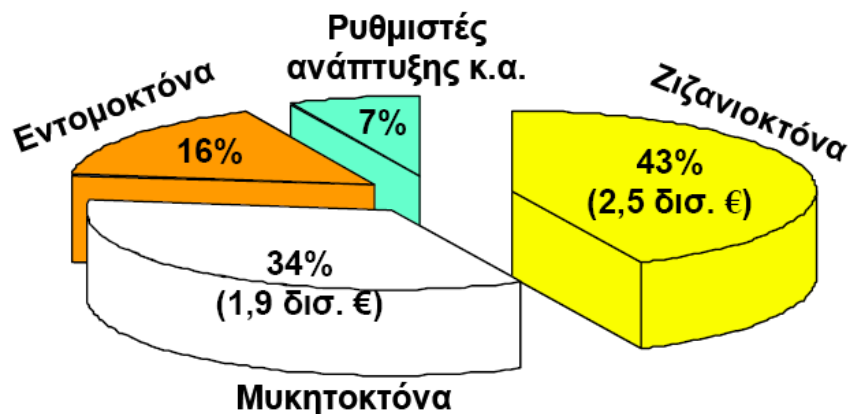


Σχήμα 2. Συμμετοχή διαφόρων περιοχών της γης στην παγκόσμια εφικτή παραγωγή γεωργικών προϊόντων η οποία επιτυγχάνεται με χρήση Φ.Π. (Oerke)

Για το σκοπό αυτό στην Ελλάδα κατά το 2001 δαπανήθηκαν 173 εκατομμύρια € για αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων (Σχήμα 3), ενώ στην Ευρώπη το 1995 το ποσό αυτό ανήλθε στα 5,8 δισεκατομμύρια € (Σχήμα 4) [3].



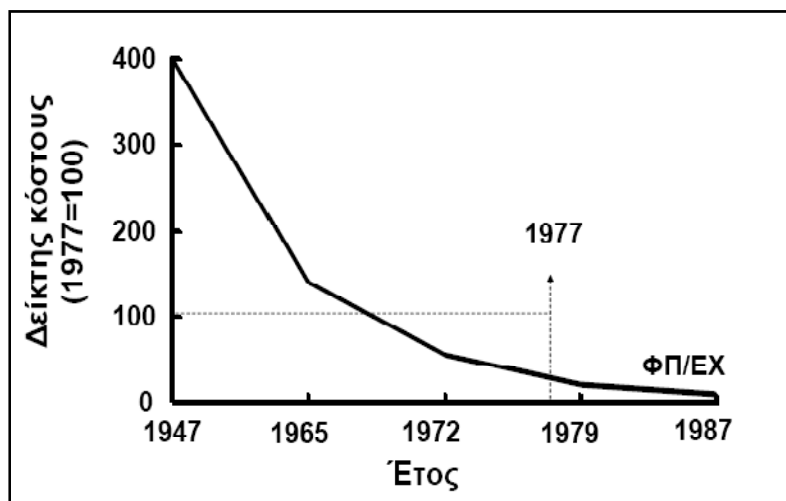
Σχήμα 3. Δαπάνες για αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην Ελλάδα το 2001 (Ε.ΣΥ.Φ., 2001)



Σχήμα 4. Δαπάνες για αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων στη Δυτική Ευρώπη το 1995 (ECPA Industry Statistics, 1995).

Η χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων επεκτάθηκε και καθιερώθηκε ως η κυριότερη μέθοδος αντιμετώπισης των εχθρών και των παθογόνων μικροοργανισμών που προσβάλλουν τα καλλιεργούμενα φυτά εξαιτίας [5] :

- i. της ύπαρξης δυσεξόντων εχθρών, οι οποίοι δεν αντιμετωπίζονται αποτελεσματικά με άλλες μεθόδους ή μέσα αντιμετώπισης,
- ii. της μεγάλης αποτελεσματικότητας και αξιοπιστίας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, κυρίως όταν ακολουθούνται πιστά οι οδηγίες που αναγράφονται στην ετικέτα του σκευάσματος,
- iii. του μεγάλου εύρους εχθρών που μπορούν να αντιμετωπίσουν (π.χ. με την εφαρμογή ενός μόνο ζιζανιοκτόνου αντιμετωπίζονται όλα τα πλατύφυλλα ζιζάνια της καλλιέργειας)
- iv. της ευκολίας στη χρήση τους, εφόσον η εφαρμογή τους γίνεται με το κατάλληλο ψεκαστικό μηχάνημα και
- v. του μικρού κόστους που απαιτείται για την εφαρμογή τους, σε σύγκριση με εκείνο των άλλων μεθόδων και κυρίως με εκείνο των εργατικών χεριών (Σχήμα 5).



Σχήμα 5. Δείκτης κόστους Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων (ΦΠ) προς εργατικά χέρια (ΕΧ) (Bridges, 1994).

3.3.Βιολογική δράση φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Η βιολογική δράση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων εκφράζεται συνήθως ως ποσοστό (%) των οργανισμών που θανατώθηκαν από την επίδραση αυτών (φυτοπροστατευτικών προϊόντων). Επιπλέον, ο προσδιορισμός της βιολογικής δράσης μπορεί να γίνει ακόμη και όταν δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης του συγκεκριμένου φυτοπροστατευτικού προϊόντος [4,5].

3.3.1. Τρόπος και μηχανισμός δράσης

Ο όρος «τρόπος δράσης» (mode of action) ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος αναφέρεται στην αλληλουχία των γεγονότων που συμβαίνουν σε ένα εχθρό ή παθογόνο μικροοργανισμό από τη στιγμή που το φυτοπροστατευτικό προϊόν απορροφηθεί από τους ιστούς του και μέχρι το θάνατό του. Ο όρος «μηχανισμός δράσης» (mechanism of action) ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος αναφέρεται στη φυσιολογική ή βιοχημική διεργασία του εχθρού ή του παθογόνου μικροοργανισμού που αναστέλλεται εξαιτίας της παρουσίας του φυτοπροστατευτικού προϊόντος.

Η γνώση του τρόπου και του μηχανισμού δράσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι απαραίτητη προκειμένου να επιτευχθεί η αποτελεσματική αντιμετώπιση του εχθρού ή του παθογόνου μικροοργανισμού, αλλά και να περιοριστούν στο ελάχιστο οι δυσμενείς επιδράσεις σε οργανισμούς μη στόχους και το περιβάλλον [22,25].

3.3.2. Αποτελεσματικότητα, τοξικότητα και εκλεκτικότητα

Ως Αποτελεσματικότητα (effectiveness) ορίζεται το σύνολο των τοξικών ή δυσμενών επιδράσεων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που προκαλείται στους οργανισμούς στόχους επί των οποίων εφαρμόζονται [25].

Η Τοξικότητα (toxicity) αποτελεί το σύνολο των δυσμενών επιδράσεων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που προκαλείται στους διάφορους οργανισμούς μη στόχους. Ειδικότερα, η δυσμενής επίδραση στα καλλιεργούμενα φυτά χαρακτηρίζεται ως Φυτοτοξικότητα (phytotoxicity) [25].

Με τον όρο Επικινδυνότητα (hazardous) ορίζεται η πιθανότητα ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος να προκαλέσει κάποιας μορφής φυτοτοξικότητα, εάν χρησιμοποιηθεί κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες [25].

Εκλεκτικότητα (selectivity) ονομάζεται ο συνδυασμός της μικρής τοξικότητας (στο καλλιεργούμενο φυτό ή το αρπακτικό έντομο ή άκαρι) με την υψηλή αποτελεσματικότητα ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος [25].

Κατά κανόνα, η εκλεκτικότητα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων επιτυγχάνεται μόνο σε συγκεκριμένες συνθήκες και για το λόγο αυτό, πρέπει να τηρούνται με ακρίβεια οι οδηγίες που αναγράφονται στην ετικέτα κάθε φυτοπροστατευτικού προϊόντος [25].

3.4. Τύποι φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα μπορεί να είναι χημικώς συντιθέμενες ανόργανες ή οργανικές ενώσεις, καθώς και φυσικώς συντιθέμενα προϊόντα μεταβολισμού ανώτερων φυτών ή μικροοργανισμών. Επιπλέον, μπορεί να είναι σκευάσματα που περιέχουν τους ίδιους τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι εφαρμόζονται όπως και τα χημικώς συντιθέμενα φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Αυτά (φυτοπροστατευτικά προϊόντα), ανάλογα με τον εχθρό ή το παθογόνο μικροοργανισμό που καταπολεμούν και γενικότερα ανάλογα με τη χρήση τους μπορούν να καταταγούν ως [25]:

1. Ζιζανιοκτόνα,
2. Εντομοκτόνα,
3. Ακαρεοκτόνα,
4. Νηματωδοκτόνα,
5. Μυκητοκτόνα,
6. Βακτηριοκτόνα,
7. Τρωκτικοκτόνα,
8. Κοχλιολειματοκτόνα,
9. Ρυθμιστές ανάπτυξης,
10. Αποφυλλωτικά,
11. Ελκυστικά – Απωθητικά και
12. Βοηθητικές ουσίες.

Από όλες αυτές τις κατηγορίες αυτή που μας ενδιαφέρει περισσότερο στην παρούσα μελέτη είναι τα εντομοκτόνα.

3.4.1.Εντομοκτόνα.

Τα εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται στη φυτοπροστασία των αγροτικών προϊόντων, αλλά και στην δημόσια υγιεινή προέρχονται από διάφορες χημικές ομάδες. Από αυτές οι περισσότερο χρησιμοποιούμενες είναι τα οργανοχλωριωμένα, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά και τα πυρεθροειδή [25].

Οργανοχλωριωμένα: Aldrin, Camphechlor, Chlordane, DDT, Dieldrin, Endrin, Endosulfan, Heptachlor, Lindane, Methoxychlor.

Τα οργανοχλωριωμένα (γνωστά και ως χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες) είναι μία από τις πρώτες ομάδες των χημικώς συντιθέμενων φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιήθηκαν στην παραγωγή των αγροτικών προϊόντων. Τα εντομοκτόνα της ομάδας αυτής χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν για τον έλεγχο επιβλαβών στη δημόσια υγεία εντόμων, εξαιτίας της μεγάλης αποτελεσματικότητας (ταχεία δράση) και υπολειμματικής τους διάρκειας στο περιβάλλον. Επιπλέον, χρησιμοποιήθηκαν για την καταπολέμηση των εντόμων και των ακάρεων που προσβάλλουν τα καλλιεργούμενα φυτά, αλλά η χρήση τους περιορίστηκε τα τελευταία χρόνια εξαιτίας της μεγάλης τοξικότητας που εκδηλώνουν εναντίον ορισμένων θηλαστικών και της βιοσυσσώρευσής τους στους λιπώδεις ιστούς των ζώων, λόγω της αυξημένης λιποδιαλυτότητάς τους. Τα οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα εκδηλώνουν ισχυρότερη εντομοκτόνο δράση σε χαμηλές θερμοκρασίες και χρησιμοποιούνται, πλέον, σε περιορισμένη κλίμακα για τον έλεγχο ορισμένων εντόμων και τρωκτικών.

Συμπτώματα: Υπερδιέγερση, σπασμοί, παράλυση, θάνατος.

Μηχανισμός δράσης: Διαταράσσουν τη λειτουργία της αντλίας νατρίου κατά μήκος της νευρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία νατρίου/καλίου. Επιπλέον, σχηματίζουν σύμπλοκα με τις λιποπρωτεΐνες των μεμβρανών στα μιτοχόνδρια και στα πλαστίδια με αποτέλεσμα να επηρεάζονται η οξειδωτική φωσφορυλίωση και η αντίδραση του Hill, αντίστοιχα.

Οργανοφωσφορικά: Acephate, Azinphos-ethyl, Bromophos, Chlorthion, Chlorfevinphos, Chlorpyrifos, Dichlorvos, Dimethoate, Fenchlorphos, Fenthion, Malathion, Metasystox, Methyl-parathion, Monocrotophos, Metamidophos, Parathion, Phorate, Phosdrin, Pirimiphos-methyl, Quinalphos.

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι μία από τις σημαντικότερες ομάδες φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται ευρέως για την αντιμετώπιση εντόμων και ακάρεων που προσβάλλουν τα καλλιεργούμενα φυτά. Αυτά (οργανοφωσφορικά) είναι παράγωγα των φωσφορικών ενώσεων και μερικά από αυτά συγκαταλέγονται μεταξύ των τοξικότερων γνωστών χημικών ουσιών.

Συμπτώματα: Μείωση της πίεσης του αίματος, παράλυση διαφράγματος, παράλυση αναπνευστικού κέντρου του εγκεφάλου, ασφυξία, σπασμοί, παραγωγή σάλιου, εμετός, εφίδρωση, ζάλη, βραδυκαρδία, πονοκέφαλος, μυδρίαση, θάνατος.

Μηχανισμός δράσης: Πολλά οργανοφωσφορικά απορροφώνται μέσω του δέρματος, των πνευμόνων ή της πεπτικής οδού. Παρεμποδίζουν τα ζωικά και ανθρώπινα νευρικά συστήματα, εξαιτίας της δράσης τους (περίσσεια ακετυλοχολίνης) στις χολινεργικές συνάψεις (συνάψεις κεντρικού νευρικού συστήματος).

Καρβαμιδικά: Aldicarb, Carbosulfan, Carbofuran, Carbaryl, Methomyl, Oxamyl, Pirimicarb, Propoxur, Thiodicarb, Thiofanox, Trimethacarb, Xylcarb.

Τα καρβαμιδικά είναι χημικώς συντιθέμενα εντομοκτόνα, ευρέως χρησιμοποιούμενα για την αντιμετώπιση εντόμων και ακάρεων. Είναι φυτοπροστατευτικά προϊόντα με μεγάλη αποτελεσματικότητα και μικρή υπολειμματική διάρκεια στο περιβάλλον. Οι χημικές ουσίες αυτές είναι παράγωγα του καρβαμικού οξέος και εκτός από τη χρήση τους ως εντομοκτόνα, μερικοί τύποι καρβαμιδικών χρησιμοποιούνται ως μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και νηματωδοκτόνα.

Συμπτώματα: Παράλυση, θάνατος.

Μηχανισμός δράσης: Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα αναστέλλουν τη δράση της ακετυλοχολινεστεράσης.

Πυρεθροειδή: Allethrin, Bifenthrin, Cyhalothrin, Cypermethrin, Deltamethrin, Fenvalerate, Fluvalinate, Permethrin, Phenothrin, Resmethrin, Tetramethrin, Tralomethrin.

Τα πυρεθροειδή είναι πολύ δραστικά εντομοκτόνα (εφαρμόζονται σε δόσεις 100-1000 φορές μικρότερες από τα υπόλοιπα εντομοκτόνα), με μικρή υπολειμματική διάρκεια στο περιβάλλον. Επιπλέον, ορισμένα πυρεθροειδή εκδηλώνουν και ακαρεοκτόνο δράση. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα της κατηγορίας αυτή εκδηλώνουν ισχυρότερη εντομοκτόνο δράση σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Συμπτώματα: Υπερδιέγερση, σπασμοί, παράλυση, θάνατος.

Μηχανισμός δράσης: Διαταράσσουν τη λειτουργία της αντλίας νατρίου κατά μήκος της νευρικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να διαταράσσεται η ισορροπία νατρίου/καλίου.

Αβερμεκτίνες: Abamectin.

Οι αβερμεκτίνες είναι αντιβιοτικά με πολύ ισχυρή εντομοκτόνο και νηματωδοκτόνο δράση. Οι ενώσεις αυτές απομονώνονται από καλλιέργειες μυκήτων όπως ο *Streptomyces avermitilis*.

Συμπτώματα: Υπερδιέγερση, σπασμοί, παράλυση, θάνατος.

Μηχανισμός δράσης: Οι αβερμεκτίνες επιδρούν στις νευρομυικές συνάψεις των ανασταλτικών νευρώνων.

Φυσικώς συντιθέμενα: Νικοτίνη, Πύρεθρο, Ροτενόνη.

Η νικοτίνη, το πύρεθρο και η ροτενόνη είναι ουσίες φυσικώς συντιθέμενες στα φυτά του καπνού (*Nicotiana tabacum*), του χρυσάνθεμου (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) και των φυτών *Derris* και *Lonchocarpus*, αντίστοιχα. Και οι δύο ουσίες έχουν χρησιμοποιηθεί ως εντομοκτόνα στα καλλιεργούμενα φυτά.

Συμπτώματα: παράλυση, θάνατος.

Μηχανισμός δράσης: Επιδρούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων.

Εντομοκτόνα με ορμονική δράση: Hydroprene, Fenoxycarb, Methoprene.

Τα εντομοκτόνα της κατηγορίας αυτής διαταράσσουν τη φυσιολογική ανάπτυξη των εντόμων, κυρίως αυτών που βρίσκονται στο στάδιο των τέλειων. Χρησιμοποιούνται κυρίως για την προστασία αποθηκευμένων προϊόντων και λιγότερο για εφαρμογές αγρού.

Μηχανισμός δράσης: Προαγωγή ή αναστολή της βιοσύνθεσης ορμονών νεότητας.

Εντομοκτόνα παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης εξωσκελετού: Buprofezin, Cyromazine, Chlorflurazuron, Flufenoxuron, Teflubenzuron.

Τα εντομοκτόνα της κατηγορίας αυτής ανήκουν σε διάφορες χημικές ομάδες όπως παράγωγα φαινυλουρίας, τριαζίνες και αντιβιοτικά.

Μηχανισμός δράσης: Αναστολή της βιοσύνθεσης της χιτίνης με αποτέλεσμα την αδυναμία δημιουργίας εξωσκελετού. Κατά συνέπεια δε μπορούν να μεταμορφωθούν τα έντομα σε τέλεια.

Έλαια: Sunoil, Mineral oil.

Τα έλαια σε μικρές συγκεντρώσεις εκδηλώνουν δράση εναντίον των εντόμων, όμως χρησιμοποιούνται κυρίως σε μίγματα με άλλα εντομοκτόνα, εξαιτίας της μικρής αποτελεσματικότητά τους. Επιπλέον, σε αυξημένες συγκεντρώσεις εμφανίζουν φυτοτοξικότητα, κυρίως όταν περιέχουν υψηλό ποσοστό ακόρεστων υδρογονανθράκων (καταστρέφουν τη δομή των κυτταρικών μεμβρανών των φυτών). Τα προϊόντα αυτά καταπολεμούν τα έντομα (και τα ακάρεα) μέσω της ασφυξίας που προκαλούν. Τα καθαρισμένα ορυκτέλαια που χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα αποτελούνται από πέντε βαθμούς ταξινομημένου πετρελαίου: ελαφρύ, ελαφρύ-μέσο, ενδιάμεσο, βαρύ-μέσο και βαρύ. Επιπλέον, ταξινομούνται και με βάση την εποχή εφαρμογής ως έλαια κατά την περίοδο λήθαργου και θερινά έλαια.

3.5. Υπολείμματα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων

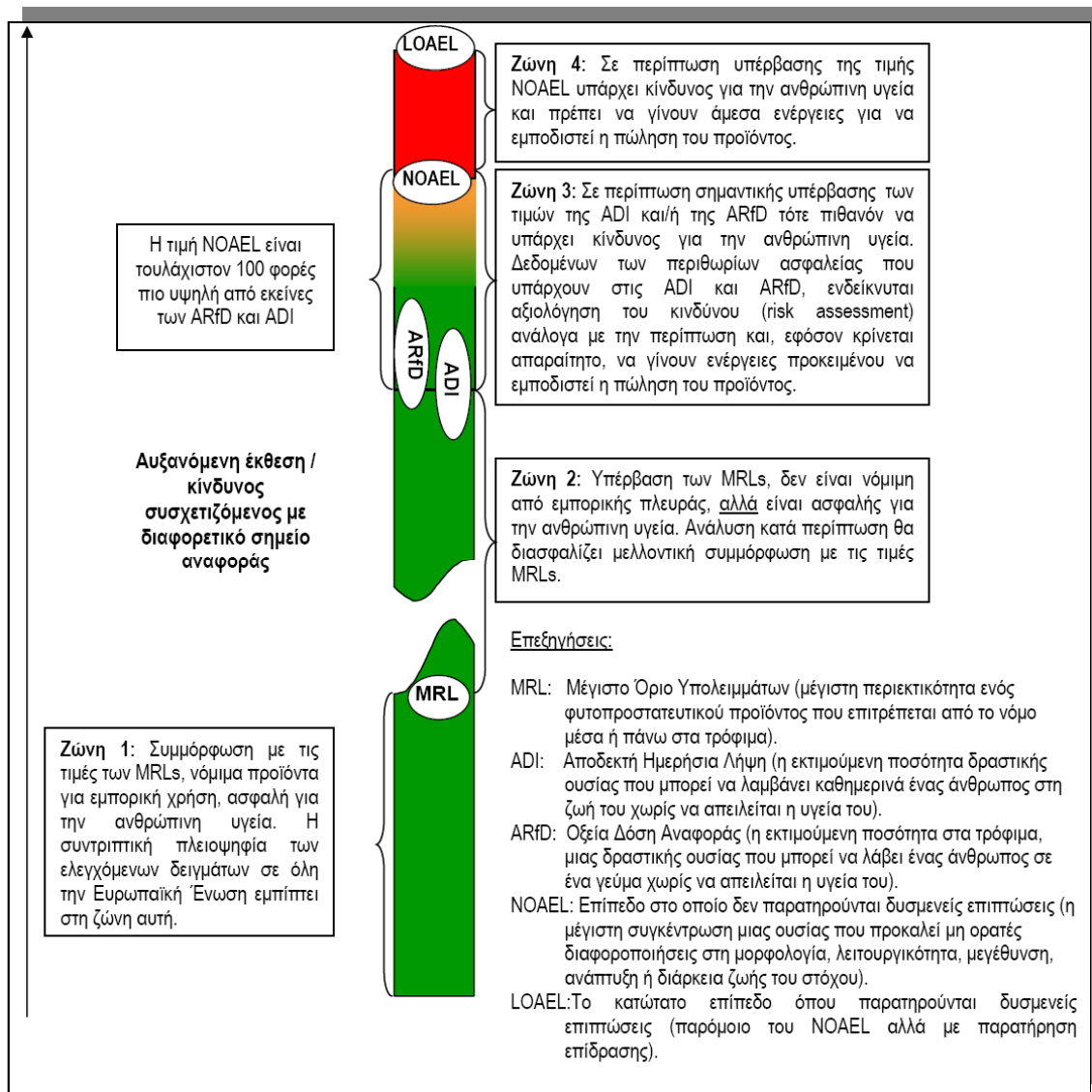
Είναι μία ή περισσότερες ουσίες, παρούσες είτε εντός είτε επί των φυτών, των προϊόντων φυτικής προέλευσης, των βρώσιμων προϊόντων ζωικής προέλευσης ή αλλού στο περιβάλλον, οι οποίες προκύπτουν από τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων, περιλαμβανομένων των μεταβολιτών τους και των προϊόντων που προέρχονται από την αποικοδόμηση ή την αντίδρασή τους [2].

Μέγιστο Όριο Υπολειμμάτων (Maximum Residue Level - MRL) σε προϊόντα φυτικής προέλευσης είναι η μέγιστη ποσότητα υπολείμματος που αναμένεται κατά την εφαρμογή ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος σύμφωνα με την Ορθή Γεωργική Πρακτική [2].

Η Ορθή Γεωργική Πρακτική είναι ο τρόπος εφαρμογής ενός εγκεκριμένου φυτοπροστατευτικού προϊόντος σε μία καλλιέργεια, ο οποίος εξασφαλίζει την αποτελεσματικότητα στην χρήση, έχοντας ως κύριες παραμέτρους τη δόση ανά επιφάνεια (γρ. ή κ. εκ. φυτοπροστατευτικού προϊόντος ανά στρέμμα ή εκτάριο), τον αριθμό των εφαρμογών του φυτοπροστατευτικού προϊόντος, τον ψεκαστικό όγκο (λίτρα νερού ανά στρέμμα ή εκτάριο), καθώς και την τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή (ημέρες) [2,5].

Το MRL εκφράζεται σε mg ουσίας ανά kg βάρους φυτικού προϊόντος ή ppm (parts per million = μέρη στο εκατομμύριο) και αναφέρεται πάντα σε συγκεκριμένο ζευγάρι ουσίας και φυτικού προϊόντος [2].

Συνδέεται με τη διαδικασία έγκρισης κυκλοφορίας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ευρωπαϊκό και σε εθνικό επίπεδο και ορίζεται είτε σε ευρωπαϊκό επίπεδο, οπότε ισχύει υποχρεωτικά για όλα τα Κράτη Μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.), είτε σε επίπεδο ενός Κράτους Μέλους και ισχύει για τις συναλλαγές του συγκεκριμένου Κράτους Μέλους με όλες τις υπόλοιπες χώρες [2].



Σχήμα 6. Βαθμίδες ορίων υπολειμμάτων [25]

3.5.1. Νομικό Πλαίσιο που καλύπτει τα MRLs στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) αλλά και στην Ελλάδα

Ευρωπαϊκά MRLs είναι αυτά που ορίζονται με σχετικές Οδηγίες από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.) και ισχύουν σε όλα τα Κράτη Μέλη από την αναφερόμενη ημερομηνία έναρξης εφαρμογής τους και εφόσον ενσωματωθούν στις εθνικές νομοθεσίες [2,3,14].

Υπάρχουν 4 βασικές Οδηγίες ευρωπαϊκών MRLs οι οποίες είναι οι ακόλουθες:

- 76/895/EK για φρούτα
- 86/362/EK για σιτηρά
- 86/363/EK για τρόφιμα ζωικής προέλευσης
- 90/642/EK για προϊόντα φυτικής προέλευσης, φρούτα και λαχανικά

Περισσότερες από 60 τροποποιητικές Οδηγίες, μέχρι σήμερα, συμπληρώνουν ή τροποποιούν τις προαναφερόμενες με:

1. Νέες δραστικές ουσίες που προστίθενται
2. Καθορισμό MRLs σε επιπλέον καλλιέργειες για ήδη υπάρχουσες δραστικές
3. Νέες τιμές βάσει νέων δεδομένων

Όλες οι Οδηγίες, για να ισχύσουν σε ένα Κράτος Μέλος της Ε.Ε., πρέπει πρώτα να ενσωματωθούν στην εθνική νομοθεσία.

Εφόσον η Οδηγία έχει ενσωματωθεί στην εθνική νομοθεσία, συνεπάγεται ότι με την έναρξη ισχύος της Οδηγίας τα πιθανώς ανιχνεύσιμα υπολείμματα δεν πρέπει να ξεπερνούν τις τιμές που ορίζει η συγκεκριμένη Οδηγία. Ευρωπαϊκά MRLs έχουν ορισθεί για σχεδόν 250 δραστικές ουσίες από τις 1.000 περίπου που υπάρχουν στην Ε.Ε., συμπεριλαμβανομένων των δραστικών ουσιών που ναι μεν έχουν αποσυρθεί από την Ε.Ε., κυκλοφορούν όμως σε τρίτες χώρες από όπου εισάγονται γεωργικά προϊόντα [3,26].

3.5.2. Εθνικά MRLs

Για τις λοιπές δραστικές ουσίες, πέραν των 250 που προαναφέρθηκαν, ορίζονται εθνικά MRLs σε κάθε Κράτος Μέλος ξεχωριστά. Τα εθνικά MRLs ορίζονται ακολουθώντας διαδικασίες και απαιτήσεις που διαφέρουν ανάμεσα στα Κράτη Μέλη και οι οποίες αντικατοπτρίζουν τη συγκεκριμένη Ορθή Γεωργική Πρακτική στην κάθε χώρα [3,26].

Σε αυτήν την περίπτωση τα εθνικά καθοριζόμενα MRLs δεν είναι κοινώς αποδεκτά από όλα τα Κράτη Μέλη της Ε.Ε., με αποτέλεσμα να δημιουργείται μεγάλο πρόβλημα στο εμπόριο γεωργικών προϊόντων [25].



Σχέδιο 7. Νέος κανονισμός για τα MRLs στην Ε.Ε [25]

3.6. Ανάλυση Υπολειμμάτων

Ως ανάλυση υπολειμμάτων αναφέρεται η ανίχνευση και ο προσδιορισμός των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε φυτικά υποστρώματα (προϊόντα), έτσι ώστε να μπορεί να γίνει η αξιολόγησή τους, όσον αφορά στην ασφάλεια του καταναλωτή και την τήρηση της νομοθεσίας [2].

Με τον όρο δειγματοληψία ορίζεται η διαδικασία με την οποία λαμβάνεται μια ή περισσότερες ποσότητες - δείγματα από ένα προϊόν, με σκοπό να υποβληθεί στη συνέχεια σε χημική ανάλυση στο εργαστήριο. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα δείγματα που λαμβάνονται να περιέχουν αντιπροσωπευτική ποσότητα της ουσίας ή των ουσιών που πρόκειται να προσδιορισθούν, ώστε το τελικό αποτέλεσμα και συμπέρασμα της χημικής ανάλυσης να εκφράζεται για όλο το αρχικό προϊόν [2,7].

Η δειγματοληψία αποτελεί βασική διαδικασία για την εύρεση, με χημική ανάλυση, ενός σωστού αποτελέσματος. Οι δύο βασικές αρχές που ισχύουν κατά τη λήψη ενός δείγματος είναι:

- Το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό
- Να παρθεί επαρκής ποσότητα δείγματος, ώστε το αποτέλεσμα να είναι αξιόπιστο

Μέχρι πριν κάποια χρόνια, τα εργαστήρια για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων χρησιμοποιούσαν σαν εξοπλισμό τον υγρό χρωματογράφο υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), ούτως ώστε να ανιχνεύουν ουσίες μη πτητικές και ευαίσθητες σε υψηλές θερμοκρασίες, καθώς και τον αέριο χρωματογράφο (Gas Liquid Chromatography, GLC) για την ανάλυση πτητικών ή μη πτητικών ενώσεων, με όρια προσδιορισμού (ανάλογα με τη μεθοδολογία, την εμπειρία του αναλυτή και το υπό ανάλυση φυτοπροστατευτικό προϊόν) συνήθως τα ppm (μέρη στο εκατομμύριο).[2] Σήμερα με τη χρήση των μηχανημάτων μάζας LC-MS-MS, GC-MS-MS και GC-ECD και με τις κατάλληλες μεθοδολογίες, δίνεται η δυνατότητα για ανίχνευση υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε επίπεδο πλέον ppb (parts per billion), δηλαδή μέρη στο δισεκατομμύριο.

4. Νομοθεσία φυτοφαρμάκων

Δεν υπάρχει αμφιβολία ότι τα φυτοφάρμακα έχουν συνεισφέρει σημαντικά στην αποτελεσματική προστασία της γεωργίας και της ζωικής παραγωγής ενάντια σε βλαβερούς οργανισμούς, καθώς και στον έλεγχο των εντόμων που μεταδίδουν ασθένειες. Εν τούτοις, οι ίδιες χημικές ουσίες, λόγω των τοξικών τους ιδιοτήτων, θέτουν σε ενδεχόμενο κίνδυνο τους χρήστες των φυτοφαρμάκων, το περιβάλλον και τους καταναλωτές των τροφίμων. Αυτοί οι κίνδυνοι πρέπει να ελαχιστοποιηθούν με τη σωστή και ασφαλή χρήση των φυτοφαρμάκων [1,25].

Η όλο και μεγαλύτερη δραστικότητα και πολυπλοκότητα των φυτοφαρμάκων, καθώς και η αυξανόμενη ανησυχία της κοινής γνώμης σχετικά με τις παρενέργειές τους, έχουν οδηγήσει τις κυβερνήσεις στο να θέσουν κανόνες και όρια σχετικά με την κατάλληλη χρήση τους και να παρέχουν συνεχή υποστήριξη από την κατασκευή έως την τελική χρήση των φυτοφαρμάκων [1,25].

Ο στόχος της σχετικής με τα φυτοφάρμακα νομοθεσίας είναι να προστατεύσει την κοινωνία από τις βλαβερές συνέπειες της ακατάλληλης χρήσης φυτοφαρμάκων, δίνοντάς της τη δυνατότητα να επωφεληθεί από τα πλεονεκτήματά τους [1,25].

Οι νόμοι και τα κριτήρια που έχουν διαμορφωθεί αφορούν [1]:

Τους χρήστες: Τους αγρότες ενδιαφέρει κυρίως η αποτελεσματικότητα των φυτοφαρμάκων και οι πιθανοί κίνδυνοι που συνδέονται με τη χρήση τους. Χρειάζονται ενημέρωση σε σχέση με τη συνιστώμενη δόση, το στάδιο κατά το οποίο πρέπει να πραγματοποιηθεί η εφαρμογή, τις μεθόδους εφαρμογής, καθώς και τα μέτρα ασφαλείας.

Το κοινό: Τα παιδιά και γενικότερα το κοινό πρέπει να προστατεύονται από την έκθεσή τους σε φυτοφάρμακα εξ αιτίας ακατάλληλης απόρριψης ή διαχείρισης από τους χρήστες.

Τους καταναλωτές: Η ασφάλεια των τροφίμων είναι εξαιρετικής σημασίας για τη δημόσια υγεία. Έτσι υπάρχει η ανάγκη για θέσπιση ορίων σχετικά με τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και στο πόσιμο νερό.

Τη σοδειά και τα φυτά: Η ακατάλληλη χρήση φυτοφαρμάκων μπορεί να προκαλέσει φυτοτοξικότητα στη σοδειά και να έχει δυσμενείς επιπτώσεις στο έδαφος των καλλιεργούμενων εκτάσεων, με αποτέλεσμα η σοδειά να είναι χαμηλής ποιότητας.

Το περιβάλλον: Οι αρνητικές επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων σε έντομα που δε βλάπτουν τη σοδειά, στην άγρια ζωή, σε οργανισμούς του εδάφους και των νερών είναι ευρέως γνωστές. Η ρύπανση του εδάφους, του αέρα, των επιφανειακών και υπόγειων νερών πρέπει να αποφεύγεται κατά το δυνατόν.

Τους αγοραστές: Οι αγοραστές πρέπει να προστατεύονται από την κυκλοφορία στην αγορά χαμηλής ποιότητας προϊόντων καθώς και από προϊόντα που φέρουν λάθος σήμανση.

Τους παρασκευαστές: Οι παρασκευαστές πρέπει να γνωρίζουν τις απαιτήσεις καταλληλότητας των προϊόντων που παρασκευάζουν.

Το διεθνές δίκτυο δράσης ενάντια στη χρήση φυτοφαρμάκων PAN (Pesticide Action Network) οργανώνει συνέδρια και εκστρατείες σε όλο τον κόσμο, ενώ έχει θεσπίσει την 3η Δεκεμβρίου σαν ημέρα μη χρήσης φυτοφαρμάκων. Είναι η μαύρη επέτειος του ατυχήματος που συνέβη στο Μποπάλ της Ινδίας το 1984, όταν εξ αιτίας διαρροής τοξικών αερίων σε εργοστάσιο φυτοφαρμάκων σκοτώθηκαν 3.800 άνθρωποι και άλλοι 2.720 καταδικάστηκαν σε μόνιμες αναπηρίες [15].

4.1 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση πραγματοποιείται συνεχής ανανέωση του νομοθετικού πλαισίου που σχετίζεται με τα φυτοφάρμακα. Μέχρι το 1990 η νομοθεσία για τα φυτοφάρμακα θεσπιζόταν μόνο σε εθνικό επίπεδο. Από το 1991 η νομοθεσία όλων των χωρών της Ευρωπαϊκής Ένωσης εναρμονίζεται σε ένα κοινό πλαίσιο (van der Hoff and van Zoonen, 1999) [1].

4.2. Αειφόρος χρήση των φυτοφαρμάκων

Η θεματική στρατηγική σχετικά με την αειφόρο χρήση των φυτοφαρμάκων αποσκοπεί στον περιορισμό των επιπτώσεων των φυτοφαρμάκων στην υγεία του ανθρώπου και στο περιβάλλον και, γενικότερα, σε μία πιο βιώσιμη χρήση των φυτοφαρμάκων εξασφαλίζοντας, εκ παραλλήλου, την αναγκαία προστασία των καλλιεργειών [1].

5. Πυρεθροειδή

5.1. Εισαγωγή

Τα πυρεθροειδή ανήκουν στα εντομοκτόνα φυτικής προέλευσης. Υπολογίζεται ότι περισσότερα από 2000 φυτικά είδη εμφανίζουν εντομοκτόνες ιδιότητες λόγω των τοξικών ουσιών που περιέχουν. Τα είδη αυτά ανήκουν σε 170 διαφορετικές κατηγορίες από τις οποίες μόνο 6 χρησιμοποιήθηκαν ή χρησιμοποιούνται για την παρασκευή εντομοκτόνων. Τα σκευάσματα αυτά παρά το ότι έχει περιοριστεί η χρήση τους λόγω της μεγάλης διάδοσης των συνθετικών εντομοκτόνων, εξακολουθούν να θεωρούνται ως ιδιαίτερα χρήσιμα λόγω της μικρής τοξικότητας τους στα θερμόαιμα και της έλλειψης υπολειμμάτων στα τρόφιμα και στο περιβάλλον γενικότερα [26].

Πινάκας 1: Κατηγορίες φυτών και παραγόμενα προϊόντα [26]

Οικογένεια φυτών	Παραγόμενα προϊόντα
Solanaceae	Νικοτίνη – νορνικοτίνη
Compositae	Πυρεθρίνες
Leguminosae	Ροτενόνη
Liliaceae	Βερατρίνη
Chenopodiaceae	Αναβασίνη, νεονικοτίνη
Simarubaceae	Quassia

5.2. Ιστορική ανάδρομη και προέλευση

Η χρησιμοποίηση του πύρεθρου ως εντομοκτόνο ήταν γνωστή στους Νομάδες του Καυκάσου από το 1800. Η πρώτη βιομηχανική παραγωγή του στην Ευρώπη άρχισε από το 1828. Παραγεται από το φυτό *Chrysanthemum-Pyrethrum*, της οικογένειας των *Compositae* [26].

Ευρίσκεται κυρίως στις τελείως ανοικτές ταξιανθίες και μάλιστα στα αχαινία και πολύ λιγότερο στους βλαστούς των φυτών. Το περισσότερο χρησιμοποιούμενο είδος για την παραγωγή πυρέθρου είναι το *Chrysanthemum-cinerariaefolium* και δευτερευόντως το *C. coccineum*. Η τοξική ενέργεια των εκχυλισμάτων ανθέων πυρέθρου οφείλετε στις περιεχόμενες πυρεθρίνες [26].

Τα πυρεθροειδή δ-μεθρινη και λ-κυαλοθρινη επιτρέπεται από τον Κανονισμό της (ΕΟΚ)2092/91 να χρησιμοποιούνται μόνο σε παγίδες με προσδιορισμένους ελκυστικούς παράγοντες για την καταπολέμηση του δάκου της ελιάς και της μύγας της μεσογείου [1].

5.3. Βασικές κατηγορίες πυρεθροειδών

Υπάρχουν δυο μεγάλες κατηγορίες πυρεθροειδών [25,26] :

1. Τα Φυσικά πυρεθροειδή – πυρεθρίνες
2. Τα συνθετικά πυρεθροειδή

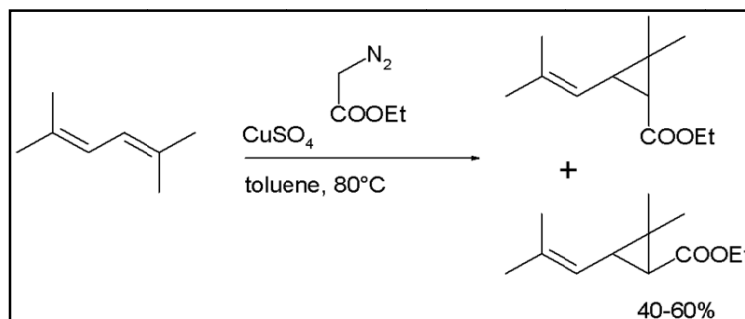
5.3.1.Φυσικά Πυρεθροειδή –Πυρεθρίνες

Πρόκειται για εντομοτοξικά συστατικά του πυρέθρου . Από τις αρχές του περασμένου αιώνα ήταν γνωστό ότι τα ξερά άνθη ορισμένων Compositae του γένους *Chrysanthemum* είχαν εντομοκτόνες ιδιότητες .Το κυριότερο από τα είδη του γένους αυτού το *Chrysanthemum-cinerariaefolium* χρησιμοποιείται πάνω από 100 χρόνια για την παραγωγή πυρέθρου. Οι ξερές ανθοταξίες του περιέχουν 0.7-3% και κατά μέσο ορό 1.2% πυρεθρίνες , που είναι μίγμα 4 ή 6 εντομοκτόνων ουσιών . Παλαιότερα κυκλοφορούσαν στο εμπόριο αλεσμένα ξερά άνθη του φυτού , γνωστά ως σκόνη πυρέθρου ή δαλματική εντομοκτόνος σκόνη. Σήμερα κυκλοφορεί στο χονδρεμπόριο ως τεχνικώς καθαρό προϊόν , πυκνό εκχύλισμα των ανθέων του πυρέθρου σε κατάλληλο οργανικό διαλυτή που περιέχει συνήθως 25% πυρεθρίνες [25,26].



Σχήμα 8: Διαφορετικά είδη από χρυσάνθεμα

Οι πυρεθρίνες ή φυσικά πυρεθροειδή είναι εστέρες των αλκοολών πυρεθρολόνης και κινερολόνης , με τα οξέα χρυσανθεμικό και πυρεθρικό. Είναι ουσίες νευροτοξικές με μεγάλη εντομοτοξικότητα , μικρή τοξικότητα για τα θερμόαιμα και μεγάλη χημική αστάθεια στον αέρα και στο φως . Μέσα στον οργανισμό αποικοδομούνται κυρίως οξειδωτικά , προς μη τοξικές ουσίες .Οι ιδιότητες τους αυτές κάνουν τις πυρεθρίνες κατάλληλες για χρήσεις όπου αλλά μεγαλύτερης διάρκειας εντομοκτόνα δεν είναι κατάλληλα και όπου επιθυμούμε γρήγορη κατάρριψη εντόμων [25,26].



Σχημα 9 : Chrysanthemic Acid Synthesis

5.3.2. Συνθετικά Πυρεθροειδή

Η δράση τους είναι επίσης νευροτοξική. Τα συνθετικά πυρεθροειδή σε αντίθεση με τους πλείστους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες αποικοδομούνται μέσα στο σώμα των ζώων προς μη τοξικά προϊόντα. Ακόμη και στο έδαφος αποικοδομούνται μέσα σε λίγες εβδομάδες από μικροοργανισμούς και πιστεύεται ότι η τυχόν δυσμενής επίδραση τους στην εδαφική μικροχλωρίδα δεν είναι αξιόλογη [25,26].

Διακρίνονται σε ασταθή και σε σταθερά συνθετικά πυρεθροειδή .

Τα ασταθή συνθετικά πυρεθροειδή (allethrin , bioallethrin , bioresmethrin , cismethrin , kadethrin , phenothrin , prothrin , resmethrin , tetramethrin) μοιάζουν πολύ με τις φυσικές πυρεθρίνες ως προς τις ιδιότητες τους και χρησιμοποιούνται σε κατοικημένους ή κλειστούς χώρους [13,25,26] .

Τα σταθερά συνθετικά πυρεθροειδή (cypermethrin ,decamethrin , fenvalerate , permethrin) έχουν σαφώς μεγαλύτερη χημική σταθερότητα και υπολειμματική διάρκεια από τα ασταθή και τις φυσικές πυρεθρίνες . Δεν αποικοδομούνται γρήγορα φωτοχημικά και έχουν μέτρια ως μεγάλη διάρκεια σε αδρανείς επιφάνειες και όξινο περιβάλλον , ώστε είναι αποτελεσματικά και σε εφαρμογές υπαίθρου [13,25,26] .

Χαρακτηρίζονται από ευρύ φάσμα εντομοτοξικότητας , μέτρια ως μεγάλη υπολειμματική διάρκεια , μικρή πτητικότητα και μεγάλη λιποδιαλυτότητα. Δεν είναι αθροιστικά και με τοξική επίδραση για τα θερμόαιμα , μικρότερη σε σχέση με τους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες .Είναι ακατάλληλα ως εντομοκτόνα εδάφους λόγω της αστάθειας τους . Τα πυρεθροειδή γενικά είναι τοξικά για τους υδάτινους αποδέκτες και τα ψάρια [12] .

5.4.Πυρεθροειδη που χρησιμοποιήθηκαν στην μέθοδο

5.4.1.Cypermethrin($C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$)

Χημική φύση

Φυτοπροστατευτικό προϊόν, εντομοκτόνο, συμπυκνωμένο εναιώρημα

Πυρεθρινοειδές εντομοκτόνο επαφής και στομάχου, για την καταπολέμηση ιπτάμενων και ερπόντων εντόμων καθώς και προνυμφικών σταδίων, σε κατοικημένους χώρους. Είναι πυκνό εναιώρημα με 6 % β/ο δραστική ουσία (cypermethrin) και 93.68 % β/β βοηθητικές ουσίες [6,7,13,25].

Σταθερότητα στην αποθήκευση:

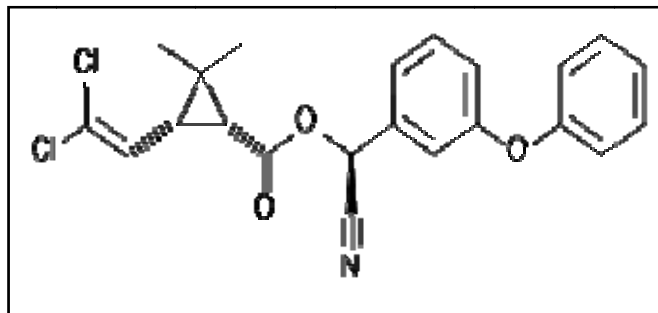
Διατηρούμενο στους $0\pm 1^{\circ}C$ επί 7 ημέρες, δεν παρατηρείται αλλοίωση. Διατηρούμενο στους $54\pm 2^{\circ}C$ επί 14 ημέρες δεν παρατηρείται αλλοίωση. Συνίσταται να αποθηκεύεται στην αρχική του κλειστή συσκευασία σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας μακριά από άμεσο ηλιακό φως. Στις συνθήκες αυτές το σκεύασμα παραμένει σταθερό για δύο (2) χρόνια.

Σταθερότητα:

- στον αέρα: Σταθερό σε κλειστή ή ανοιγόμενη για 1-2 ημέρες και κλειόμενη μετά συσκευασία για 2 χρόνια.
- στο φως: Σταθερό σε κλειστή συσκευασία για τουλάχιστον 2 χρόνια.
- στο νερό: Σταθερό.
- σε διάφορα pH: Σταθερό σε τιμές pH 3-7.
- σε διάφορες θερμοκρασίες: Σταθερό σε κανονικές θερμοκρασίες για 2 χρόνια.

Φυσικές και Χημικές ιδιότητες δρώντος:

1. Το cypermethrin έχει μοριακό βάρος 416.3, άχρωμο και με οσμή ελαφρά αρωματική.
2. Το σημείο τήξεώς του είναι $78-81^{\circ}C$.
3. Η διαλυτότητά του σε νερό είναι 0.001 mg/l.
4. Η διαλυτότητά του σε acetone είναι 620, σε dichloromethane 550, σε cyclohexanone 515, σε ethyl acetate 440, σε chlorobenzane 420, σε o-xylene 350, σε hexane 7, σε maize oil 19-20 (όλες οι τιμές αναφέρονται σε g/l). Είναι σταθερό στον αέρα και το φως.
5. Είναι θερμικά σταθερό μέχρι τους $220^{\circ}C$.
6. Υδρολύεται σε ισχυρά αλκαλικά μέσα. Πολύ σταθερό σε ουδέτερα και όξινα μέσα. Αποικοδομείται στο έδαφος.
7. Η τάση ατμών του είναι 23 μPa ($20^{\circ}C$).
8. Ο συντελεστής κατανομής του σε οκτανόλη/νερό είναι $K_{ow} = 8700000$ σε pH 7.
9. Συνίσταται να αποθηκεύεται σε αεριζόμενους χώρους, μακριά από θερμότητα, φωτιά, υγρασία, όξινα, αλκαλικά ή οξειδωτικά μέσα και μακριά από τρόφιμα.



Σχήμα 10 : Μοριακή δομή του cypermethrin

Προσδιορισμός των κινδύνων

Πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον. Πιθανή πρόκληση παραισθησίας.

5.4.2. Fenvalerate ($C_{25}H_{22}ClNO_3$)

Χημική φύση

Φυτοπροστατευτικό προϊόν, μίγμα 4 ισομερών που το καθένα έχει διαφορετικές εντομοκτόνες δραστηριότητες, κίτρινο μεγάλου ιξώδους υγρό.

Εντομοκτόνο πυρεθρινοειδές με δράση επαφής και στομάχου, για την καταπολέμηση ιπτάμενων και ερπόντων εντόμων, για οικιακή και βιομηχανική χρήση από επαγγελματίες χρήστες, άμεσης και υπολειμματικής δράσης. Η διαμόρφωση 2- S άλφα (ή SS) είναι το πιο ενεργό εντομοκτόνο ισομερές. Το Fenvalerate αποτελείται περίπου 23% αυτού του ισομερούς [6,7,13,25].

Σταθερότητα στην αποθήκευση:

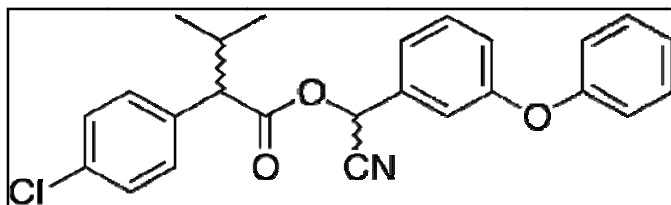
Διατηρούμενο στους $0\pm 1^\circ\text{C}$ επί 7 ημέρες, το σκεύασμα παραμένει σταθερό. Διατηρούμενο στους $54\pm 2^\circ\text{C}$ επί 14 ημέρες το σκεύασμα διατηρεί τις ιδιότητές του. Συνίσταται να αποθηκεύεται στην αρχική του κλειστή συσκευασία σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας μακριά από άμεσο ηλιακό φως. Στις συνθήκες αυτές το σκεύασμα παραμένει σταθερό για δύο (2) χρόνια.

Σταθερότητα:

- στον αέρα: Σταθερό σε κλειστή ή ανοιγόμενη για 1-2 ημέρες και κλειόμενη μετά συσκευασία για 2 χρόνια.
- στο φως: Σταθερό σε ηλιακό φως και u.v. ακτινοβολία.
- στο νερό: Σταθερό στο ψεκαστικό διάλυμα.
- σε διάφορα pH: Σταθερό σε τιμές pH 4-7. Ασταθές σε αλκαλικά διαλύματα.
- σε διάφορες θερμοκρασίες: Σταθερό σε κανονικές θερμοκρασίες για 2 χρόνια.

Φυσικές και Χημικές ιδιότητες δρώντος:

1. Η Fenvalerate έχει μοριακό βάρος 419.9 g/mole , άχρωμη και με αδύναμη χαρακτηριστική οσμή.
2. Το σημείο τήξεώς του είναι 100-102°C.
3. Η διαλυτότητά του σε νερό είναι πολύ χαμηλή
4. Μεγάλη διαλυτότητά σε acetone και cyclohexane
5. Είναι εξαιρετικά σταθερό σε έκθεση στον αέρα, στο ηλιακό φως και σε u.v. ακτινοβολία. Η τάση ατμών του είναι 1.24×10^{-5} mPa.
6. Ο συντελεστής κατανομής του σε οκτανόλη/νερό είναι 5.43.
7. Είναι σταθερό για 2 χρόνια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Σχήμα 11 : Μοριακή δομή του Fenvalerate

Προσδιορισμός των κινδύνων

Πολύ τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον.

5.4.3. Deltamethrin (C₂₂H₁₉Br₂NO₃)Χημική φύση

Φυτοπροστατευτικό προϊόν, εντομοκτόνο, υπόλευκη σκόνη

Εντομοκτόνο πυρεθρινοειδές με δράση επαφής και στομάχου, για την καταπολέμηση ιπτάμενων και ερπόντων εντόμων, για οικιακή και βιομηχανική χρήση από επαγγελματίες χρήστες, άμεσης και υπολειμματικής δράσης. Είναι βρέξιμη σκόνη (WP) με 2.5 % β/β δραστική ουσία (deltamethrin) και 97.45 % β/β βοηθητικές ουσίες [6,7,13,25].

Σταθερότητα στην αποθήκευση:

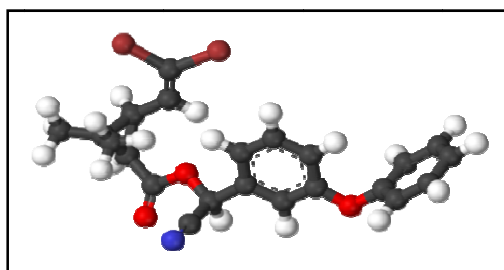
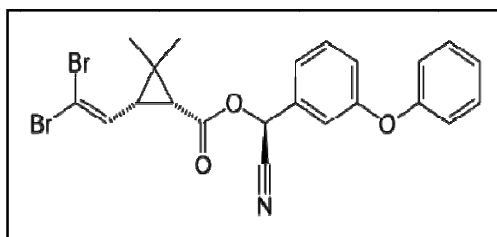
Διατηρούμενο στους 0±1°C επί 7 ημέρες, το σκεύασμα παραμένει σταθερό. Διατηρούμενο στους 54±2°C επί 14 ημέρες το σκεύασμα διατηρεί τις ιδιότητές του. Συνίσταται να αποθηκεύεται στην αρχική του κλειστή συσκευασία σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας μακριά από άμεσο ηλιακό φως. Στις συνθήκες αυτές το σκεύασμα παραμένει σταθερό για δύο (2) χρόνια.

Σταθερότητα:

- στον αέρα: Σταθερό σε κλειστή ή ανοιγόμενη για 1-2 ημέρες και κλειόμενη μετά συσκευασία για 2 χρόνια.
- στο φως: Σταθερό σε ηλιακό φως και u.v. ακτινοβολία.
- στο νερό: Σταθερό στο ψεκαστικό διάλυμα.
- σε διάφορα pH: Σταθερό σε τιμές pH 4-7. Ασταθές σε αλκαλικά διαλύματα.
- σε διάφορες θερμοκρασίες: Σταθερό σε κανονικές θερμοκρασίες για 2 χρόνια.

Φυσικές και Χημικές ιδιότητες δρώντος:

1. Η deltamethrin έχει μοριακό βάρος 505.2, άχρωμη και με αδύναμη χαρακτηριστική οσμή.
2. Το σημείο τήξεώς της είναι 100-102°C.
3. Η διαλυτότητά της σε νερό είναι 0.002 mg/l (20°C).
4. Η διαλυτότητά της σε acetone είναι 500 gr/lit, σε ethanol 15 gr/lit, σε cyclohexane 750 gr/lit, σε dioxane 900 gr/lit, σε xylene 250 gr/lit
5. Είναι εξαιρετικά σταθερό σε έκθεση στον αέρα, στο ηλιακό φως και σε u.v. ακτινοβολία. Είναι ακόμη, περισσότερο σταθερό σε όξινα παρά σε αλκαλικά μέσα.
6. Η τάση ατμών του είναι 1.24×10^{-5} mPa.
7. Ο συντελεστής κατανομής του σε οκτανόλη/νερό είναι 5.43.
8. Είναι σταθερό για 2 χρόνια σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Σχήμα 12 : Μοριακή δομή του Deltamethrin

Προσδιορισμός των κινδύνων

Είναι τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς. Μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον.

5.4.4. λ-Cyhalothrin($C_{23}H_{19}ClF_3NO_3$)Χημική φύση

Φυτοπροστατευτικό προϊόν, εντομοκτόνο, Ακαρεοκτόνο, υπόλευκη σκόνη

Εντομοκτόνο, Ακαρεοκτόνο πυρεθρινοειδές με δράση επαφής και στομάχου, για την καταπολέμηση ιπτάμενων και ερπόντων εντόμων, για οικιακή και βιομηχανική χρήση από επαγγελματίες χρήστες, άμεσης και υπολειμματικής δράσης [6,7,13,25].

Σταθερότητα στην αποθήκευση:

Διατηρούμενο στους $0\pm 1^{\circ}C$ επί 7 ημέρες, το σκεύασμα παραμένει σταθερό. Διατηρούμενο στους $54\pm 2^{\circ}C$ επί 14 ημέρες το σκεύασμα διατηρεί τις ιδιότητές του. Συνίσταται να αποθηκεύεται στην αρχική του κλειστή συσκευασία σε κανονικές συνθήκες θερμοκρασίας μακριά από άμεσο ηλιακό φως. Στις συνθήκες αυτές το σκεύασμα παραμένει σταθερό για δύο (2) χρόνια.

Σταθερότητα:

- στον αέρα: Σταθερό σε κλειστή ή ανοιγόμενη για 1-2 ημέρες και κλειόμενη μετά συσκευασία για 2 χρόνια.
- στο φως: Σταθερό σε ηλιακό φως και u.v. ακτινοβολία.
- στο νερό: Σταθερό στο ψεκαστικό διάλυμα.
- σε διάφορα pH: Σταθερό σε τιμές pH 4-7. Ασταθές σε αλκαλικά διαλύματα.
- σε διάφορες θερμοκρασίες: Σταθερό σε κανονικές θερμοκρασίες για 2 χρόνια

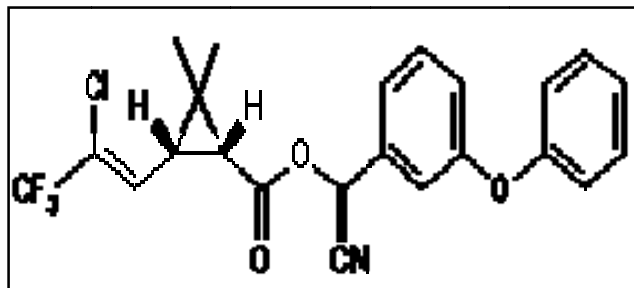
Φυσικές και Χημικές ιδιότητες δρώντος:

1. Μορφή : αιώρημα μικροκαψουλών
2. Χρώμα : υπόλευκο
3. Οσμή : ήπια φαινολική
4. Σημείο ανάφλεξης : δεν αναφλέγεται
5. Εκρηκτικές ιδιότητες : μη εκρηκτικό
6. Πυκνότητα : 1,02-1,04 g/ml στους $20^{\circ}C$
7. Η διαλυτότητά της σε νερό είναι 0.002 mg/l ($20^{\circ}C$).
8. Τιμή pH: 5-6

9. Ιξώδες : 10-20 mPas

10. Η τάση ατμών του είναι 1.24×10^{-5} mPa.

11. Οξειδωτικές ιδιότητες : μη οξειδωτικό



Σχήμα 13 : Μοριακή δομή του λ-Cyhalothrin

Προσδιορισμός των κινδύνων

Μπορεί να προκαλέσει ευαισθητοποίηση σε επαφή με το δέρμα. Μπορεί να προκαλέσει κνησμό/μούδιασμα σε εκτεθειμένες περιοχές (παραίτησις). Τοξικό για τους υδρόβιους οργανισμούς, μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες δυσμενείς επιπτώσεις στο υδάτινο περιβάλλον.

5.5. Ισομερή

Στη χημεία, ισομερή (Isomer) είναι ενώσεις με τον ίδιο μοριακό αλλά με διαφορετικό δομικό (ενδομοριακή δομή) τύπο. Τα ισομερή δεν μοιράζονται απαραίτητως παρόμοιες ιδιότητες εκτός και αν έχουν ίδιες λειτουργικές ομάδες. Η «διαφορετικότητα» αποδίδεται στο μόριο καθαυτό, έτσι κάθε ισομερές θεωρείται ότι αντιστοιχεί σε διαφορετική ουσία. Καθόσον τα μόρια παραμένουν αμετάβλητα, η διάκριση μεταξύ δυο ισομερών είναι βάσιμη και αντιπαρέρχεται διεργασίες όπως η τήξη, η διάλυση και η εξάτμιση [28]. Υπάρχουν πολλές διαφορετικές κατηγορίες ισομερών, όπως στερεο-ισομερή (stereoisomers), γεωμετρικά (geometrical) ισομερή, κ.λπ.

5.6. Επιτρεπόμενα όρια

Όλα τα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη ή ζωική κατανάλωση στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) υπόκεινται εφεξής σε ανώτατο όριο υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (MLR) στη σύστασή τους, ώστε να προστατεύεται η υγεία των ανθρώπων και των ζώων [1].

Ο Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 23ης Φεβρουαρίου 2005, ορίζει τις ανώτατες εγκεκριμένες ποσότητες υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων που επιτρέπεται να ευρίσκονται στα προϊόντα ζωικής ή φυτικής προέλευσης που προορίζονται για ανθρώπινη ή ζωική κατανάλωση. Αυτά τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MLR) περιλαμβάνουν, αφενός, ειδικά MLR για ορισμένα τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη ή ζωική κατανάλωση και, αφετέρου, ένα γενικό όριο που εφαρμόζεται εφόσον δεν έχει καθοριστεί κανένα ειδικό MLR. Ο στόχος είναι να εξασφαλιστεί ότι τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων που υπάρχουν σε τρόφιμα δεν συνιστούν απαράδεκτο κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών και των ζώων [1].

Όριο εξ ορισμού: Η ανώτατη περιεκτικότητα σε υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα ανέρχεται σε **10 µg/kg**. Αυτό το γενικό όριο ισχύει «εξ ορισμού», δηλ. για όλες τις περιπτώσεις για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί MLR κατά συγκεκριμένο τρόπο για ένα προϊόν ή για ένα είδος προϊόντος [1].

Πρόσφατα η Ευρωπαϊκή Ένωση και ο Διεθνής Οργανισμός τροφίμων (FAO) ορίσανε (Πίνακας 2) μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στις ελιές και το ελαιόλαδο, όχι όμως για όλες τις ενώσεις [1,17,21,42].

Πίνακας 2 : Μέγιστα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο ελαιόλαδο [42]

Πυρεθροειδή ενώσεις	MRL(µg/kg = ppb)
λ-cyhalothrin	20
Cypermethrin	50
Fenvalerate	20
Deltamethrin	100

6. Σύγχρονες μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων και ανάλυσης

6.1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη μεθόδων ανάλυσης μεγάλης ταχύτητας, ακρίβειας, πιστότητας και ευαισθησίας αποτελεί ένα σημαντικό ζήτημα. Η τεχνολογική πρόοδος προχωρά με γοργούς και απίστευτους ρυθμούς, εντούτοις τα περισσότερα όργανα που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση, δεν μπορούν να αντιμετωπίσουν την μήτρα των δειγμάτων απευθείας και έτσι ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της προετοιμασίας του δείγματος, είναι απαραίτητο [31].

Η ανάλυση ιχνοποσοτήτων οργανικών ουσιών, απαιτεί το επιπλέον αυτό στάδιο, κυρίως όσον αφορά εκχυλίσσεις με σκοπό την απομόνωση των συστατικών από τη μήτρα του δείγματος. Αποτέλεσμα είναι η συγκέντρωση των ουσιών-στόχων ενδυναμώνεται (εμπλουτισμός) και η παρουσία των συστατικών της μήτρας μειώνεται (καθαρισμός δείγματος) [31].

Η εκχύλιση υγρής φάσης (Liquid-Liquid Extraction, LLE) είναι μια τεχνική προετοιμασίας δείγματος με πολλές παραλλαγές, στην οποία αναφέρονται πολλές από τις πρότυπες αναλυτικές μεθόδους. Παρά την ευρύτατη χρήση της, θεωρείται χρονοβόρα διαδικασία, με επιτηδευμένη και με πολλά στάδια λειτουργία. Επίσης, προβλήματα σχηματισμού γαλακτωμάτων εμποδίζουν την αυτοματοποίησή της. Περισσότερο σημαντικό είναι βέβαια ότι γίνεται χρήση μεγάλων ποσοτήτων τοξικών οργανικών διαλυτών. Οι μεγάλες αυτές ποσότητες, όχι μόνο επηρεάζουν την ανάλυση όταν πρόκειται για μικροποσότητες αλλά θέτουν σε κίνδυνο την υγεία του εργαστηριακού προσωπικού. Ακόμα, η παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων εργαστηριακών αποβλήτων προσθέτει λειτουργικά έξοδα για την επεξεργασία τους [31].

Η μικροεκχύλιση στερεής φάσης SPME (Solid Phase Microextraction) προτάθηκε από τους Arthur και Pawliszyn, και κατά αυτήν μικρή ποσότητα από τον διαλύτη για την εκχύλιση, στηριζόμενη σε στερεή φάση (ίνα), εκτίθεται στο δείγμα. Στη συνέχεια και μετά από κατάλληλο χρονικό διάστημα, γίνεται η ανάλυση σε αέριο χρωματογράφο (GC) ή σε υγρό χρωματογράφο υψηλής πίεσης (HPLC) [31].

Οι έρευνες των τελευταίων ετών επομένως, οδηγούν στην «σμίκρυνση» της παραδοσιακής τεχνικής LLE, μειώνοντας δραστικά την αναλογία μεταξύ της φάσης του δέκτη και του δότη.

Δύο κύριες τεχνικές που προέκυψαν από την εξέλιξη της SPME είναι:

1. η SDME (Single Drop Microextraction) και
2. η LPME (Liquid Phase Microextraction).

Η SDME χρησιμοποιεί ως φάση δέκτη μια μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη μη αναμίξιμου με το νερό η οποία αιωρείται στο υδατικό διάλυμα του δότη [31].

Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LPME), μια πολύ υποσχόμενη τεχνική σε αυτό το πεδίο, στην οποία μια κοίλη ίνα που εμβαπτίζεται σε οργανικό διαλύτη χρησιμοποιείται για να προσαρμόσει ή να προστατεύσει τον όγκο της τάξης των μl του διαλύτη-δέκτη [31].

Συμπερασματικά μπορεί να αναφερθεί ότι οι τεχνικές μικροεκχύλισης είναι γρήγορες, αποτελεσματικές και με χαμηλό κόστος τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων εκμηδενίζοντας τη χρήση τοξικών διαλυτών.

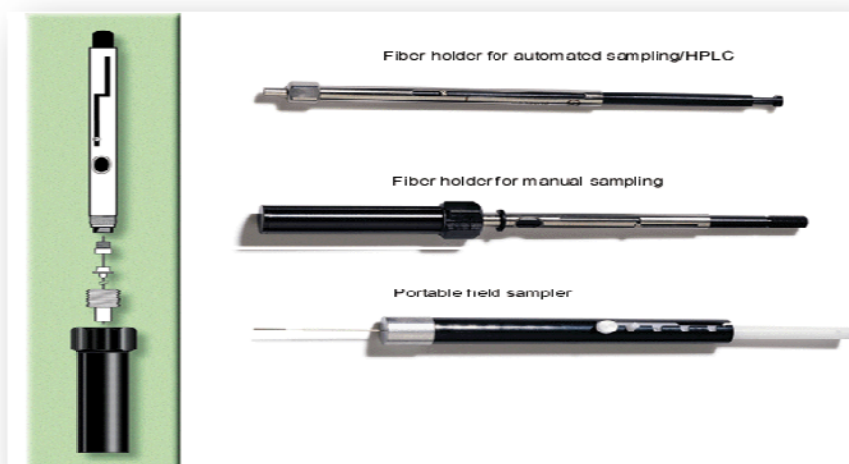
6.2. Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME)

Μία από τις νέες τεχνικές που χρησιμοποιούνται τα τελευταία χρόνια και έχουν ως αρχή τους τη χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυτών και διαλυμάτων είναι η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME). Η τεχνική αυτή μοιάζει με την εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction, SPE). Διαφέρει με την SPE στο ότι το προσροφητικό υλικό βρίσκεται στην επιφάνεια ίνας και όχι πακεταρισμένο σε στήλη ή τοποθετημένο πάνω σε επίπεδο δίσκο. Επίσης, ενώ η SPE είναι μέθοδος εξαντλητικής εκχύλισης και χρησιμοποιείται σε υγρά δείγματα, η SPME βασίζεται στην επίτευξη ισορροπίας, δηλαδή δεν είναι εξαντλητική και ακόμα, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για αέρια και στερεά δείγματα [29,30].

Η νέα τεχνική αυτή εκχύλισης, όπως αναφέρεται και παραπάνω, βασίζεται στο διαχωρισμό του συστατικού στόχου, σε ακινητοποιημένη φάση εκχύλισης. Μετά την επίτευξη ισορροπίας ή με την πάροδο καλά καθορισμένου χρονικού διαστήματος οι ενώσεις που έχουν απορροφηθεί, εκκροφούνται θερμικά με την έκθεση της ίνας στην περιοχή που γίνεται η ένεση του δείγματος σε αέριο χρωματογράφο (GC) ή Υγρό Χρωματογράφο Υψηλής Απόδοσης ώστε να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν [29,30].

Η μετακίνηση των ενώσεων από το δείγμα στην ίνα ξεκινά μόλις αυτά έρχονται σε επαφή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η εκχύλιση θεωρείται ότι τελειώνει με την επίτευξη συγκέντρωσης ισορροπίας για την υπό ανάλυση ουσία μεταξύ του δείγματος και της επικάλυψης της ίνας.

Αυτό σημαίνει ότι όταν το σύστημα φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας η εκχυλιζόμενη ποσότητα είναι σταθερή, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και δεν αλλάζει πλέον με την πάροδο του χρόνου [29,30].

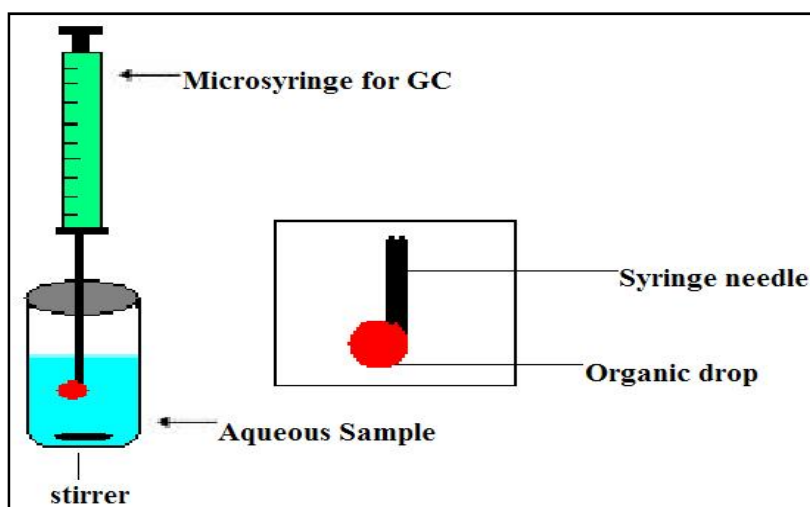


Σχήμα 14. Η εμπορικά διαθέσιμη συσκευή SPME.

Η SPME αριθμεί ως σήμερα μεγάλη ποσότητα αναφορών σε ευρύ φάσμα εφαρμογών, όπως περιβάλλον, ανάλυση τροφίμων, κλινικές έρευνες και εγκληματολογικές αναλύσεις. Παρόλα τα θετικά αποτελέσματα που έδωσε η τεχνική αυτή κατά τη δεκαετία εφαρμογής της, σημαντικά είναι και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει και θέτουν περιορισμούς στη χρήση της. τα πιο σπουδαία από αυτά είναι, η περιορισμένη διάρκεια ζωής των ινών που χρησιμοποιεί, η σχετικά εύθραυστη φύση των ινών αυτών και η πιθανότητα σφαλμάτων εκ μεταφοράς μεταξύ των αναλύσεων [30,31].

6.3. Μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (SDME)

Μια σημαντική μέθοδος που αναπτύχθηκε από την μικροεκχύλιση με διαλύτη είναι η μικροεκχύλιση μικροσταγόνας (SDME), όπου το ρόλο του δέκτη έχει μια μικροσταγόνα οργανικού διαλύτη, μη αναμίξιμου με το νερό, η οποία κρέμεται πάνω από υδατικό διάλυμα (δότης). Αυτό είναι το σύστημα δύο φάσεων. Όταν η μικροσταγόνα έρθει σε επαφή με το υδατικό δείγμα, οι οργανικές ενώσεις μεταφέρονται στην φάση του οργανικού και έτσι επιτυγχάνεται προσυγκέντρωση των ουσιών προς ανάλυση. Μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα, το οποίο έχει καθοριστεί κατά την διάρκεια της βελτιστοποίησης της μεθόδου, η μικρο-σταγόνα αποσύρεται μέσα στην μικροσύριγγα και μεταφέρεται στον θάλαμο εισαγωγής δειγμάτων ενός GC ή HPLC για ανάλυση [31].



Σχήμα 15. Σχηματική αναπαράσταση συστήματος μικροεκχύλισης σταγόνας

Η SDME, αν και είναι μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος εκχύλισης, παρουσιάζει και κάποια σημαντικά μειονεκτήματα όπως τα ακόλουθα : η εφαρμογή εκτεταμένων χρόνων δειγματοληψίας και μεγάλων ταχυτήτων ανάδευσης έχουν ως αποτέλεσμα πιθανή μετατόπιση και απώλεια της μικροσταγόνας [31].

6.4. Μικροεκχύλιση μεμβράνης

Μια άλλη εκδοχή της micro-LLE είναι η μικροεκχύλιση με μεμβράνη. Οι τεχνικές που αναπτύχθηκαν από αυτή την εκδοχή μπορούν να διακριθούν σε δύο κύριες κατηγορίες[31]:

1. Τεχνικές πορώδους μεμβράνης, που τα δύο διαλύματα (δότης και δέκτης) βρίσκονται και στις δύο πλευρές της μεμβράνης και είναι σε επαφή μέσω των πόρων της μεμβράνης και
2. Τεχνικές μη πορώδους μεμβράνης, όπου η μεμβράνη σχηματίζει μια ξεχωριστή φάση (πολυμερική ή υγρή) ανάμεσα στα διαλύματα δότη και δέκτη.

Μία από τις τεχνικές μη πορώδους μεμβράνης που προέκυψαν, καλείται, τεχνική υποστηριζόμενης υγρής μεμβράνης (supported liquid membrane, SLM) και στηρίζεται στην χρήση των πόρων πολυμερικής μεμβράνης ως στήριγμα στον οργανικό διαλύτη. Με αυτόν τον τρόπο δημιουργείται ένα σύστημα τριών φάσεων και το στρώμα του οργανικού διαλύτη βρίσκεται ανάμεσα στα διαλύματα δότη και δέκτη. Στην περίπτωση που μια από τις φάσεις (συνήθως ο δέκτης) είναι επίσης οργανικός διαλύτης, θεωρούμε ότι έχουμε σύστημα δύο φάσεων και η τεχνική είναι γνωστή ως υγρή-υγρή εκχύλιση με μεμβράνη μικροπόρων (microporous membrane liquid-liquid extraction, MMLLE). Η MMLLE μπορεί να συνδεθεί και on-line με αναλυτικά όργανα [31].

Η χρήση μεμβρανών παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως υψηλή εκλεκτικότητα, σχηματισμό καθαρού εκχυλίσματος και υψηλό βαθμό εμπλουτισμού [31].

Η ανάλυση ιχνοποσοτήτων διευκολύνεται περαιτέρω από την μείωση της κατανάλωσης διαλυτών. Οι μονάδες της πολυμερικής μεμβράνης μπορεί να είναι επίπεδες ή να έχουν την μορφή κοίλης ίνας και στις περισσότερες τεχνικές γίνεται άμεση σύνδεση των μεμβρανών εκχύλισης με όργανα ανάλυσης. Αν και είναι πολλά τα πλεονεκτήματα του αυτοματισμού, επειδή έχουν αναφερθεί προβλήματα μνήμης λόγω της απευθείας σύνδεσης με όργανα ανάλυσης, τελευταία έχουν αναπτυχθεί μερικές τεχνικές χωρίς να βρίσκονται σε on-line διάταξη. Μία από αυτές είναι η LPME, που αναπτύχθηκε από τους Rasmussen και Pedersen-Bjergaard [31].

6.5. Μικροεκχύλιση υγρής φάσης(LPME)

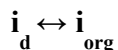
Ο όρος μικροεκχύλιση υγρής φάσης (liquid phase microextraction, LPME) εισήχθηκε αρχικά για να περιγράψει το διφασικό σύστημα στην μικροεκχύλιση διαλυτών. Στη συνέχεια επικράτησε να χρησιμοποιείται στις διατάξεις που ανέπτυξαν οι Rasmussen και Pedersen-Bjergaard [31].

Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης χρησιμοποιεί πορώδεις υδροφοβικές ίνες (hollow fibers) οι οποίες είναι εμποτισμένες με οργανική φάση για την δημιουργία των συστημάτων SLM και MMLLE. Η μέθοδος αυτή που προέκυψε θεωρήθηκε η εξέλιξη των μεθόδων μικροεκχύλισης με διαλύτη, καθώς προσθέτει ένα φιλμ προστασίας σε συστήματα μικροσταγόνας και ενισχύει την δημιουργία υγρών φιλμ που δεν αναμιγνύονται με το νερό. Αυτή η νέα μέθοδος μικροεκχύλισης αποδείχθηκε πολύ καλή εναλλακτική επιλογή, αφού εκτός του ότι είναι απλή, φθηνή, γρήγορη και χρησιμοποιεί μικρές ποσότητες διαλυτών, εμφανίζει αυξημένη ευαισθησία και επειδή η κοίλη ίνα απορρίπτεται μετά από κάθε χρήση περιόρισε στο ελάχιστο την πιθανότητα σφαλμάτων εκ μεταφοράς μεταξύ των αναλύσεων.

Υπάρχουν δύο διατάξεις με τις οποίες εφαρμόζεται η LPME, η διάταξη δύο φάσεων και αυτή των τριών φάσεων, όπως περιγράφονται παρακάτω [31]

Στην δύο φάσεων LPME, ο αναλύτης (συστατικό-στόχος) i , εκχυλίζεται από διάλυμα (δότης- ελαιόλαδο), μέσω διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με το διάλυμα(ελαιόλαδο) και ο οποίος είναι σταθεροποιημένος στους πόρους της κοίλης ίνας, σε ίδιο διαλύτη με τον σταθεροποιημένο που βρίσκεται στο εσωτερικό της κοίλης ίνας (δέκτης)[31].

Η διαδικασία της εκχύλισης φαίνεται παρακάτω:



αυτή η διαδικασία χαρακτηρίζεται από την σταθερά (ή θερμοδυναμικό συντελεστή) κατανομής $K_{org/d}$ που ορίζεται ως ο λόγος των συγκεντρώσεων του αναλύτη i στους δύο διαλύτες μετά από την αποκατάσταση της ισορροπίας και είναι σταθερός για καθορισμένες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας. Επομένως, εμφανές είναι ότι για να είναι πετυχημένη η εφαρμογή της LPME δύο φάσεων, απαιτούνται μεγάλες τιμές σταθερών $K_{org/d}$. [31].

Τέτοιες τιμές αντιστοιχούν σε μέτρια ή πολύ υδροφοβικές ενώσεις που έχουν όξινες ή βασικές ομάδες ή σε ουδέτερες ενώσεις με ισοδύναμη υδροφοβικότητα. Κάτι που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι η LPME δύο φάσεων δίνει εκχύλισμα σε οργανική φάση, συμβατό με αναλυτικές τεχνικές όπως η GC και η HPLC[31].

Στην LPME τριών φάσεων, ο αναλύτης i , εκχυλίζεται από το διάλυμα δότης(την ελαιώδη φάση) μέσω οργανικού διαλύματος που είναι σταθεροποιημένο μέσα στους πόρους κοίλης ίνας (οργανική φάση- μεθανόλη), σε άλλη οργανική φάση (διάλυμα δέκτης- ακετονιτρίλιο), στο εσωτερικό της ίνας. Στην περίπτωση αυτή, η οργανική φάση αποτελεί ένα φράγμα μεταξύ των δύο φάσεων, δότη και δέκτη, έτσι ώστε να μην υπάρχει ανάμιξή τους. Η LPME τριών φάσεων, για έναν αναλύτη i , μπορεί να παρασταθεί ως εξής [31]:



στην περίπτωση αυτή εμφανίζονται δύο σταθερές κατανομής, η $K_{MeOH/d}$ και η $K_{ACN/MeOH}$, που είναι αντίστοιχα οι σταθερές μεταξύ της οργανικής φάσης και του δότη και μεταξύ του δέκτη και της οργανικής φάσης. Η συνολική σταθερά κατανομής βρίσκεται από το γινόμενο των επιμέρους σταθερών, δηλαδή [31]:

$$K_{ACN/d} = K_{MeOH/d} \cdot K_{ACN/MeOH}$$

Η κατάλληλη ρύθμιση της σύνθεσης των φάσεων δέκτη και δότη, είναι πολύ σημαντική για να πετύχει η LPME τριών φάσεων [31].

7. Ανάλυση μεθόδου μικροεκχύλισης υγρής φάσης (HF-LPME)

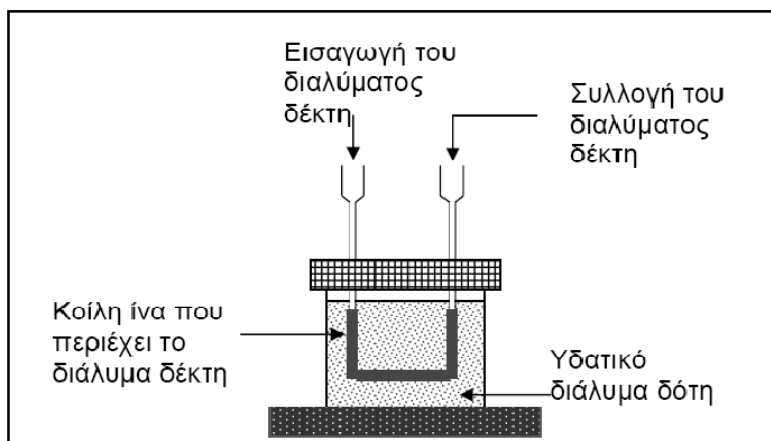
7.1. Εισαγωγή

Πρόσφατα η μικροεκχύλιση υγρής φάσης με τη χρήση κοίλης μεμβράνης (LPME) εφαρμόζεται σε αρκετές μελέτες ανάλυσης περιβαλλοντικών δειγμάτων. Η χρήσης μιας πορώδους κοίλης μεμβράνης, η οποία συνδέεται από τη μια άκρη με μια μικροσύριγγα, προσθέτει ένα προστατευτικό χαρακτηριστικό στην οργανική φάση και χρησιμεύει ως μια μεσεπιφάνεια μεταξύ των φάσεων του δότη και του δέκτη. Η δυνατότητα χρήσης μεγαλύτερων όγκων της φάσης του διαλύτη 'δέκτη', οδηγεί στην αύξηση της ευαισθησίας της τεχνικής. Επίσης, λόγω του μικρού κόστους της ανάλυσης ανά δείγμα, η μεμβράνη μπορεί να αντικαθίσταται συχνά και έτσι να περιορίζεται κατά πολύ η πιθανότητα συμπαράσυρσης των ουσιών μεταξύ των αναλύσεων [31].

Σήμερα, η μικροεκχύλιση υγρής φάσης με τη χρήση κοίλης μεμβράνης (LPME) αντιπροσωπεύει μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική ως προς άλλες τεχνικές μικροεκχύλισης, καθώς έχει το πλεονέκτημα ότι είναι απλή, φθηνή, με μεγάλη ευαισθησία, γρήγορη και πραγματοποιείται με χρήση ελάχιστων ποσοτήτων διαλύτη [31].

7.2. Ανάλυση διατάξεων της ίνας για την LPME

Υπάρχουν δύο διαφορετικές διατάξεις της ίνας για την πραγματοποίηση της LPME δύο και τριών φάσεων όπως φαίνεται και στα παρακάτω σχήματα [31].

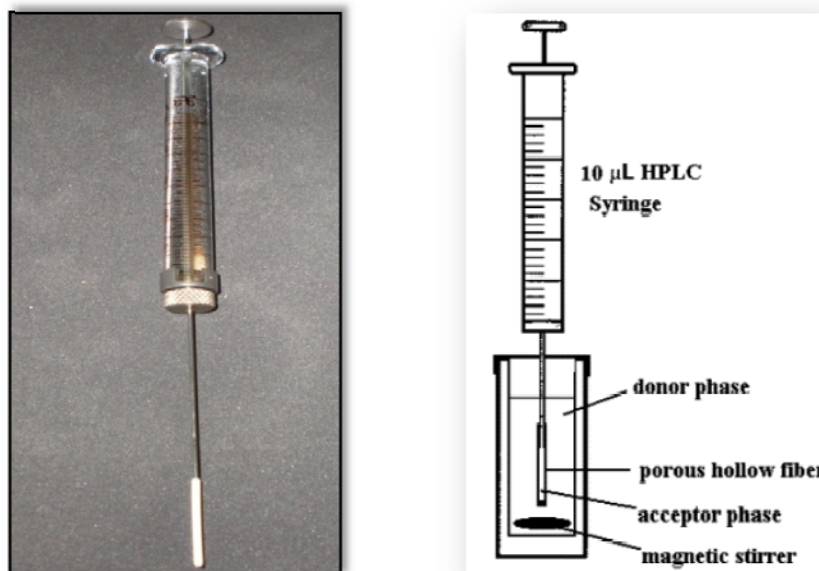


Σχήμα 16. Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης της ίνας [31]

Στην πρώτη διάταξη, δύο κοινές ιατρικές βελόνες σύριγγας περνούν μέσα από ένα ελαστικό διάφραγμα (septum) και τα δύο άκρα συνδέονται με ένα κομμάτι κοίλης ίνας. Το μήκος της ίνας ποικίλει από 4cm ως 8cm, για μεγαλύτερου μήκους ίνες (από 8cm μέχρι 27cm) χρησιμοποιείται στήριγμα γύρω από το οποίο τυλίγεται η ίνα [31].

Τόσο στην δύο φάσεων, όσο και στην τριών φάσεων LPME, η ίνα πρέπει να εμβαπτιστεί αρχικά για μερικά δευτερόλεπτα στον οργανικό διαλύτη, ώστε να σταθεροποιηθεί αυτός στους πόρους της ίνας. Στη συνέχεια η ίνα τοποθετείται μέσα στο διάλυμα δότη και ο διαλύτης δέκτης ωθείται στο εσωτερικό της ίνας με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας. Όταν ολοκληρωθεί η εκχύλιση το διάλυμα δέκτης συλλέγεται σε μικροφιαλίδια ή αποτραβιέται με τη σύριγγα και οδηγείται για ανάλυση στην αναλυτική συσκευή [31].

Στην δεύτερη διάταξη, μόνο η μία άκρη της ίνας χρησιμοποιείται για την ένεση και την συλλογή του διαλύτη δέκτη, ενώ η άλλη βρίσκεται ελεύθερη μέσα στο διάλυμα δότη. Η μικροσύριγγα σε αυτή την περίπτωση χρησιμοποιείται για την στήριξη της ίνας αλλά και για την εισαγωγή του διαλύματος δότη καθώς και την απομάκρυνσή του στη συνέχεια. Ένας άλλος τρόπος για την πραγματοποίηση της διάταξης αυτής είναι με τη χρήση δοχείου με ελαστικό πώμα ως υποστηρικτικό της ίνας. Σε αυτή την περίπτωση μεταλλικό σωληνοειδές εξάρτημα προσαρμόζεται στο κέντρο του ελαστικού διαφράγματος ώστε να βοηθήσει την εισαγωγή της ίνας σε αυτό [31].



Σχήμα 17. Διάταξη με μικροσύριγγα για την στήριξη της ίνας

Γενικά όταν χρησιμοποιείται η δεύτερη διάταξη, το ελεύθερο άκρο της ίνας μπορεί να σφραγιστεί με εφαρμογή φλόγας και πάντα πριν την είσοδό της στο διάλυμα δότη πρέπει να εμποτίζεται από το διάλυμα δέκτη.

7.3. Ανάλυση LPME ενεργού μεταφοράς

Η LPME στηρίζεται στη διάχυση των ενώσεων από το ένα διάλυμα στο άλλο, ανάλογα με τους συντελεστές κατανομής. Πάντως, πολλές ενώσεις έχουν τέτοια χημική φύση που δεν επιτρέπει μεγάλες τιμές στους συντελεστές κατανομής. Η εκχύλισή τους λοιπόν με αυτόν τον τρόπο είναι ελλιπής. Σε αυτές τις περιπτώσεις η εκχύλιση LPME με τη χρήση κοίλης ίνας, μπορεί να επιτευχθεί με διάταξη ενεργού μεταφοράς, στην οποία ένας μεταφορέας προστίθεται στο δείγμα. Ο μεταφορέας αυτός είναι μια σχετικά υδροφοβική ένωση, ιοντικού ζεύγους όμως, για να έχει ικανοποιητική διαλυτότητα στο νερό. Στο διάλυμα του δείγματος αυτές οι ενώσεις σχηματίζουν ιονικά ζεύγη με τις υπό εκχύλιση ενώσεις και ακολουθεί η εκχύλισή τους με αυτή τη μορφή, στην οργανική φάση στους πόρους της ίνας. Εκεί οι αναλύτες απελευθερώνονται προς το διάλυμα δέκτη. Τα αντισταθμιστικά ιόντα από το διάλυμα δέκτη στη συνέχεια, σχηματίζουν νέα ιοντικά ζεύγη με τον μεταφορέα ο οποίος επανεκχυλίζεται στο δείγμα [39].

7.4. Ανάλυση δυναμικής LPME

Στις παραπάνω περιπτώσεις αναφερθήκαμε σε στατικά συστήματα μικροεκχύλισης, όμως η LPME μπορεί να πραγματοποιηθεί και με δυναμικό σύστημα. Στην περίπτωση αυτή η διάταξη παραμένει ίδια και μπορεί να είναι δύο ή τριών φάσεων. Η διαφορά τους είναι ότι στην περίπτωση αυτή γίνεται επαναλαμβανόμενη εισαγωγή και εξαγωγή μικρών όγκων από το δείγμα στο εσωτερικό της κοίλης ίνας [39].

Κατά την είσοδο του δείγματος, σχηματίζεται λεπτό υμένιο οργανικού διαλύματος στην επιφάνεια του εσωτερικού της κοίλης ίνας, το οποίο εκχυλίζει έντονα τις ενώσεις από το δείγμα. Στη συνέχεια, η επαναφορά του οργανικού διαλύματος μέσα στην ίνα, έχει σαν αποτέλεσμα την ενσωμάτωση του υμενίου και των εκχυλισμένων ενώσεων στον κύριο όγκο του οργανικού διαλύματος [39].

Με τον ίδιο τρόπο η δυναμική LPME εφαρμόζεται και για την τριών φάσεων διάταξη, όπου εισάγεται πρώτα στην μικροσύριγγα ποσότητα διαλύματος (acceptor solution) και στη συνέχεια η οργανική φάση. Με πολλές επαναλήψεις της διαδικασίας αυτής, η εκχύλιση έχει γίνει τελικά πιο γρήγορα [39].

7.5. Ανάδευση του δείγματος

Καθόλη την διάρκεια της εκχύλισης η ανάδευση του δείγματος είναι απαραίτητη για την επιτάχυνση της κινητικής της. Έτσι όταν αυξήσουμε τον ρυθμό ανάδευσης στο διάλυμα τότε η εκχύλιση ενισχύεται καθώς η διάχυση των συστατικών μέσα στη διεπιφάνεια της κοίλης ίνας υποβοηθάτε και ακόμα, βελτιώνεται η επαναληψιμότητα της εκχύλισης. Στην LPME το διάλυμα του δέκτη προστατεύεται μέσα στην κοίλη ίνα και μπορούμε να εφαρμόσουμε πολύ υψηλές ταχύτητες ανάδευσης [31].

Τόσο στην LPME δύο φάσεων όσο και στην LPME τριών φάσεων, η χρήση μαγνητικού αναδευτήρα ή δόνησης αυξάνει σημαντικά την εκχύλιση. Η ανάδευση με δόνηση έχει το πλεονέκτημα να εξουδετερώνει την πιθανότητα της μόλυνσης του δείγματος που παρατηρείται όταν χρησιμοποιούνται μαγνητικοί αναδευτήρες. Όταν χρησιμοποιείται μαγνητικός αναδευτήρας για την ανάδευση του δείγματος, η χρήση της μέγιστης ταχύτητας ανάδευσης προκαλεί το σχηματισμό φυσαλίδων αέρα, οι οποίες έχουν την τάση να προσκολλώνται στην επιφάνεια της κοίλης ίνας. Αυτές οι φυσαλίδες αέρα επιταχύνουν την εξάτμιση του διαλύτη και συμβάλλουν στην εξαγωγή ανακριβών μετρήσεων [31].

7.6. Επιλογή της ίνας (hollow fiber)

Σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία της μεθόδου είναι η επιλογή της ίνας που θα χρησιμοποιηθεί. Συνήθως οι ίνες που χρησιμοποιούνται στην LPME πρέπει να είναι αρκετά υδρόφοβες όσο και συμβατές με τον οργανικό διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί. Στις πιο πολλές αναφορές που έχουν δημοσιευθεί αναφέρεται η χρήση τριχοειδών μεμβρανών από πολυπροπυλένιο (PP) [31].

Κάποια από τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι :

- η εσωτερική διάμετρος που είναι της τάξης των 600μm και είναι συμβατή με τα μl του όγκου του δέκτη που απαιτείται για την μικροεκχύλιση,
- το πάχος των τοιχωμάτων (200μm) το οποίο παρέχει μηχανική σταθερότητα και απλοποιεί την προετοιμασία για εκχύλιση.
- το ονομαστικό και το μέγιστο μέγεθος των πόρων (0.2μm και 0.64μm αντίστοιχα) των τριχοειδών μεμβρανών το οποίο εξασφαλίζει αποτελεσματικό μικροφιλτράρισμα, μια και επιτρέπει την διείσδυση μέσω των πόρων της ίνας μόνο των μικρών μορίων (συστατικών-στόχων).

7.7.Επιλογή του διαλύτη

Μια άλλη παράμετρος η οποία καθορίζει σε αρκετά μεγάλο βαθμό την επιτυχία των αποτελεσμάτων της μεθόδου και για τις δύο εκδοχές της LPME (δύο ή τριών φάσεων), είναι η επιλογή του καταλληλότερου διαλύτη. Επομένως πρέπει να δοκιμάζονται διάφοροι μη-υδατοδιαλυτοί διαλύτες, που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την πολικότητα και την διαλυτότητα τους στο νερό, και διάφορα μίγματα διαλυτών όπου είναι δυνατόν [31].

Για την τελική επιλογή του οργανικού διαλύτη πρέπει να ικανοποιούνται διάφορες απαιτήσεις όπως :

- θα πρέπει να έχει χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, ώστε να αποφεύγεται η διάλυση στην υδατική φάση και χαμηλή πτητικότητα, έτσι ώστε να περιορίζεται η εξάτμιση του κατά την διάρκεια της εκχύλισης.
- στην LPME δύο φάσεων, θα πρέπει να παρέχει υψηλή διαλυτότητα για τις προσδιοριζόμενες ουσίες, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη εκχύλιση.
- στις περιπτώσεις που η LPME δύο φάσεων συνδέεται με αέριο χρωματογράφο (GC), ο οργανικός διαλύτης πρέπει να έχει εξαιρετική χρωματογραφική συμπεριφορά.
- στην LPME τριών φάσεων ο διαλύτης που θα επιλέξουμε θα πρέπει να εξασφαλίζει υψηλές τιμές για τον συντελεστή $K_{org/d}$ και κυρίως για τον $K_{a/org}$.
- ο διαλύτης θα πρέπει να έχει τέτοια πολικότητα που να ταιριάζει με αυτήν της ίνας από πολυπροπυλένιο, ώστε να μπορεί εύκολα να ακινητοποιηθεί στους πόρους της. Μεγάλη σημασία έχει ο εμποτισμός της ίνας με διαλύτη, καθώς η εκχύλιση πραγματοποιείται στην επιφάνεια του ακινητοποιημένου διαλύτη.

7.8.Επίδραση της σχέσης των όγκων του διαλύματος δότη και δέκτη.

Η ευαισθησία της μεθόδου τόσο στη δύο όσο και στην τριών φάσεων LPME μπορεί να αυξηθεί μειώνοντας τον λόγο των όγκων δέκτη-δότη διαλύματος. Οι όγκοι των διαλυμάτων δότη και δέκτη που θα επιλεγθούν είναι πολύ μεγάλης σημασίας. Πάντως ο όγκος του διαλύματος δέκτη μπορεί να ρυθμιστεί ανάλογα με την αναλυτική τεχνική που ακολουθεί [31].

7.9. Ρύθμιση του pH.

Η ρύθμιση του pH μπορεί να αυξήσει την εκχύλιση καθώς η μετατόπιση της ισορροπίας σχετίζεται με την διαλυτότητα των όξινων/βασικών συστατικών-στόχων. Στην LPME δύο φάσεων αλλά και στην τριών φάσεων έχει αποδειχτεί ότι η αλλαγή του pH στο διάλυμα του δότη προκαλεί μεγαλύτερη προσυγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Όπως έχει αναφερθεί, στην LPME τριών φάσεων, ο καθορισμός της σύστασης των φάσεων του δότη και του δέκτη έχει πολύ μεγάλη σημασία, μιας και οδηγεί σε αυξημένους λόγους κατανομής και διασφαλίζει υψηλούς συντελεστές εμπλουτισμού και ανάκτησης για τις προσδιοριζόμενες ουσίες. Αυτό συνήθως γίνεται με την ρύθμιση του pH στο διάλυμα και στο διάλυμα του δότη. Για παράδειγμα όταν μελετούμε όξινες ενώσεις, το pH του διαλύματος του δότη ρυθμίζεται στην όξινη περιοχή τιμών, ώστε να αποφορτιστούν οι κύριες ενώσεις, να μειωθεί έτσι η διαλυτότητα τους μέσα στο δείγμα και να εξασφαλιστεί αποτελεσματική μεταφορά στην οργανική φάση. Στην συνέχεια, για να αποφευχθεί ο εγκλωβισμός των προσδιοριζόμενων ουσιών στην οργανική φάση και να διασφαλιστεί η επιτυχία της εκχύλισης, το pH του διαλύματος του δέκτη ρυθμίζεται στην βασική περιοχή. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τον ιονισμό των ουσιών-στόχων και εξασφαλίζει μεγάλη διαλυτότητα των ενώσεων στην φάση του δέκτη από ότι στην οργανική φάση [31].

7.10. Διάρκεια της εκχύλισης.

Γενικά ο παράγοντας χρόνος είναι πάντοτε μια πολύ σημαντική παράμετρος και αρκετά ευαίσθητη αφού από αυτό εξαρτώνται παρά πολλές παράμετροι όπως πχ η ακρίβεια των μετρήσεων, η επαναληψιμότητα κ.α. Έτσι και η μεταφορά της μάζας είναι μια διαδικασία που εξαρτάται από τον χρόνο και ο ρυθμός της μειώνεται όσο το σύστημα πλησιάζει τις συνθήκες ισορροπίας. Ανεξάρτητα αν η εκχύλιση είναι πλήρης ή χρησιμοποιείται ως τεχνική προσυγκέντρωσης, η ισορροπία επιτυγχάνεται ύστερα από έκθεση του διαλύματος του δέκτη στο δείγμα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Για την βελτιστοποίηση της μεθόδου είναι επομένως σημαντική η εύρεση των χρόνων εκχύλισης των ενώσεων-στόχων, έτσι ώστε να βρούμε τον χρόνο στον οποίο επιτυγχάνεται πρακτικά η ισορροπία. Αν και αυξημένοι χρόνοι έκθεσης του διαλύματος του δέκτη συμβάλλουν στην αύξηση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, δεν είναι πάντοτε πρακτική η εφαρμογή μεγάλων χρόνων εκχύλισης. Συνήθως επιλέγουμε χρόνους μικρότερους από τον χρόνο χρωματογραφίας, για να εξασφαλίσουμε υψηλό ρυθμό αναλύσεων [31].

7.11. Αξιολόγηση της τεχνικής

Πλεονεκτήματα της τεχνικής

- 1) Γρήγορη, απλή, ακριβής και με μεγάλη ευαισθησία.
- 2) Φθηνή, καθώς δεν χρησιμοποιείται εξειδικευμένη οργανολογία .
- 3) Υπάρχει μεγάλη ποικιλία όσον αφορά στους διαλύτες οι οποίοι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε κάθε περίπτωση ανάλογα με τον αναλύτη .
- 4) Σχεδόν όλοι από τους οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση των αναλυτών μπορούν στη συνέχεια να εισαχθούν στο όργανο GC για περαιτέρω ανάλυση, ενώ μόνο ένα μέρος του συμπυκνωμένου οργανικού διαλύτη μπορεί να αναλυθεί στο όργανο GC κατά την κλασσική εκχύλιση υγρής και την εκχύλιση στερεής φάσης .
- 5) Υπάρχει ελάχιστη έκθεση του χειριστή σε τοξικούς διαλύτες, γιατί χρησιμοποιούνται πολύ μικρές ποσότητες οργανικών διαλυτών κάθε φορά
- 6) Συνδυάζει την πραγματοποίηση της εκχύλισης, της συμπύκνωσης και την εισαγωγή του δείγματος σε ένα μόνο βήμα .
- 7) Επιτρέπει τη χρήση υψηλών ρυθμών ανάδευσης, καθώς η κοίλη μεμβράνη λειτουργεί ως ένα προστατευτικό κάλυμμα για την οργανική σταγόνα και αποτρέπει την διάλυση ή την διάσπασή της όπως κατά την μικροεκχύλιση μονής σταγόνας (SDME) .
- 8) Η δυνατότητα συχνής αντικατάστασης της κοίλης μεμβράνης ελαχιστοποιεί την πιθανότητα συμπαράσυρσης των ουσιών όπως κατά την μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) .
- 10) Φιλική προς το περιβάλλον .
- 11) Καλή επαναληψιμότητα .

Μειονεκτήματα της τεχνικής

- 1) Λόγω του μικρού όγκου οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιείται, τόσο στην δύο όσο και στην τριών φάσεων LPME, οι τεχνικές αυτές ουσιαστικά περιορίζονται σε μέτριους ή αρκετά υδροφοβικούς αναλύτες

7.12. Εφαρμογές της LPME

Η εφαρμογή της LPME στην ανάλυση περιβαλλοντικών δειγμάτων, στον προσδιορισμό ρύπων σε διάφορα δείγματα έχει ως αποτέλεσμα, υψηλό εμπλουτισμό των προσδιοριζόμενων ουσιών που βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις, όπως και μεγάλη εκλεκτικότητα λόγω της ικανότητας της ίνας να μην επιτρέπει την εκχύλιση μεγάλων μορίων και αιωρούμενης ύλης. Σε όλες τις δημοσιεύσεις στον τομέα του περιβάλλοντος γίνεται χρήση της διάταξης για την κοίλη ίνα. Η επιλογή ανάμεσα στη δύο ή τριών φάσεων LPME εξαρτάται από τη χημική φύση των ουσιών-στόχων. Σε όλες τις αναφορές, τα ανεπτυγμένα πρότυπα έδειξαν ότι είναι γρήγορα, ακριβή, ευαίσθητα και χαμηλού κόστους τεχνικές προετοιμασίας δείγματος που δίνουν μεγάλους συντελεστές εμπλουτισμού και επαρκή καθαρισμό δείγματος ακόμα και σε σύνθετες μήτρες δειγμάτων [31].

Ακόμη μεγάλος αριθμός εφαρμογών της LPME αφορά τον προσδιορισμό διάφορων ουσιών σε βιολογικά υγρά όπως στο αίμα, στο πλάσμα του αίματος, την ουρία και το σάλιο. Η μέθοδος της μικροεκχύλισης σε σύζευξη με αναλυτικά όργανα όπως GC, CE και HPLC, δίνει όρια ανίχνευσης της τάξης των $\mu\text{l/l}$, ακόμα και όταν γίνεται εκχύλιση μικρών όγκων βιολογικών δειγμάτων εξαιτίας του επαρκούς εμπλουτισμού στους αναλύτες. Οι μέθοδοι που βασίζονται στην τεχνική της LPME βρέθηκε ότι παρέχουν άριστη εκχύλιση των ουσιών στόχων, χωρίς να επιτρέπουν την είσοδο στη φάση του δέκτη μακρομορίων και άλλων συστατικών που θα μπορούσαν να παρεμποδίσουν την ανάλυση [31].

Οι εφαρμογές τις LPME αυξήθηκαν ραγδαία και προς την κατεύθυνση της ανάλυσης τροφίμων και ειδικά στην ανίχνευση ζιζανιοκτόνων στο βοδινό γάλα. Μπορούμε να πούμε ότι είναι μια πολύ υποσχόμενη μέθοδος, με αρκετά ακόμα μεγάλα περιθώρια για ανάπτυξη και εφαρμογή της [31].

8.Χρωματογραφική ανάλυση

8.1. Εισαγωγή

Η χρωματογραφική ανάλυση περιλαμβάνει μια σειρά μεθόδων διαχωρισμού μιγμάτων ανόργανων ή οργανικών ουσιών στα συστατικά τους, με διαδοχικές εκλεκτικές δεσμεύσεις και αποδεσμεύσεις αυτών από επιφάνεια στερεής ή στατικής υγρής φάσης με τη βοήθεια ρευστού κινούμενου κατά μία διεύθυνση (κινητή φάση). Η κινητή φάση καθώς διέρχεται από την στατική προκαλεί διαφορετική μετατόπιση των συστατικών του μίγματος [16,28,40] .

Οι διάφορες μέθοδοι διαφέρουν μεταξύ τους:

- ως προς τη φύση της κινητής φάσης (υγρό ή αέριο) ή της στατικής φάσης (στερεό ή υγρό πάνω σε στερεό υπόστρωμα),
- ως προς τον μηχανισμό διαχωρισμού (προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή) και
- ως προς την μορφή της στατικής φάσης (στήλη, λεπτή στιβάδα πάνω σε πλάκα ύαλου ή χάρτου).

Στην αέρια χρωματογραφία η κινούμενη φάση είναι αέρια και ανάλογα τη στατική φάση, διακρίνεται στην αέρια-στερεή (G.S.C.) και στην αέρια-υγρή (G.L.C.).Από τους δύο αυτούς τύπους χρωματογραφίας η G.S.C. χρησιμοποιείται σε αναλύσεις αέριων δειγμάτων σε στήλες προσρόφησης, ενώ υγρά και πτητικά στερεά διαχωρίζονται με την G.L.C. σε στήλες κατανομής [16,28,40].

Στη αέρια-υγρή χρωματογραφία (ή απλά αέρια χρωματογραφία), ο διαχωρισμός οφείλεται στην κίνηση των συστατικών μέσα από την στήλη με διαφορετικές ταχύτητες που εξαρτώνται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και από τις αλληλεπιδράσεις τους με την υγρή στατική φάση. Η παραπάνω τεχνική αναφέρεται ως χρωματογραφία έκλυσης [16,28,40].

8.2. Ταξινόμηση χρωματογραφικών τεχνικών

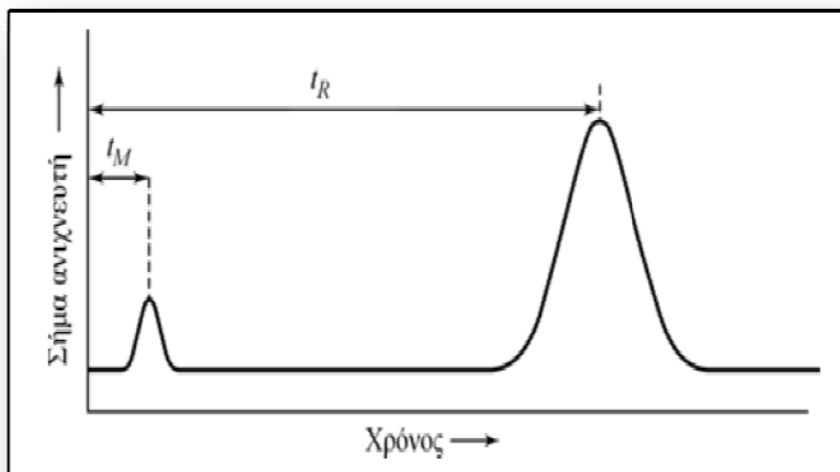
Η ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών γίνεται βάση[16,28,40]

1. τη φύση της κινητής και της στατικής φάσης
 - Υγρή χρωματογραφία
 - Αέρια χρωματογραφία
2. το μηχανισμό διαχωρισμού
 - προσρόφηση, κατανομή, ιονανταλλαγή,
 - μοριακός αποκλεισμός
3. τη φυσική μορφή της στατικής φάσης
 - χρωματογραφία στήλης
 - ή επίπεδη

4. τον τρόπο εισαγωγής και κινήσεως του δείγματος

- μετωπική
- εκτοπίσεως
- εκλούσεως

8.3. Χρωματογραφικοί παράμετροι



Σχήμα 18 : Γενική μορφή χρωματογραφήματος

- Χρόνος ανάσχεσης ή κατακράτησης (t_R): ο χρόνος που χρειάζεται από τη στιγμή εισαγωγής του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η κορυφή της ουσίας φτάνει στον ανιχνευτή[16,28,40].
- Νεκρός χρόνος (t_M): είναι ο απαιτούμενος χρόνος για την διέλευση αδρανούς αερίου από την στήλη, χωρίς να συγκρατείται από αυτή.
- Ανηγμένος χρόνος ανάσχεσης(t'_R):

$$t'_R = t_R - t_M$$

- Όγκος ανάσχεσης (retention volume): που είναι ο απαιτούμενος όγκος φέροντος αερίου για την έκλυση μιας ουσίας και δίνεται από την σχέση:

$$V_R = t_R \cdot F_C$$

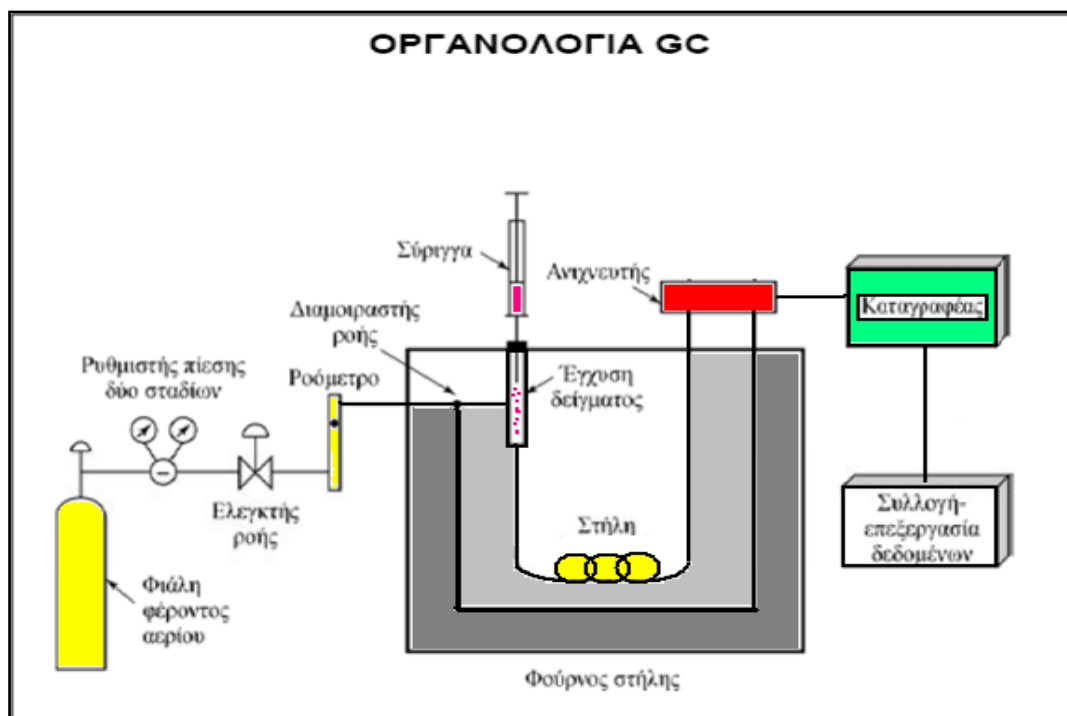
- Νεκρός όγκος (V_M): $V_M = t_M \cdot F$
- Ανηγμένος όγκος ανάσχεσης (V'_R): $V'_R = t'_R \cdot F$

F : η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (mL/min)

V_R : όγκος της κινητής φάσης που χρειάζεται να διέλθει από τη στατική φάση για να εκλουστεί μια ουσία

V_M : όγκος της κινητής φάσης στη στατική φάση (στήλη)

8.4. Διάταξη αέριου χρωματογράφου



Σχήμα 19. Βασικά τμήματα ενός αέριου χρωματογράφου [16].

Το φέρον αέριο (συνήθως άζωτο, αργό, υδρογόνο) από τη φιάλη υψηλής πίεσης, μέσα από ρυθμιστές παροχής, οδηγείται στη στήλη. Η εισαγωγή του δείγματος γίνεται με μικροσύριγγα στη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος στην κορυφή της στήλης [16,28,40].

Τα συστατικά του δείγματος συμπαρασύρονται από το φέρον αέριο κατά μήκος της στήλης και διαχωρίζονται. Τα κλάσματα στη συνέχεια ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή και τα σήματα της ανίχνευσης καταγράφονται από το καταγραφικό ή οδηγούνται σε μικροϋπολογιστή. Σε ορισμένες περιπτώσεις, στη συνέχεια υπάρχει μία διάταξη, όπου συλλέγονται τα διάφορα κλάσματα και τέλος ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου [16,28,40].

Ο αέριος χρωματογράφος αποτελείται από δύο τμήματα:

1. το φέρον αέριο και το κύριο μέρος του χρωματογράφου, όπου γίνεται ο διαχωρισμός και
2. το σύστημα ανίχνευσης, καταγραφής και αποτίμησης του σήματος

Φέρον αέριο:

Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαχωριστεί στον ανιχνευτή από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Έτσι, ως φέροντα αέρια μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε: ήλιο, αργό, άζωτο και υδρογόνο. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να υπάρχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη.

Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, γι' αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι τελείως απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιούμε. Η παροχή του ρυθμίζεται με ειδικές βαλβίδες και ροόμετρα [16,28,40].

Στήλη χρωματογράφου :

Το κύριο μέρος του χρωματογράφου, η καρδιά του χρωματογράφου, είναι η στήλη. Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στη χρωματογραφία είναι συνήθως γυάλινες ή χαλύβδινες στήλες γεμισμένες με διάφορα υλικά ανάλογα με τα συστατικά που θέλουμε να διαχωρίσουμε (στήλες υλικού πλήρωσης, packed columns). Το σχήμα τους έχει τη μορφή έλικας και η διάμετρος τους είναι πάρα πολύ μικρή. Σήμερα χρησιμοποιούνται τριχοειδείς γυάλινες στήλες μήκους μέχρι 25 m, οι οποίες εσωτερικά είναι καλυμμένες με διάφορα υλικά (coated capillary glass columns) [16,28,40].

Το δείγμα όγκου της τάξης μl , εισάγεται στο ρεύμα του φέροντος αερίου στην αρχή της στήλης με μια μικροσύριγγα, διαμέσου μιας ελαστικής πλακέτας ή ενός διαφράγματος ή μιας βαλβίδας. Η ταχύτητα και η ικανότητα διαχωρισμού εξαρτώνται από τη θερμοκρασία. Για το λόγο αυτό η στήλη βρίσκεται μέσα σε ένα φούρνο ακριβείας ο οποίος δίνει αυστηρά επαναλήψιμες συνθήκες. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφορών δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του μίγματος, το υλικό πλήρωσης της στήλης ή το υλικό κάλυψης του εσωτερικού της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου [16,28,40].



Ανιχνευτής χρωματογράφου

Το δεύτερο μέρος του χρωματογράφου περιλαμβάνει τον ανιχνευτή, ο οποίος τοποθετείται στο τέλος της στήλης, ανιχνεύει τα διάφορα συστατικά και δίνει ηλεκτρικά σήματα. Τα σήματα ενισχύονται και καταγράφονται στο καταγραφικό σύστημα, το οποίο είναι συνδεδεμένο με μικροϋπολογιστή [16,28,40].

8.5. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας

Κύρια μειονεκτήματα είναι ότι περιορίζεται στα πτητικά δείγματα, ενώ δεν είναι κατάλληλη για θερμικά ασταθή δείγματα. Η αναγνώριση των κορυφών, επίσης, γίνεται με φασματοσκοπία, συνήθως μάζας. Στα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας περιλαμβάνεται η ταχύτητα και η απλότητα καθώς και η μεγάλη ευαισθησία που φτάνει σε συγκεντρώσεις ppm και ppb. Ακόμα, ενώ είναι αποτελεσματική σε δύσκολους διαχωρισμούς είναι και μη καταστρεπτική μέθοδος, επιτρέποντας έτσι σύζευξη με άλλες διατάξεις π.χ. MS. Δίνει αναλύσεις υψηλής ακρίβειας, με τυπικά RSDs 1-5% με μικρές ποσότητες δείγματος, μl και με χαμηλό κόστος [16,28,40].

8.6. Εφαρμογές της αέριας χρωματογραφίας

Η αέρια χρωματογραφία είναι μια μέθοδος ενόργανης ανάλυσης ικανή να δίνει πληροφορίες τόσο για την ποιοτική όσο και για την ποσοτική σύνθεση δειγμάτων. Χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό οργανικών ουσιών σε πολύπλοκα δείγματα, μέχρι και τον προσδιορισμό διάφορων φυσικοχημικών μεγεθών. Η ποιοτική ανάλυση γίνεται σε δείγματα γνωστών και/ή αγνώστων συστατικών με σύγκριση του χρόνου ανάσχεσης και απόκρισης από το χρωματογράφημα μετά από τον διαχωρισμό τους. Πιο συχνά γίνεται σύζευξη με φασματογράφο μάζας (mass spectrometer), για την ποιοτική ανάλυση [16,28,40].

Η συνολική ποσότητα ενός εκλούόμενου συστατικού συνήθως υπολογίζεται από την επιφάνεια της κορυφής, με ολοκλήρωση με την βοήθεια ηλεκτρονικών ολοκληρωτών. Για την ποσοτική ανάλυση το σχήμα της κορυφής δεν έχει καμία επίδραση στην ακρίβεια της ανάλυσης, με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει αλληλοεπικάλυψη κορυφών. Η ποσοτική ανάλυση μπορεί να γίνει και με σύγκριση του ύψους κορυφής. Αν οι κορυφές είναι στενές και οξείες, το ύψος της κορυφής είναι ανάλογο της ποσότητας της ουσίας [16,28,40].

Πρακτικά, στις αναλυτικές τεχνικές στο εργαστήριο, η εκτίμηση του ύψους της κορυφής δεν εφαρμόζεται αφού εξαρτάται από τους συντελεστές ανάσχεσης και χάνει την αναλογία του με την συγκέντρωση ή την μάζα του συστατικού που εκλύεται, ενώ το εμβαδόν της κορυφής είναι ανεξάρτητο από τους συντελεστές ανάσχεσης [16,28,40].

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται σήμερα για την ανάλυση πτητικών ουσιών σε [16,28,40]:

- τρόφιμα (λιπίδια, πρωτεΐνες, συντηρητικά, αρωματικές ύλες κ.α.),
- φάρμακα,
- προϊόντα πετρελαίου,
- βιομηχανίες αρωματοποιίας,
- περιβαλλοντικά δείγματα (PCB's, DDT, καρβαμιδικές ενώσεις, οργανοχλωριωμένες ενώσεις, παρασιτοκτόνα, PAH's),
- τοξικολογία, δικονομική ανάλυση (π.χ. αιθανόλη στο αίμα οδηγών, ναρκωτικά σε βιολογικά υγρά, αίμα, ούρα, υγρά στομάχου).

9. Πειραματικό μέρος

9.1. Αντιδραστήρια και οργανολογία

- Cypermethrin, fenvalerate, deltamethrin and λ-cyhalothrin (Riedel de Haën ,Seelze, Germany)
- Acetone(analytical grade, Fluka, Riedel de Haën ,Seelze, Germany)
- Hexane(analytical grade, Fluka, Riedel de Haën ,Seelze, Germany)
- Ethanol(analytical grade, Fluka, Riedel de Haën ,Seelze, Germany)
- Methanol(analytical grade, Fluka, Riedel de Haën ,Seelze, Germany)
- Acetonitrile(analytical grade, Fluka, Riedel de Haën ,Seelze, Germany)
- Κοίλη μεμβράνη πολυπροπυλενίου (Accurel Q 3/2), πάχος τοιχωμάτων 200μm, εσωτερική διάμετρος 600μm, (Membrana, Wuppertal, Germany)
- Σύριγγες 10μl Hamilton Gastight (Hamilton Bonaduz, Switzerland), Model 1701RNR, με αμβλεία βελόνα (5.1 cm length; 0.071 cm O.D.; 0.015 cm I.D.).
- Γυάλινα φιαλίδια των 7 ml (Supelco, Bellefonte, USA screw cap Vials)
- Απιονισμένο νερό, από σύστημα EASYpure RF της Barnstead/Thermolyne (Dubuque, USA)
- Σύστημα Shimadzu GC-17A (version 3)-ECD (version 2) GC-ECD system, equipped with a split/splitless injector
- Τριχοειδής στήλη HP5-MS, 30 m × 0.25 mm i.d. × 0.25 μm film (Agilent Technologies).
- Ελαστικό πώμα για το GC, Thermogreen LB-2 (Supelco).
- He (>99.999% pure) ως φέρον αέριο στο GC με ρυθμό 1.2ml/min.
- Μαγνητικός αναδευτήρας με πλαστική επικάλυψη .
- Συσκευή ανάδευσης Heidolph MR3001K, 800W.

9.2. Προετοιμασία πρότυπων διαλυμάτων

9.2.1. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων σε ακετόνη

Ένα από τα βασικά στάδια της μεθόδου είναι η σωστή και ακριβής παρασκευή των προτύπων, αφού με αυτά εργαζόμαστε κατά την διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων. Η γενική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή ήταν η εξής: σε μικρά φιαλίδια τα όποια κλείνουν με πώμα, και τα οποία προηγουμένως είχαν καθαριστεί σχολαστικά, ζυγίσαμε την κάθε ουσία ξεχωριστά σε ζυγαριά ακριβείας. Σε κάθε φιαλίδιο ζυγίστηκαν 10mg από την κάθε ουσία και στην συνέχεια προστέθηκε 1ml ακετόνης, όπου όλα μαζί ζυγίστηκαν ξανά καταγράφοντας την τελική μάζα (ουσίας + διαλυτή). Η τελική συγκέντρωση των προτύπων ήταν 10000ppm.

9.2.2. Παρασκευή Μίγματος Πυρεθροειδών σε ακετόνη

Σε μια ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκαν 10ml ακετόνης και στην συνέχεια υπολογίστηκε ο απαιτούμενος όγκος, για κάθε ουσία, που χρειαζόταν να προσθέσουμε από τα πρότυπα των 10000 ppm έτσι ώστε το μίγμα να έχει τελική συγκέντρωση 200ppm. Κατά την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες οι οποίες προηγουμένως είχαν καθαριστεί στο ultra sound και από 10 φορές με τους διαλυτές εξάνιο, μεθανόλη, ακετόνη. Αφού έγινε η προσθήκη των ξεχωριστών προτύπων στην ογκομετρική ακλούθησε ανάδευση τους και στην συνέχεια τοποθέτηση σε φιαλίδιο το οποίο έκλεινε με πώμα. Το πρότυπο αυτό μίγμα πυρεθροειδών χρησιμοποιήθηκε για την επιμόλυνση των δειγμάτων ελαιολάδου κατά την διάρκεια των πειραμάτων.

9.2.3. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων σε εξάνιο

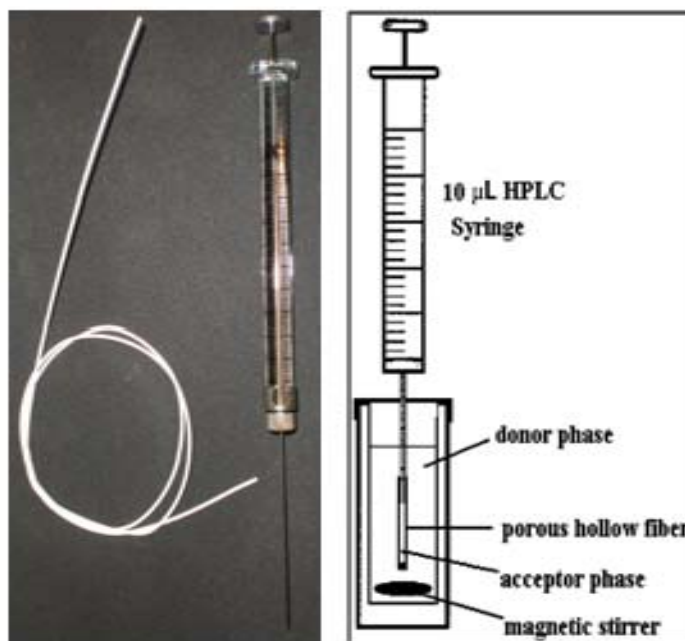
Η γενική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων σε εξάνιο ήταν η ίδια με την προηγούμενη. Από τα αρχικά πρότυπα που φτιάχτηκαν σε ακετόνη και με τελική συγκέντρωση 10000ppm, υπολογίσαμε την ποσότητα που χρειαζόταν για να φτιάξουμε τα πρότυπα σε εξάνιο με τελική συγκέντρωση 200 ppm. Μετά από τα 200 ppm πρότυπα διαλύματα σε εξάνιο, κάναμε αραιώση και φτιάξαμε διαλύματα με τελική συγκέντρωση 1 ppm. Τα πρότυπα διαλύματα με συγκέντρωση 1ppm χρησιμοποιήθηκαν για απευθείας έκχυση στο GC έτσι ώστε να αναγνωριστούν οι ουσίες μέσω του χρόνου συγκράτησης. Κατά την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες οι οποίες προηγουμένως είχαν καθαριστεί στο ultra sound και από 10 φορές με τους διαλυτές εξάνιο, μεθανόλη, ακετόνη.

9.2.2. Παρασκευή Μίγματος Πυρεθροειδών σε εξάνιο

Σε μια ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκαν 10ml εξανίου και στην συνέχεια υπολογίστηκε ο απαιτούμενος όγκος, για κάθε ουσία, που χρειαζόταν να προσθέσουμε από τα πρότυπα των 200 ppm έτσι ώστε τα μίγματα να έχουν τελική συγκέντρωση 1 και 2ppm. Τα πρότυπα μίγματα 1 και 2ppm χρησιμοποιήθηκαν κατά την διαδικασία αναγνώρισης των ουσιών, για να ελεγχτεί εάν οι χρόνοι συγκράτησης των ενώσεων συμπίπτανε ο ένας με τον άλλο. Κατά την διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν σύριγγες οι οποίες προηγουμένως είχαν καθαριστεί στο ultra sound και από 10 φορές με τους διαλυτές εξάνιο, μεθανόλη, ακετόνη.

9.3. Περιγραφή- εφαρμογή της μεθόδου HF-LPME.

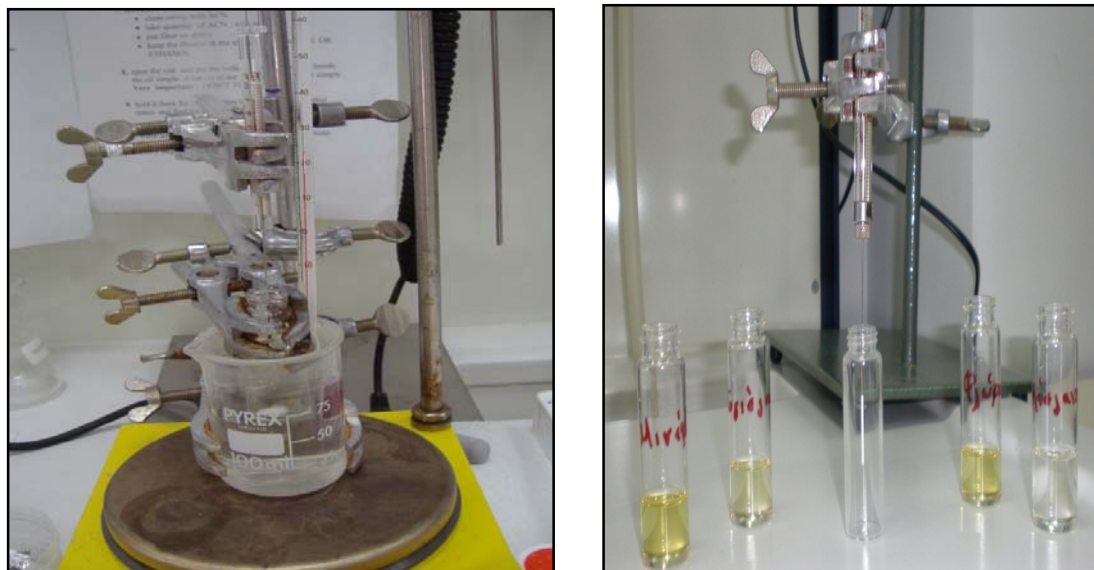
Κατά την διάρκεια διεξαγωγής της μεθόδου χρησιμοποιήθηκε κοίλη μεμβράνη πολυπροπυλενίου (Accurel Q 3/2), με πάχος τοιχωμάτων 200 μm και εσωτερική διάμετρο 600 μm , (Membrana, Wuppertal, Germany). Η μεμβράνη η οποία είχε μήκος 1m κόπηκε σε μικρότερα τμήματα των 1,3cm το καθένα τα οποία εμβαπτίστηκαν αρχικά σε ακετόνη, αφέθηκαν να στεγνώσουν τελείως και μετά τοποθετήθηκαν σε γυάλινο φιαλίδιο των 7 ml με πόμα. Στην συνέχεια μια σύριγγα (σχήμα 20) 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.) , χρησιμοποιήθηκε για να κρατήσει την αποδεκτή υγρή φάση(ακετονιτρίλιο) ,να τοποθετηθεί σε αυτή η κοίλη μεμβράνη πολυπροπυλενίου και επίσης να χρησιμοποιηθεί και ως σύριγγα έκχυσης στο GC.(injection syringe).



Σχήμα 20 : Σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην μέθοδο HF-LPME

Στην συνέχεια σε γυάλινα φιαλίδια των 7 ml με πόμα, ζυγίστηκαν σε ζυγαριά ακριβείας 2,5g ελαιολάδου. Κάθε φορά ένα από αυτά προετοιμαζόταν για ανάλυση αφού προηγουμένως γινόταν επιμόλυνση του από το μίγμα πυρεθροειδών 200 ppm σε ακετόνη και η τελική συγκέντρωση στο μίγμα ελαιολάδου-πυρεθροειδών ήταν 1 ppm. Για την ανάμιξη του μίγματος ελαιολάδου – πυρεθροειδών χρησιμοποιούσαμε αναδευτήρα για 1 λεπτό και σε ταχύτητα 1500 rpm, ενώ στην συνέχεια το δείγμα παρέμενε για 10 λεπτά σε ηρεμία .

Μετά από αυτό προσθέταμε τα 4 ml εξανίου στο μίγμα και αφού σφραγιζόταν πολύ καλά αναδευόταν για 1 λεπτό και σε ταχύτητα 1500 rpm. Έτσι το δείγμα ήταν έτοιμο προς ανάλυση και το τοποθετούσαμε στο ειδικό σύστημα το οποίο προηγουμένως είχε ρυθμιστεί βάση τον αναγκών του πειράματος .Το σύστημα αυτό (σχήμα 21), περιελάμβανε ένα αναδευτήρα, ένα γυάλινο δοχείο γεμισμένο με νερό και 2 συσκευές ειδικής συγκράτησης.

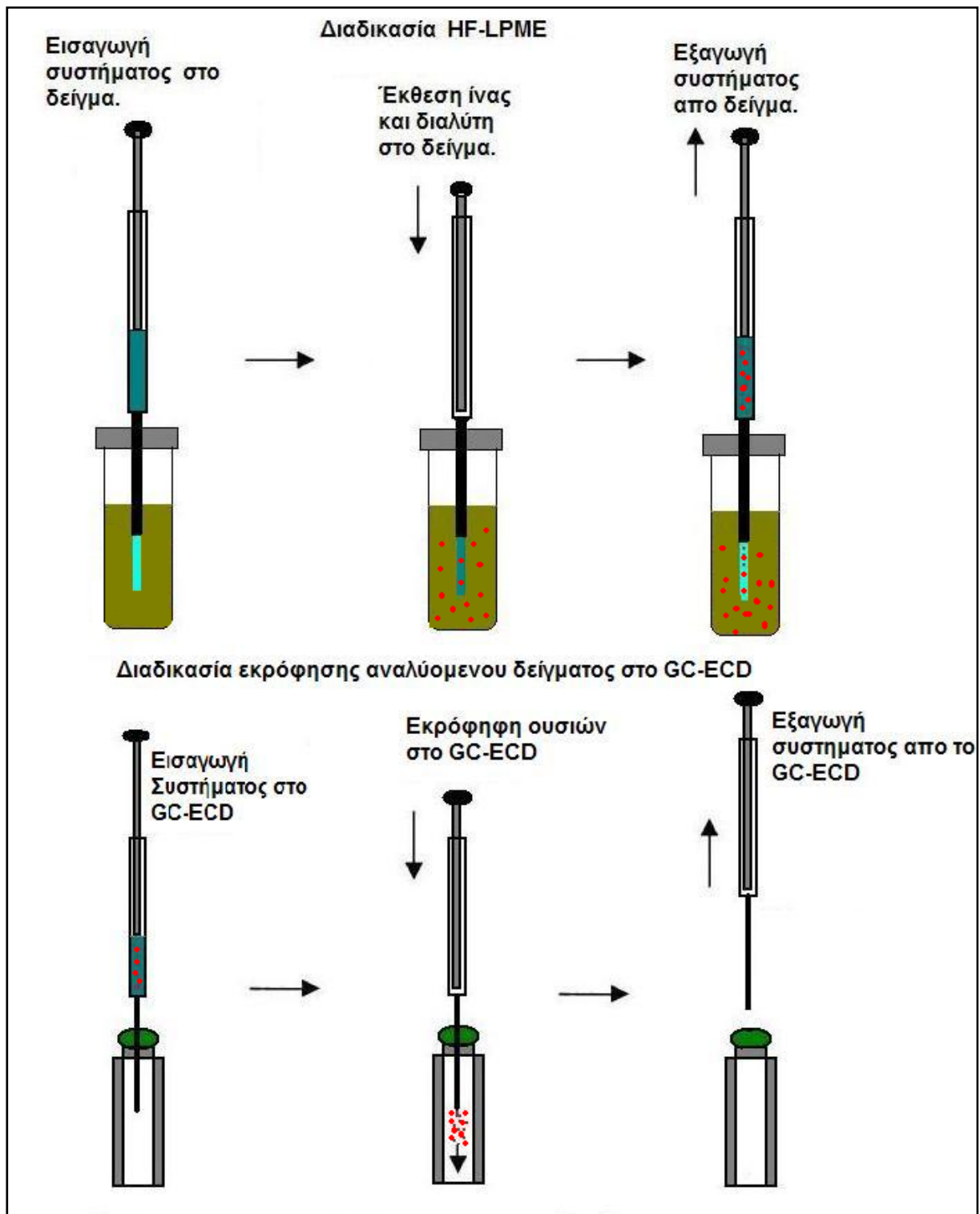


Σχήμα 21: Απεικόνιση του συστήματος που χρησιμοποιήθηκε για τα πειράματα

Στο σύστημα αυτό το μίγμα παρέμενε για 5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου και με ανάδευση στις 700rpm, ενώ παράλληλα πραγματοποιείτο η προετοιμασία της σύριγγας η οποία θα έκανε την εξαγωγή. Κατά την προετοιμασία αυτή η σύριγγα ξεπλενόταν με ακετονιτρίλιο περίπου 10-15 φορές, εκροφούσαμε από άλλο φιαλίδιο 4 μl ακετονιτρίλιου, τοποθετούσαμε σε αυτή την κοίλη μεμβράνη πολυπροπυλενίου μήκους 1,3cm και τέλος γινόταν εμβάπτιση της σύριγγας –μεμβράνης για 2 λεπτά σε μεθανόλη.

Με το πέρας του χρόνου αναμονής των 5 λεπτών για την ανάδευση του δείγματος το σύστημα σύριγγας–μεμβράνης το τοποθετούσαμε μέσα στο προς ανάλυση δείγμα ελαιολάδου (σχήμα 22) που βρισκόταν στην συσκευή ειδικής συγκράτησης, πιέσαμε με αργό ρυθμό την σύριγγα έτσι ώστε να γίνει έκχυση του διαλυτή(ακετονιτρίλιου) μέσα στην μεμβράνη και στην συνέχεια περιμέναμε για 15 λεπτά μέχρι να κάνουμε εξαγωγή του δείγματος. Κατά την εξαγωγή του δείγματος εισροφούσε στην σύριγγα 1,5 μl, όπου μετά το ξέπλυμα απο την εξω μεριά της σύριγγας με ακετόνη, το τοποθετούσαμε στον αέριο χρωματογράφο για ανάλυση σε πρόγραμμα 39 λεπτών.

Επομένως με το τρόπο αυτό ελέκτηκε μια σειρά παραμέτρων που επηρεάζουν την μέθοδο όπως η επιλογή του διαλύτη εμβάπτισης της μεμβράνης, η μάζα του λαδιού, η ποσότητα εξανίου που προσθέταμε στο δείγμα, ο χρόνος εξαγωγής του δείγματος, η ταχύτητα ανάδευσης και ο χρόνος εμβάπτισης.



Σχήμα 22: Απεικόνιση της διαδικασίας της μεθόδου HF-LPME

9.4. Χρωματογραφική ανάλυση με αέριο χρωματογράφο GC-ECD.

Χρησιμοποιήθηκε το μηχάνημα GC-ECD όπως αναφέρεται παραπάνω, σε όλες τις αναλύσεις. Το σύστημα εισαγωγής δείγματος λειτουργεί στους 270 °C με διαμερισμό δείγματος (splitless mode), με τη δίοδο διαχωρισμού κλειστή για 3 λεπτά (split ratio 22:1). Καθημερινά καινούριο ελαστικό πώμα τοποθετούταν στον εισαγωγέα του δείγματος αφού πρώτα είχε διατηρηθεί, για να αποφευχθούν διαρροές του φέροντος αερίου εξαιτίας της χρήσης βελόνας μεγάλης διαμέτρου. Το φέρον αέριο, He διοχετευόταν με ρυθμό 1.2ml/min. Ο φούρνος αρχικά βρισκόταν στους 70°C για 2 min , ανέβαινε στους 200 °C με ρυθμό 25 °C /λεπτό και παρέμενε για 1 λεπτό ,στην συνέχεια ανέβαινε στους 220 °C με ρυθμό 3 °C /λεπτό και παρέμενε για 1 λεπτό και τέλος έφτανε τους 280 °C με ρυθμό 25 °C/λεπτό όπου και παρέμενε για 20 λεπτά .

Πινάκας 3: Πρόγραμμα ανάλυσης πυρεθροειδών στον αέριο χρωματογράφο GC-ECD

	Φούρνος (Oven)	Παράμετροι (Parameters)	
Βήμα (Step)	Ρυθμός (Rate) (°C/min)	Θερμοκρασία (Temp) (°C)	Αναμονή (Wait) (min)
Init		70	2
1	25	200	1
2	3	220	1
3	25	280	20

10. Αποτελέσματα

10.1. Συνθήκες εκχύλισης με την τεχνική μικροεκχύλισης υγρής φάσης(HF-LPME.)

10.1.1. Πειραματικός έλεγχος για τον καθορισμό του κατάλληλου διαλύτη που προσθέταμε στο μίγμα ελαιολάδου-πυρεθροειδών.

Ένα σημαντικό βήμα ήταν η επιλογή που διαλύτη που θα χρησιμοποιούσαμε κατά την διάρκεια του πειράματος και τον οποίο θα προσθέταμε στο μίγμα προς ανάλυση. Έτσι με ένα πολύ απλό πείραμα όπου τοποθετήσαμε σε γυάλινα φιαλίδια των 7 ml , 2 gr ελαιολάδο και στην συνέχεια προσθέταμε σε κάθε φιαλίδιο ξεχωριστά τους ακόλουθους διαλύτες : μεθανόλη, ακετόνη, εξάνιο, ακετονιτρίλιο, οκτανόλη, αιθανόλη , τολουόλιο , κυκλοεξάνιο και προπανόλη.

Πινάκας 4: Αποτελέσματα έλεγχου για τον καθορισμό κατάλληλου διαλύτη που προστέθηκε στο μίγμα ελαιολάδου-πυρεθροειδών.

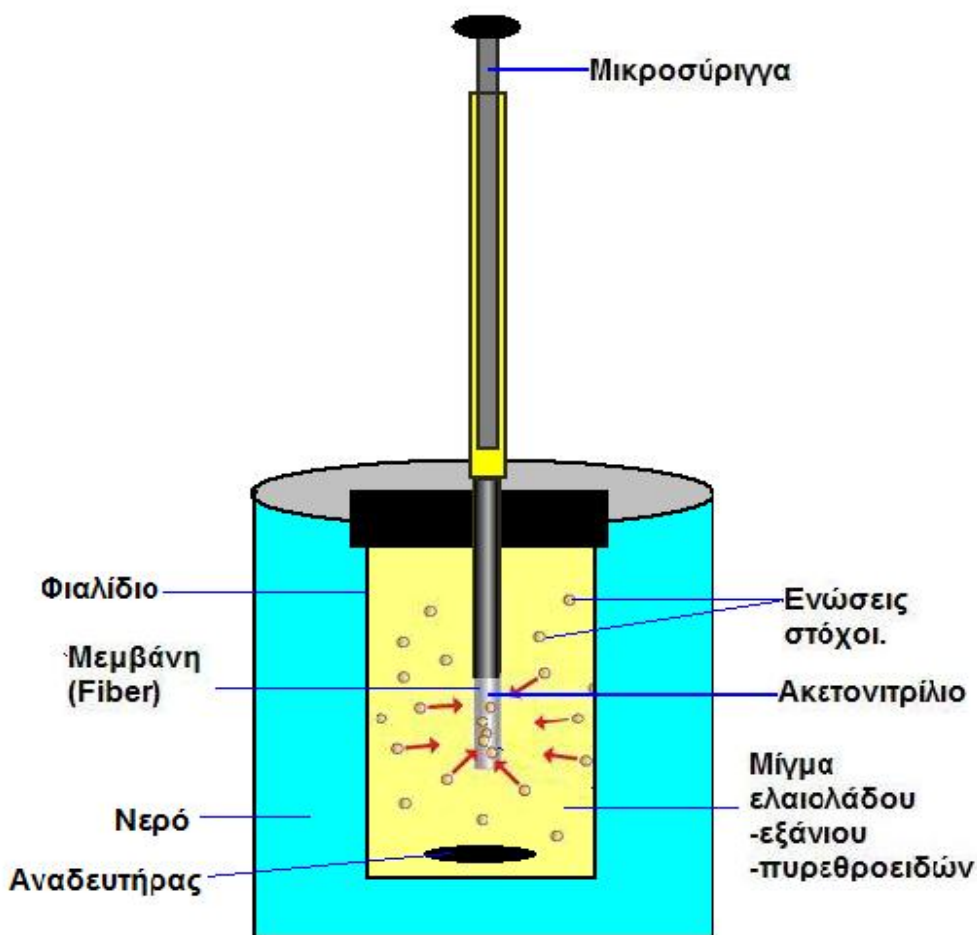
ΔΙΑΛΥΤΕΣ	ΔΙΑΛΥΤΟ ΣΤΟ ΛΑΔΙ
Μεθανόλη	OXI
Εξάνιο	NAI
Οκτανόλη	NAI
Ακετονιτρίλιο	OXI
Ακετόνη	NAI
Αιθανόλη	OXI
Τολουόλιο	NAI
Κυκλοεξάνιο	NAI
Προπανόλη	NAI

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη γίνεται βάση των αναγκών του πειράματος όσο και των αποτελεσμάτων που είχαμε. Αυτό σημαίνει ότι ο διαλύτης που προστίθεται στο ελαιολάδο πρέπει να αναμιγνύεται πλήρως με αυτό κάνοντας την επιθυμητή αραίωση στην μήτρα , και να βελτιώνει την μη ανάμιξη μεταξύ των άλλων δυο φάσεων , δηλαδή του ακετονιτρίλιου και της μεθανόλης . Συνεπώς με αυτά τα κριτήρια καταλληλότερος διαλύτης επιλέχτηκε το εξάνιο όπου χρησιμοποιήθηκε κατά την διάρκεια προετοιμασίας των δειγμάτων ελαιολάδου προς ανάλυση.

10.1.2. Πειραματικός έλεγχος για τον καθορισμό του κατάλληλου διαλύτη για την εκχύλιση .

Ο διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση είναι ένα ακόμα σημαντικό βήμα για την διεξαγωγή της μεθόδου και θα πρέπει να υπακούει σε κάποιες απαιτήσεις που έχουν αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος .Οι διαλύτες που εξετάστηκαν ήταν το εξάνιο, το τολουόλιο και το ακετονιτρίλιο .Η εκλεκτικότητα του διαλύτη εκτιμήθηκε σε εκχυλίσεις δειγμάτων διάρκειας 15 λεπτών που είχαν επιμολυνθεί προηγουμένως με το μίγμα των πυρεθροειδών (τελική συγκέντρωση στο μίγμα ήταν 1ppm) .Η ταχύτητα ανάδευσης ήταν 700 rpm.

Μετά από αυτό καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι το ακετονιτρίλιο έδινε καλύτερα αποτελέσματα αφού μπορούσε εύκολα να ακινητοποιηθεί στους πόρους της ίνας, σε σύντομο χρονικό διάστημα, δεν εμφανίστηκαν σημαντικές απώλειες του διαλύτη κατά την εκχύλιση και το κυριότερο, έδειξε μεγάλη εκλεκτικότητα και έδωσε καλή απόδοση εκχύλισης για όλες τις ενώσεις στόχους.

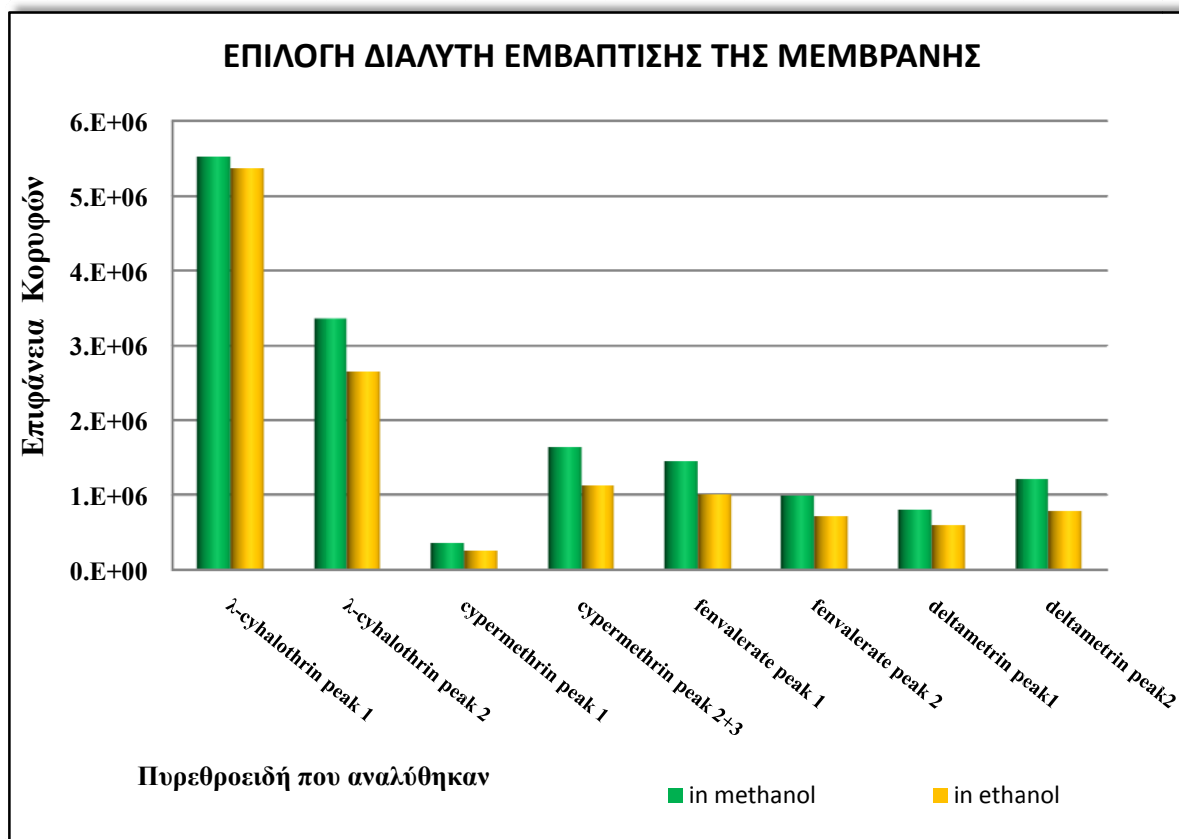


Σχήμα 23: Σχηματική επεξήγηση της μεθόδου

10.1.3. Μελέτη του διαλυτή εμβάπτισης της μεμβράνης

Στην φάση αυτή μελετήθηκε τόσο επίδραση που είχε η εμβάπτιση της μεμβράνης στον διαλύτη όσο και το είδος του διαλύτη. Καταφέραμε μέσα από την βιβλιογραφία[35,36] να επικεντρωθούμε σε δυο μόνο διαλύτες την μεθανόλη και την αιθανόλη. Αξίζει εδώ να σημειωθεί ότι το λάδι είναι μια δύσκολη μήτρα και οι επιλογές που δίνονται όταν κανείς εργάζεται με αυτό είναι περιορισμένες. Οι συνθήκες διεξαγωγής των πειραμάτων αυτών είναι ακριβώς οι ίδιες με αυτές που περιγράφονται στην παράγραφο 9.3 με μονή διαφορά ότι κάναμε δυο τέτοια σετ με διαφορετικό διαλύτη κάθε φορά.

Επομένως όπως φαίνετε και στο διάγραμμα 1 ο διαλύτης που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα είναι η μεθανόλη, διότι όπως έχει προαναφερθεί θα πρέπει ο διαλύτης αυτός να αυξάνει την μη διαλυτότητα μεταξύ του μίγματος (ελαιόλαδο - εξάνιο) και του ακετονιτριλίου που βρίσκεται μέσα στην μεμβράνη. Έτσι στα επόμενα πειράματα ο διαλύτης εμβάπτισης της μεμβράνης ήταν η μεθανόλη. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ήταν: χρόνος εκχύλισης 15 λεπτά, ταχύτητα ανάδευσης 700 rpm και συγκέντρωση πυρεθροειδών στο μίγμα 1 ppm.

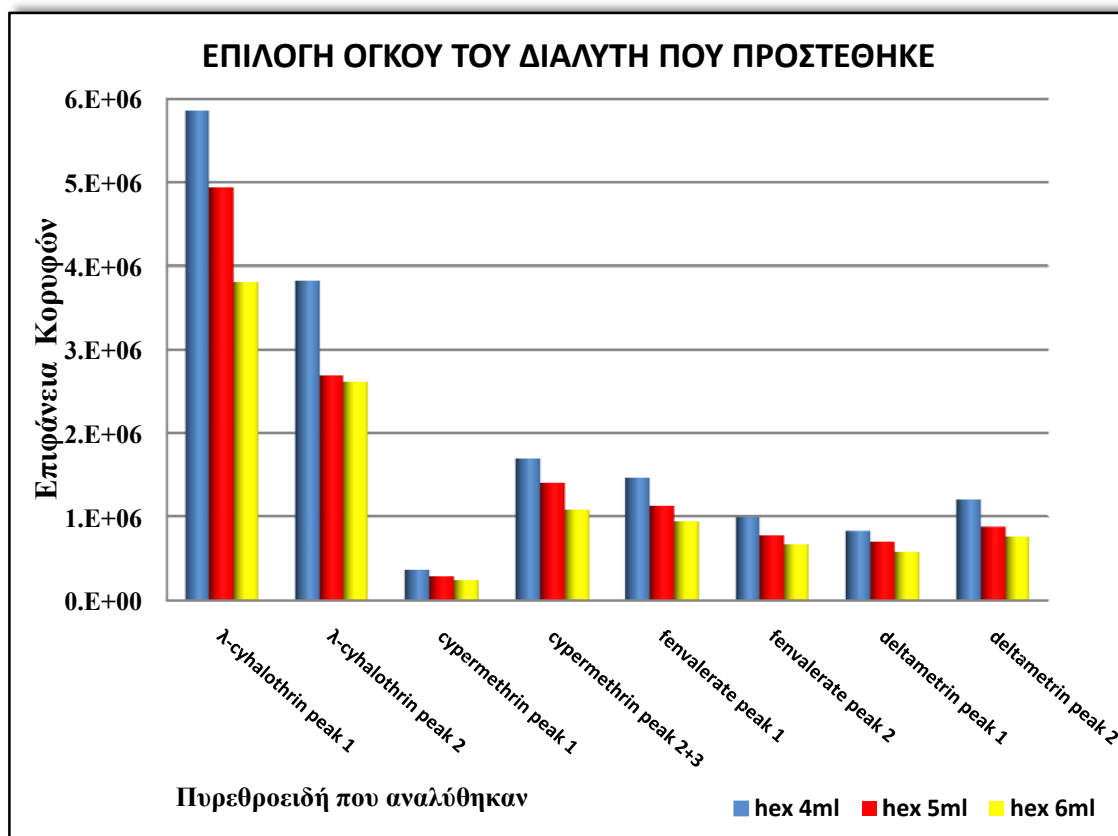


Διάγραμμα 1: Επιλογή διαλύτη εμβάπτισης

10.1.4. Μελέτη του όγκου του διαλύτη που προστίθεται στο μίγμα προς ανάλυση

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας στην μέθοδο αυτή ήταν η ποσότητα του διαλύτη (εξανίου) η οποία προστέθηκε στο μίγμα ελαιολάδου-πυρεθροειδών. Η προθήκη αυτή είχε σκοπό να βοηθήσει την εκχύλιση και να δώσει καλύτερα αποτελέσματα. Κατά την διάρκεια του πειράματος αυτού δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές ποσότητες εξανίου, 4 ml, 5 ml και 6 ml. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ήταν : χρόνος εκχύλισης 15 λεπτά, ταχύτητα ανάδευσης 700 rpm και συγκέντρωση πυρεθροειδών στο μίγμα 1 ppm.

Παρατηρούμε (διάγραμμα 2) ότι με την αύξηση της προσθήκης εξανίου η απόδοση της εκχύλισης μειώνετε αφού η αραίωση που επέρχεται στο μίγμα είναι μεγάλη με αποτέλεσμα οι ουσίες «στόχοι» να παραμένουν σε αυτό. Συνεπώς η ποσότητα που έδινε τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα ήταν τα 4 ml εξανίου και στην συνέχεια των πειραμάτων χρησιμοποιείτε αυτό.

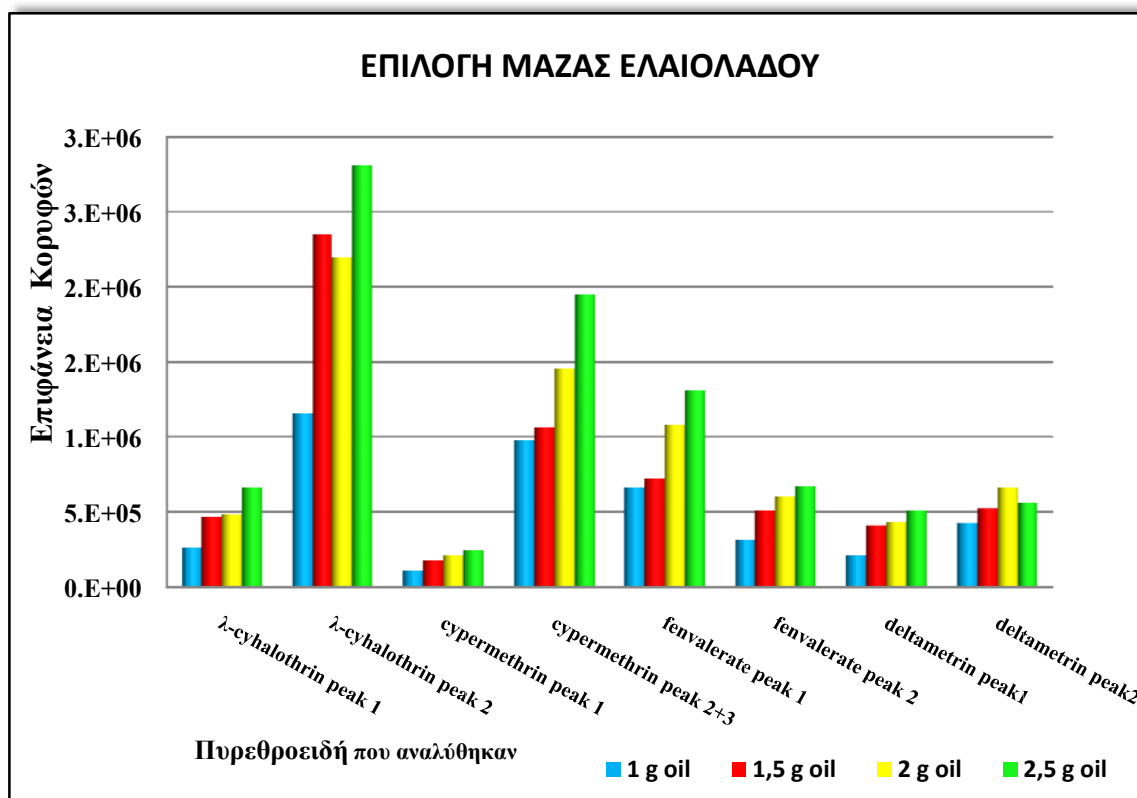


Διάγραμμα 2: Επιλογή όγκου του διαλύτη που προστίθεται στο μίγμα προς ανάλυση

10.1.5. Μελέτη για την επιλογή της καταλληλότερης μάζας λαδιού στο προς ανάλυση δείγμα.

Στο στάδιο αυτό μελετήθηκε η μάζα του λαδιού που ζυγίζαμε κάθε φορά για να προετοιμάσουμε το προς ανάλυση δείγμα. Μια παράμετρος πολύ σημαντική για την μέθοδο και της οποίας η μελέτη έγινε με μεγάλη προσοχή και ακρίβεια. Μελετήθηκαν 4 διαφορετικά σημεία, δηλαδή 4 διαφορετικές μάζες ελαιολάδου, 1 g, 1.5 g, 2 g και 2.5 g, και αυτό εξαρτήθηκε από το ότι η μάζες αυτές θα έπρεπε να χωράνε στα ίδια φιαλίδια όλες. Στόχος δηλαδή ήταν να ελεγκτούν διάφορες μάζες ελαιολάδου χωρίς να αλλάξουμε τον όγκο των φιαλιδίων και συνεπώς τις συνθήκες. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ήταν: χρόνος εκχύλισης 15 λεπτά, ταχύτητα ανάδευσης 700 rpm και συγκέντρωση πυρεθροειδών στο μίγμα 1 ppm, όγκος εξανίου 4 ml.

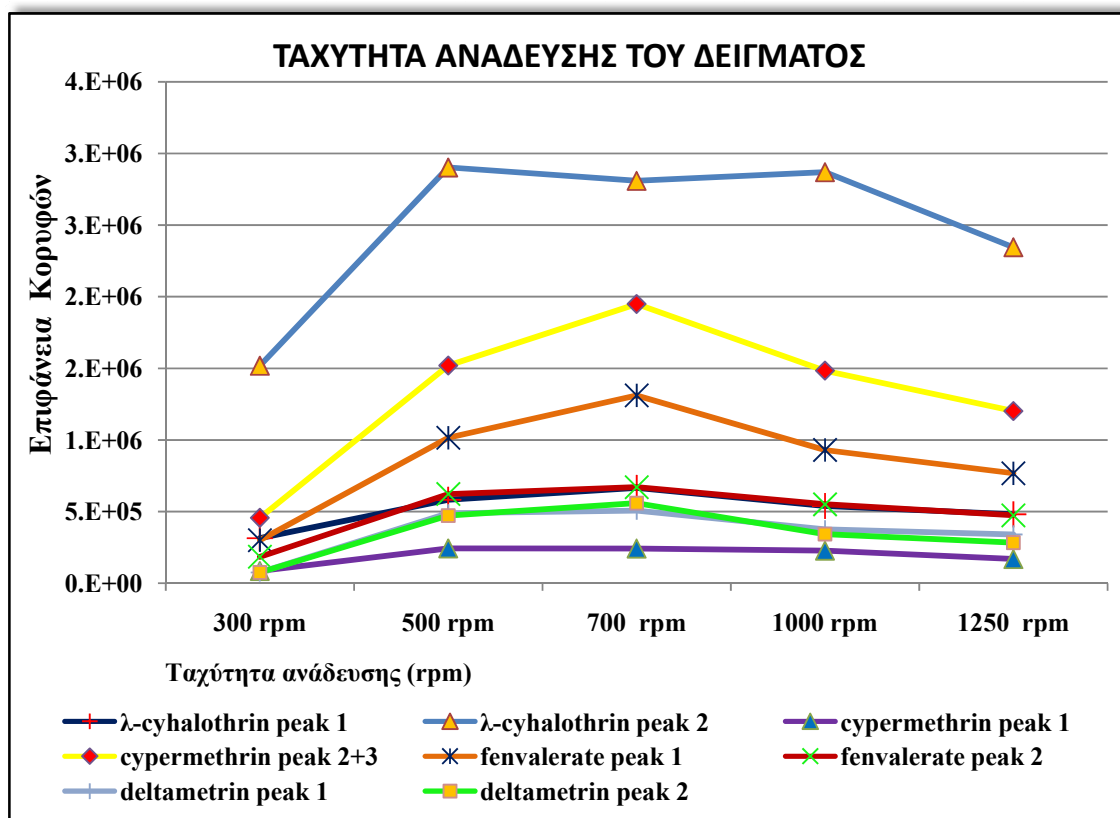
Από τα πειράματα και το διάγραμμα 3 που πρόεκυψε, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι τα καλύτερα αποτελέσματα τα έδινε η μάζα των 2.5 g. Αυτό συμβαίνει διότι η συγκέντρωση των πυρεθροειδών στο μίγμα είναι σταθερή και ισούται με 1 ppm, όμως αυξάνοντας την μάζα του ελαιολάδου για να παραμείνει η συγκέντρωση των πυρεθροειδών σταθερή, θα έπρεπε να προσθέσουμε μεγαλύτερη ποσότητα από το μίγμα των πρότυπων ενώσεων (μίγμα πυρεθροειδών ενώσεων σε ακετόνη, συγκέντρωση 200 ppm). Συνεπώς η μάζα του κάθε πυρεθροειδούς ήταν μεγαλύτερη για τα 2,5 g λαδιού γι αυτό είχαμε και αυξημένη απόδοση.



Διάγραμμα 3: Επιλογή της καταλληλότερης μάζας λαδιού στο προς ανάλυση δείγμα

10.1.6. Μελέτη της επίδρασης της ταχύτητας ανάδευσης

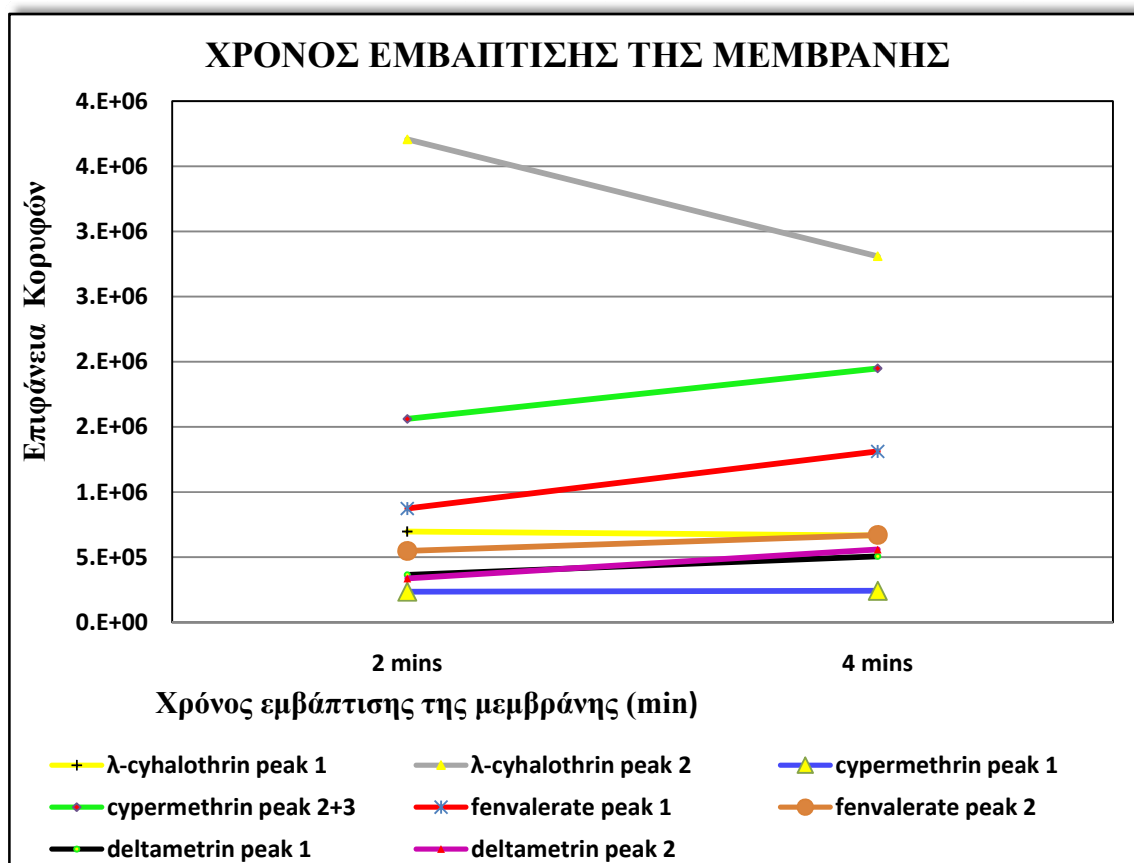
Στην περίπτωση αυτή εξετάστηκε η επιρροή της ταχύτητας ανάδευσης κατά την εκχύλιση (διάγραμμα 4). Η βελτιστοποίηση έγινε με την διεξαγωγή πειραμάτων στις ταχύτητες ανάδευσης των 0, 300, 500, 700, 1000 και 1250 rpm. Η ανάδευση για κάθε δείγμα διαρκούσε 10 λεπτά και όπως ήταν αναμενόμενο η αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης οδήγησε στην ενδυνάμωση της εκχύλισης μέχρι τα 700 rpm, ενώ από το σημείο αυτό και μετά ξεκίνησε να μειώνετε η απόδοση της εκχύλισης. Αυτό εξηγείτε διότι από τις 1000 rpm και μετά η διάλυση του διαλύτη στο μίγμα ήταν μεγαλύτερη και έτσι μειωνόταν ο όγκος του οργανικού διαλύτη που εισερχόταν στην μικροσύριγγα και μετά στο αναλυτικό όργανο, οδηγώντας σε μειωμένα σήματα ανάλυσης για τον κάθε αναλυτή. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ήταν: χρόνος εκχύλισης 15 λεπτά, μάζα ελαιόλαδου 2,5 g και συγκέντρωση πυρεθροειδών στο μίγμα 1 ppm, όγκος εξανίου 4 ml. Επομένως σε όλα τα επόμενα πειράματα ο ρυθμός ανάδευσης ήταν 700 rpm.



Διάγραμμα 4: Επιλογή της ταχύτητας ανάδευσης

10.1.7. Μελέτη της επίδρασης του χρόνου εμφάνισης της μεμβράνης

Σε αυτή τη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε ο χρόνος εμφάνισης της κοίλης μεμβράνης πολυπροπυλενίου στην μεθανόλη, η οποία είχε επιλεχθεί σε προηγούμενο στάδιο του πειράματος. Σε αυτή την φάση ελέγχθηκαν πειραματικά οι χρόνοι παραμονής 2 και 4 λεπτών αφού προηγουμένως είχε μελετηθεί από την βιβλιογραφία [34,35] σε ποια όρια θα μπορούσε να γίνει αυτό. Όπως φαίνεται (διάγραμμα 5) ο καλύτερος χρόνος εμφάνισης της μεμβράνης σχεδόν για όλες τις ουσίες πλην της λ-cyhalothrin peak 2 ήταν τα 4 λεπτά. Οι συνθήκες διεξαγωγής του πειράματος ήταν: χρόνος εκχύλισης 15 λεπτά, μάζα ελαιόλαδου 2,5 g και συγκέντρωση πυρεθροειδών στο μίγμα 1 ppm, όγκος εξανίου 4 ml και ταχύτητα ανάδευσης 700 rpm.

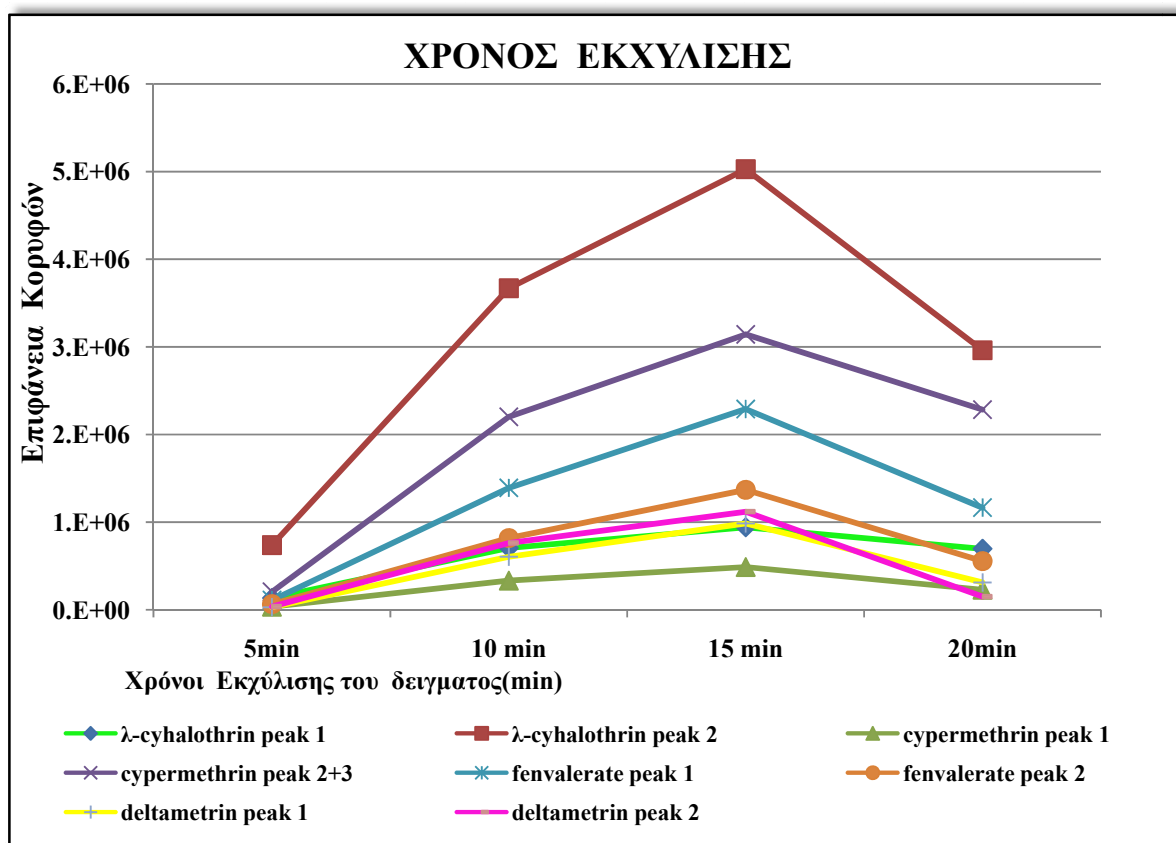


Διάγραμμα 5: Επιλογή του χρόνου εμφάνισης της μεμβράνης

10.1.8. Μελέτη της επίδρασης του χρόνου εκχύλισης

Μια άλλη σειρά πειραμάτων οργανώθηκε για την μελέτη του βέλτιστου χρόνου εκχύλισης. Η μικροεκχύλιση υγρής φάσης LPME βασίζεται στην μεταφορά μάζας των συστατικών από την ελαιώδη φάση στην οργανική και η διαδικασία αυτή εξαρτάται από τον χρόνο. Όσο το σύστημα πλησιάζει σε συνθήκες ισορροπίας, ο ρυθμός μεταφοράς μάζας ελαττώνεται. Οι συνθήκες ισορροπίας επιτυγχάνονται όταν έχει περάσει μεγάλο χρονικό διάστημα, θεωρητικά σε άπειρο χρόνο. Στο διάγραμμα 6 φαίνεται η επίδραση του χρόνου εκχύλισης για κάθε ένωση-στόχος ξεχωριστά, όταν η ταχύτητα ανάδευσης είναι 700rpm, η συγκέντρωση για κάθε συστατικό είναι 1ppm και με χρόνο εκχύλισης 15 λεπτά.

Όπως είναι εμφανές στο σχήμα, όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος της εκχύλισης, τόσο μεγαλύτερη είναι και η ποσότητα των συστατικών που εισέρχονται στην οργανική φάση. Η μείωση που παρατηρείτε μετά τα 15 λεπτά πιθανών να οφείλετε στη απώλεια του διαλυτή από την μεμβράνη. Στην παρούσα μελέτη ο χρόνος εκχύλισης ορίστηκε στα 15 min με σκοπό να υπάρχει ικανοποιητικός ρυθμός ανάλυσης δειγμάτων, σε συνδυασμό με τον χρόνο της χρωματογραφικής ανάλυσης. Επίσης στον χρόνο αυτό δεν παρατηρήθηκε σημαντική απώλεια στον όγκο του διαλύτη λόγω διάλυσης του στο δείγμα και η απόδοση της εκχύλισης ήταν ικανοποιητική.



Διάγραμμα 6: Επιλογή του χρόνου εκχύλισης

Πινάκας 5: Βέλτιστες συνθήκες για την μέθοδο HF- LPME

<i>ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΠΟΥ ΕΛΕΓΚΤΗΚΑΝ</i>	1	2	3	4	5	6	<i>ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ</i>
Διαλύτης για εμβάπτιση της μεμβράνης	Μεθανόλη	Αιθανόλη					Μεθανόλη
Όγκος εξανίου που προστίθεται στο δείγμα (ml)	4	5	6	8			4
Μάζα ελαιόλαδου που τοποθετείτε στο μπουκαλάκι (gr)	1	1.5	2	2.5			2.5
Μήκος μεμβράνης (cm)	1.3						1.3
Ανάδευση (rpm)	0	300	500	700	1000	1250	700
Χρόνος εμβάπτισης της μεμβράνης στην μεθανόλη (min)	2	4					2
Χρόνος εκχύλισης (min)	5	10	15	20			15

10.2. Εκτίμηση μεθόδου

Η αναλυτική απόδοση της μεθόδου ελέγχτηκε για τη γραμμικότητα, και τη δυνατότητα αναπαραγωγής. Όπως φαίνεται και από τα παρακάτω αποτελέσματα είχαμε καλή γραμμικότητα με τους αποδεκτούς συντελεστές συσχετισμού (r) που κυμάνθηκαν από 0.971 (λ -cyhalothrin, ισομερές 1) και 0.996 (cypermethrin, ισομερές 1) που λήφθηκε στο διάστημα συγκέντρωσης 250-1500 ppb (λ -cyhalothrin) και 500-5000 ppb για το υπόλοιπο των ενώσεων που μελετήθηκαν.

Τα εντός της μέρας (intra-day) και ανά ημέρα (inter-day) αποτελέσματα της επαναληψιμότητας κυμανθήκαν σε λιγότερο από 7.7% για όλες τις υπό μελέτη ουσίες - πυρεθροειδή.

Πινάκας 6: Αποτελέσματα Σχετικής σταθερής απόκλισης και Συντελεστή συσχετισμού που λαμβάνονται από τα πειράματα

Ενώσεις:	r^a	RSD ^b
λ -Cyhalothrin (isomer 1)	0.971	7.0
λ -Cyhalothrin (isomer 2)	0.981	3.2
Cypermethrin (isomer 1)	0.996	2.4
Cypermethrin (isomer 2+3)	0.994	3.8
Fenvalerate (isomer 1)	0.990	2.7
Fenvalerate (isomer 2)	0.994	1.0
Deltamethrin	0.995	5.6

r^a : Συντελεστές συσχετισμού που λαμβάνονται από τα πειράματα

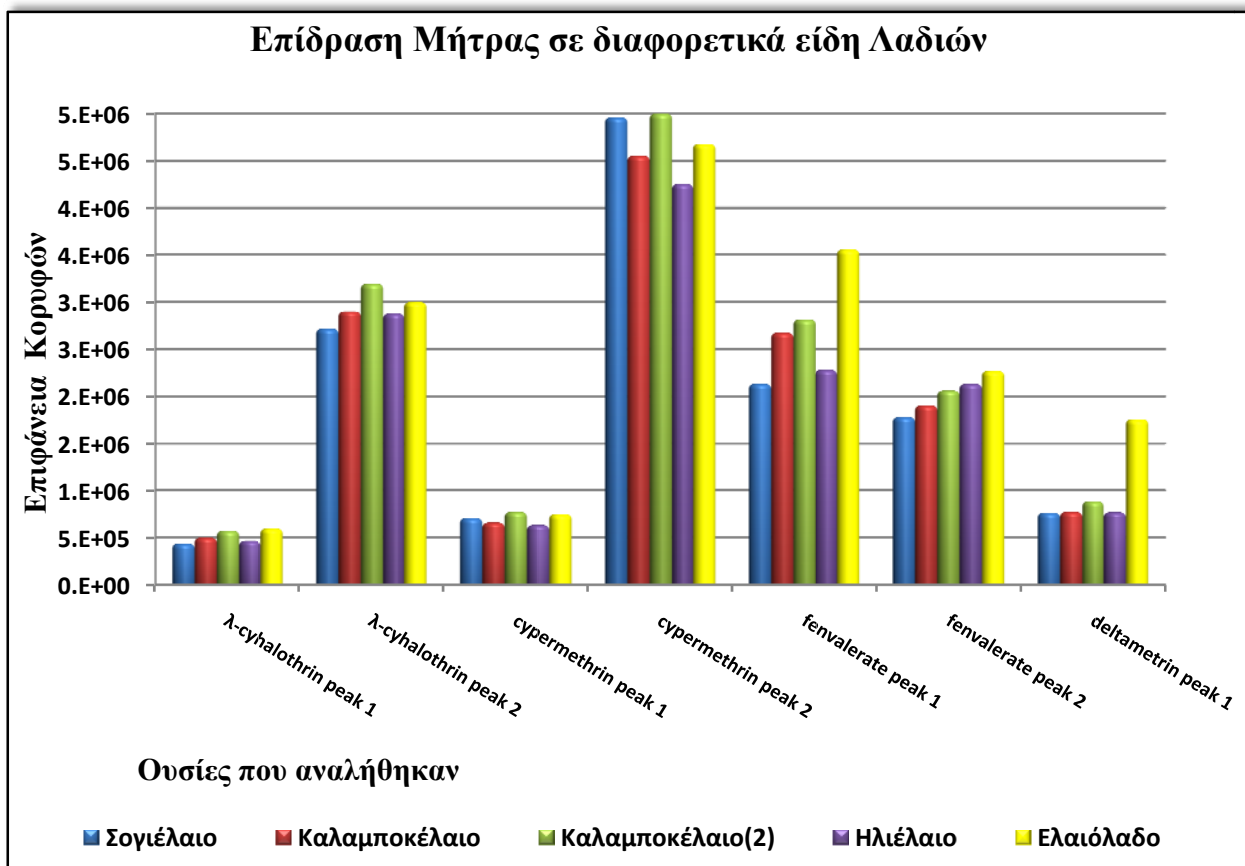
RSD^b: Σχετική σταθερή απόκλιση (εντός της ημέρας).

Η σχετική σταθερή απόκλιση (RSD) δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

- $RSD = (\text{Μέση τιμή} / \text{Τυπική απόκλιση}) \cdot 100$

10.3. Έλεγχος της ικανότητας εφαρμογής της προτεινόμενης μεθόδου σε διαφορετικά είδη λαδιού .

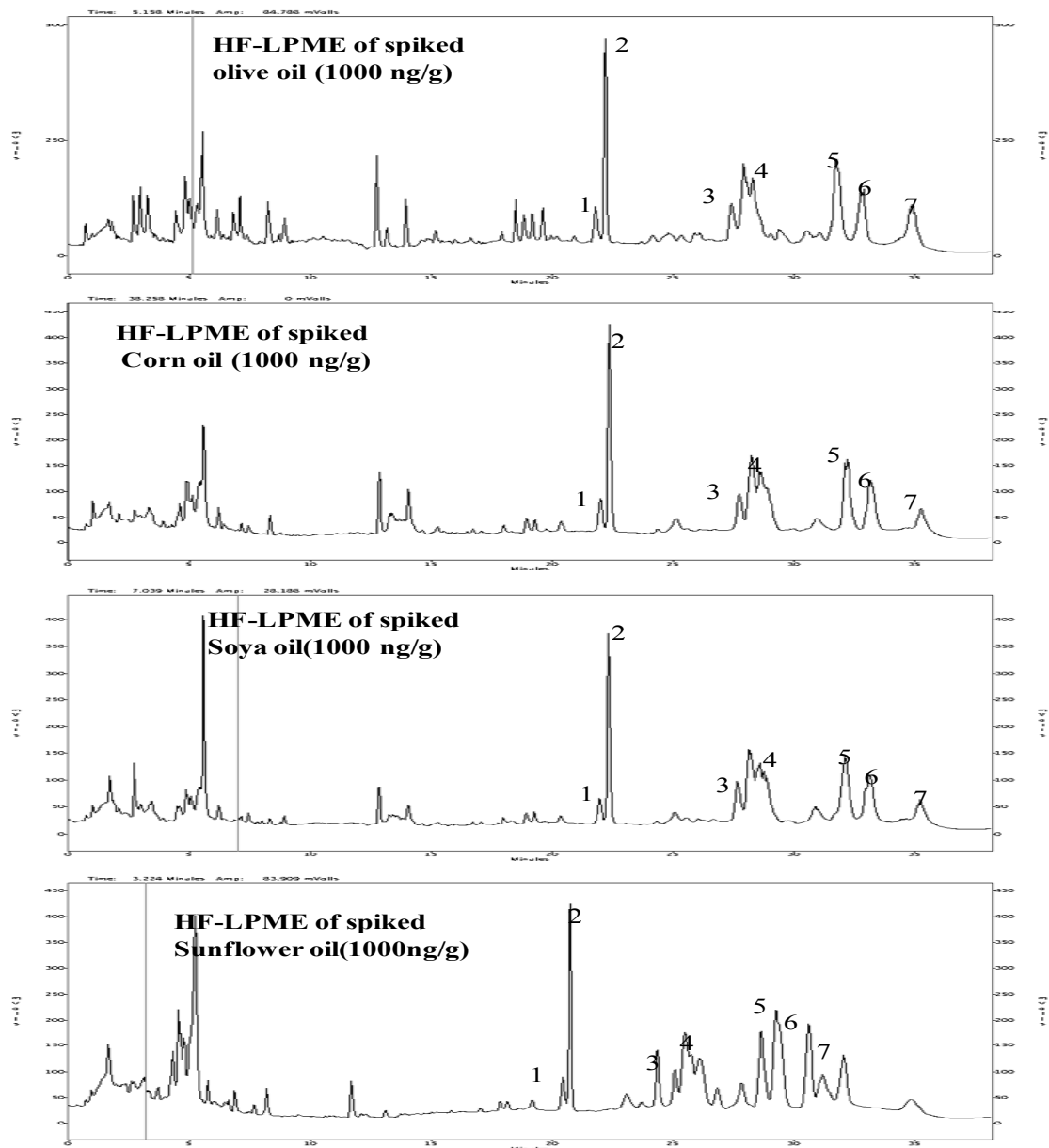
Το διάγραμμα 7 παρουσιάζει τα αποτελέσματα που πρόεκυψαν από την εφαρμογή της προτεινόμενης μεθόδου σε διαφορετικά είδη λαδιών όπως σογιέλαιο ,καλαμποκέλαιο ,ηλιέλαιο και ελαιόλαδο .



Διάγραμμα 7: Έλεγχος επίδρασης μήτρας σε διαφορετικά είδη λαδιού

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι δεν υπήρξε σημαντική επίδραση λόγω διαφορετικής μήτρας για τις περισσότερες από τις ενώσεις που μελετήθηκαν , ενώ είχαμε μια μικρή επίδραση για τις ουσίες fenvalerate (ισομερές 1) και το deltamethrin. Για αυτές τις δύο ενώσεις παρατηρήθηκε μείωση του σήματος σε σύγκριση πάντα με την ανάλυση του ελαιολάδου.

Στα παρακάτω χρωματογραφήματα φαίνονται τα 4 διαφορετικά είδη λαδιών που αναλύθηκαν κατά την διάρκεια του πειράματος :



Πινάκας 7: Ουσίες που αναλύθηκαν κατά την διάρκεια των πειραμάτων .

Ουσίες που αναλύθηκαν	
1	λ-Cyhalothrin (peak 1)
2	λ-Cyhalothrin (peak 2)
3	Cypermethrin (peak 1)
4	Cypermethrin (peak 2)
5	Fenvalerate (peak 1)
6	Fenvalerate (peak 2)
7	Deltamethrin (peak 1)

Στον πίνακα 8 φαίνεται η Σχετική σταθερή απόκλιση που προέκυψε από τις αναλύσεις των διαφόρων δειγμάτων λαδιών. Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας κυμάνθηκαν σε λιγότερο από 10 % για όλες τις υπό μελέτη ενώσεις - πυρεθροειδή.

Πινάκας 8: Σχετική σταθερή απόκλιση που προέκυψε από τις αναλύσεις των διαφόρων δειγμάτων λαδιών

RSD%: Σχετική σταθερή απόκλιση					
	Σογιέλαιο	Καλαμποκ.	Καλαμποκ.(2)	Ηλιέλαιο	Ελαιόλαδο
λ-cyhalothrin peak 1	7.17	4.82	3.08	4.35	4.18
λ-cyhalothrin peak 2	0.91	3.09	2.67	1.29	4.37
cypermethrin peak 1	1.98	1.40	4.74	2.98	1.32
cypermethrin peak 2	1.85	2.50	9.63	7.63	0.45
fenvalerate peak 1	8.05	2.55	2.97	3.26	3.05
fenvalerate peak 2	2.34	0.78	3.67	3.76	0.15
deltamethrin peak 1	4.94	1.87	4.95	2.52	1.06

10.4. Σύγκριση μεθόδων - Συμπεράσματα

Από το 1994 μέχρι και σήμερα έχουν καταγράψει και προταθεί μερικές μέθοδοι ανίχνευσης πυρεθροειδών σε δείγματα λαδιών (πίνακας 9) [41]. Συγκεκριμένα αναφέρονται για την ανίχνευση πυρεθροειδών η Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid-Phase Extraction-SPE) και χρωματογραφία διείσδυσης πηκτωμάτων (Gel Permeation chromatography-GPC). Όσον αφορά την εφαρμογή της μεθόδου HF-LPME σε δείγματα ελαιολάδου, αυτό γίνεται για πρώτη φορά και δεν υπάρχουν στην βιβλιογραφία οποιεσδήποτε αναφορές. Συνεπώς υπάρχει έναν μεγάλο διαθέσιμο πεδίο για περαιτέρω έρευνα στο θέμα της ανίχνευσης πυρεθροειδών στο ελαιόλαδο.

Μια από της μεθόδους που εφαρμόζετε για την ανίχνευση πυρεθροειδών σε δείγματα ελαιολάδου είναι η Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid-Phase Extraction-SPE), η οποία εφαρμόζοταν πριν από την τεχνική της SPME [41,42,44]. Σε σύγκριση με τη HF-LPME, η τεχνική SPE έχει σημαντικά μειονεκτήματα όπως το ότι είναι χρονοβόρα, ακριβή και απαιτεί μεγάλες ποσότητες διαλυτών υψηλής καθαρότητας οι οποίοι είναι ακριβοί καθώς και σε πολλές περιπτώσεις πολύ τοξικοί. Ένα άλλο μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι ότι στο τελικό στάδιο, απαιτείτε μείωση στον όγκο του εκχυλίσματος μέσω εξάτμισης και μπορούν να εισέρθουν μόνο μερικά μικρόλιτρα (μl) στα μηχανήματα διαχωρισμού και ανίχνευσης ρύπων (GC, HPLC). Έτσι σαν αποτέλεσμα αυτού έχουμε όχι μόνο απώλεια των πιο πτητικών ουσιών, αλλά και απώλεια στην ευαισθησία της τεχνικής [41,44].

Επίσης μια άλλη τεχνική που έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση πυρεθροειδών ενώσεων είναι η χρωματογραφία διείσδυσης πηκτωμάτων (Gel Permeation chromatography-GPC), που βασίζετε στη δυνατότητα των μορίων να κινούνται μέσω μιας στήλης πηκτώματος (gel), που έχει καθορισμένο μέγεθος πόρων. Τα μεγάλα μόρια δεν μπορούν να εισέρθουν στους πόρους και σαν αποτέλεσμα είναι να περνούν γρήγορα από την στήλη και να εκχυλίζονται πρώτα.. Τα ελαφρώς μικρότερα μόρια μπορούν να εισέρθουν σε μερικούς πόρους, επομένως παίρνει και περισσότερο χρόνο για να εκχυλιστούν και να διαχωριστούν, ενώ μικρότερα μόρια μπορεί να καθυστερήσουν περισσότερο. Το βασικό μειονέκτημα της τεχνικής GPC σε σύγκριση με την HF-LPME είναι ότι κοστίζουν πολύ ακριβά οι στήλες, είναι πολύ ευαίσθητες στην μόλυνση και συνεπώς με μια μήτρα όπως το ελαιόλαδο απαιτείτε μεγάλη προσοχή και αρκετός χρόνος. Έτσι χρησιμοποιούνται κυρίως στις εφαρμογές όπου οι εναλλακτικές τεχνικές χωρισμού δεν είναι διαθέσιμες, και το δείγμα είναι αρκετά καθαρό [41].

Τέλος μπορούμε να πούμε ότι η μέθοδος HF-LPME έχει την δυνατότητα να εφαρμοστεί σε διαφορετικά είδη λαδιών χωρίς κανένα πρόβλημα, δίνοντας αξιόπιστα και ικανοποιητικά αποτελέσματα, ανιχνεύοντας πυρεθροειδή ενώσεις οι οποίες μέχρι σήμερα δεν ήταν δυνατόν να εντοπιστούν από απλά εργαστήρια, άλλα απαιτούσαν εξειδικευμένο εξοπλισμό. Η τεχνική μικροεκχύλισης HF-LPME αποδεικνύεται ότι είναι μια αποτελεσματική, γρήγορη, χαμηλού κόστους και με πλήθος εφαρμογών τεχνική.

Πινάκας 9: Αναφερόμενες μέθοδοι για την ανίχνευση πυρεθροειδών σε δείγματα ελαιολάδου [41].

Sample	Sample pre-treatment	Sample weight	Pyrethroid	Recovery (%)	LOD (ppb)
Olive oil	Partition (hexane–acetonitrile 1:1)	5 g	Cyhalothrin	84–88	
	Low temperature precipitation		Permethrin	71–74	20–50
	SPE-n-Al ₂ O ₃ /acetonitrile:water		Cypermethrin	80–86	
			Deltamethrin	78–91	
Olive oil	GPC (TSK gel G2000 + G1000 HXL)	7.5 mg	Cyfluthrin	79	40
			Cypermethrin	92	100
			Cyhalothrin	99	30
			Permethrin	98–92	30
Vegetable oil, butter	SPE-graphitised carbon black/acetonitrile	10 mL	Cyhalothrin	96–97	
			Permethrin	94–97	
			Cyfluthrin	95–98	
			Cypermethrin	102–105	
			Deltamethrin	95–105	–

10.5. Μελλοντικές προοπτικές στη χρήση της HF-LPME

Στόχος πάντα της ανάπτυξης μιας μεθόδου είναι η αποτελεσματικότητα, η ικανότητα εφαρμογής της, οι μελλοντικές προοπτικές της και παράλληλα να είναι και συμβατή με τους «νέους κανονισμούς» για προστασία του περιβάλλοντος, που θέλει κάθε χημική δραστηριότητα να είναι σχεδιασμένη έτσι ώστε να μειώνεται ή να εξαλείφεται η χρήση ή η δημιουργία επικίνδυνων ουσιών.

Οι δυνατότητες της HF-LPME στην προσυγκέντρωση των αναλυτών, δεν περιορίζονται μόνο σε δείγματα ελαιολάδου, αλλά δίνετε η δυνατότητα εφαρμογής της σε διάφορα είδη λαδιών, όπως καλαμποκέλαιο, ηλιέλαιο και σογιέλαιο. Επιπρόσθετα η μέθοδος αυτή μελλοντικά θα μπορούσε να δοκιμαστεί για την ανίχνευση και άλλων φυτοπροστατευτικών ενώσεων στο ελαιόλαδο.

Η παρούσα εργασία αποδεικνύει ότι είναι δυνατή η ανίχνευση Πυρεθροειδών σε δείγματα ελαιολάδου με την μέθοδο HF-LPME σε συνδυασμό με τον αέριο χρωματογράφο. Υπάρχει επίσης η δυνατότητα συνδυασμού της μεθόδου και με τον αέριο χρωματογράφο μάζας.

11.Βιβλιογραφία

1. Δικτυακή πύλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης :
(<http://europa.eu/scadplus/leg/el/s04000.htm>)
2. Οδηγός για τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα προϊόντα φυτικής προέλευσης: (<http://www.esyf.gr/newsite/ekdoseis.php?id=34>)
3. Η διαδικασία έγκρισης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην Ευρωπαϊκή Ένωση: (<http://www.esyf.gr/newsite/ekdoseis.php?id=16>)
4. Οδηγός Φυτοπροστασίας:
(<http://www.esyf.gr/newsite/ekdoseis.php?id=23>)
5. Οδηγίες για την ασφαλή και αποτελεσματική χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων: (<http://www.esyf.gr/newsite/ekdoseis.php?id=5>)
6. Pesticide Management Educational Materials:
(pmep.cce.cornell.edu/facts-slides-self/facts/pes-heef-grw85.html)
7. Insecticides and Miticides :
([pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/cadusafos cyromazine/cyromazine/insectprof](http://pmep.cce.cornell.edu/profiles/insect-mite/cadusafos%20cyromazine/cyromazine/insectprof))
8. Agricultural Biotechnology in Europe :
(<http://abeurope.dynamicweb.dk/>)
9. American Chemistry Council:
(http://www.americanchemistry.com/s_acc/sec_topic.asp?CID=87&DID=106)
10. Consultative Group on International Agricultural Research:
(<http://www.cgiar.org/centers/index.html>)
11. Council for Agricultural Science and technology:
(<http://www.cast-science.org/>)
12. United Nations Environment Program: Pyrethroids effects on aquatic and terrestrial ecosystems.
(<http://www.unep.org/Search.asp?cx=007059379654755265211%3Ajkngxjgnyii&cof=FORID%3A11&q=pyrethroids#1114>)
13. Pesticides names and ISO:
(www.alanwood.net/pesticides)
14. Laws and Regulations :
(www.epa.gov/pesticides/regulating/laws.htm)
15. Pesticide Action Network (PAN):
(<http://www.pan-international.org/pan-v1/index.html>)

16. Gas chromatography:
(www.shu.ac.uk/schools/sci/chem/tutorials/chrom/gaschrm.htm)
17. Pesticide Residues in Food :
(http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-e.jsp)
18. Limitations of Available Human Toxicity Data:
(http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity1.html)
19. Pesticide Action Network (PAN) Summary Carcinogen Categories:
(http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity3.html)
20. Endocrine disruptors:
(http://www.pesticideinfo.org/Docs/ref_toxicity5.html)
21. FAOSTAT Agricultural Data:
(<http://www.fao.org/corp/statistics/en/>)
22. Υπουργείο Γεωργίας ,Φυσικών πόρων και Περιβάλλοντος Κύπρου
(http://www.cyprus.gov.cy/moa/agriculture.nsf/agriculture_gr/agriculture_gr?OpenDocument)
23. Παραγωγή Ελαιόλαδου ,Διακρατική Συνεργασία Κύπρου-Ελλάδας, Αρ. Πρωτ.603/37
(http://www.cyprus.gov.cy/moa/agriculture.nsf/agriculture_gr/agriculture_gr)
24. Ελαιόλαδο :
(<http://www.oliveoil.gr/el/index.jsp>)
25. ΕΣΥΦ:
(<http://www.esyf.gr/newsite/>)
26. Γιάννης Πολυράκης ,Περιβαλλοντική Γεωργία , Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο.
27. Ενόργανη Χημική Ανάλυση. Παπαδογιάννης Ν. Ιωάννης, Σαμανίδου Φ. Βικτωρία
Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2001.
28. Pescsok/Shields/Cairns/McWilliam , Σύγχρονες μέθοδοι στην χημική ανάλυση
29. Mester Z, Sturgeon R, Pawliszyn J. Solid phase microextraction as a tool for trace element speciation. Spectrochimica Acta Part B. 2001;56:233-260.
30. Eisert R, Pawliszyn J. New trends in solid-phase microextraction. Critical Reviews in Analytical Chemistry. 1997;27(2):103-135.
31. Psillakis E, Kalogerakis N. Developments in liquid-phase microextraction. Trends in Analytical Chemistry.

32. Charalabaki M, Psillakis E, Mantzavinos D, Kalogerakis N. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in wastewater treatment plant effluents using hollow fibre liquid-phase microextraction
33. D. A. Lambropoulou, E. Psillakis, T. A. Albanis, N. Kalogerakis, 'Single-drop microextraction for the analysis of organophosphorous insecticides in water', *Analytica Chimica Acta*, 516: 205-211, 2004
34. E. Psillakis, N. Kalogerakis, 'Hollow-fiber liquid phase microextraction of phthalate esters from water', *Journal of Chromatography A*, 999: 145-153, 2003
35. D. A. Lamboropoulou, T. A. Albanis, 'Application of hollow fiber liquid phase microextraction for the determination of insecticides in water', *Journal of Chromatography A*, 1072: 55-61, 2005
36. Lentza-Rizos, C.; Avramides, E.J.; Visi, E. Determination of residues of endosulfan and five pyrethroid insecticides in virgin olive oil using gas chromatography with electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, 2001, 921, 297-304.
37. Dimuccio, A.; Ausili, A.; Dommarco, R.; Barbini, D.A.; Santilio, A.; Vergori, F.; Demerulis, G.; Sernicola, L. Solid-matrix partition for separation of organochlorine pesticide-residues from fatty materials.1991. *Journal of Chromatography*, 1991, 552, 241-247.
38. Thaer Barri, Jan-Ake Jonsson ;Advances and developments in membrane extraction for gas chromatography Techniques and applications. *Journal of Chromatography A*, 2001, 921, 297-304.
39. Rasmussen K,E, Pedersen-Bjergaard S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004;23:1-10.
40. Basic Gas Chromatography, Techniques in Analytical Chemistry. McNair H., Miller J. John Wiley & Sons Publication 1998.
41. Francesc A. Esteve-Turrillas, Agustín Pastor, Miguel de la Guardia, Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection, *Analytica Chimica Acta*, Volume 553, 1-2, 50-57
42. Elpiniki G. Amvrazi, Triantafyllos A. Albanis, Pesticide residue assessment in different types of olive oil and preliminary exposure assessment of Greek consumers to the pesticide residues detected, *Food Chemistry*, Volume 113, 2008, 253-261.
43. M. Guardia-Rubio, R.M. Marchal-López, M.J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina, Determination of pesticides in olives by gas chromatography using different detection systems, *Journal of Chromatography A*, Volume 1145, 2007, 195-203

-
44. Juan F. García-Reyes, Carmen Ferrer, M. José Gómez-Ramos, Amadeo R. Fernández-Alba, Juan F. García-Reyes, Antonio Molina-Díaz , Determination of pesticide residues in olive oil and olives, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2007, 239-251
 45. Carmen Ferrer, M. Jose Gómez, Juan F. García-Reyes, Imma Ferrer, E. Michael Thurman, Amadeo R. Fernández-Alba, Determination of pesticide residues in olives and olive oil by matrix solid-phase dispersion followed by gas chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, Volume 1069, 2005,183-194.
 46. A.Di Muccio, A. Ausilli , R. Dommarco, D. Attard Barbini, A. Santilio, F. Vergori,G. De Merulis and L. Sernicola, Solid-matrix partition for separation of organochlorine pesticide residues from fatty materials, Journal of Chromatography, 552 (1991) 241-241.