

**ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ**

**” ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΚΑΙ ΟΡΓΑΝΩΣΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΣΤΗ  
ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ”**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΤΗΣ  
ΟΜΑΔΑΣ ΤΩΝ ΤΡΙΑΖΙΝΩΝ ΣΕ ΑΒΟΚΑΝΤΟ (*Persea americana*) ΜΕ ΣΥΣΤΗΜΑ  
ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΤΡΙΠΛΟΥ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Ντάγκαλη Σταυρούλα

Θεσσαλονίκη 21/12/2020

## ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2020

Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών της ομάδας των τριαζινών σε αβοκάντο (*Persea americana*) με σύστημα υγρής χρωματογραφίας τριπλού τετράπολου.

Ντάγκαλη Σταυρούλα

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων του Διεθνούς Πανεπιστημίου Ελλάδος Θεσσαλονίκης

Ημερομηνία: 21/12/2020

Εισηγητής: Ρήγας Παντελής

©2020

Ντάγκαλη Σταυρούλα

ALL RIGHTS RESERVED

## Ευχαριστίες

*Για την εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Επιβλέποντα καθηγητή μου Ρήγα Παντελή, για την συνεχή καθοδήγηση κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους, και την επισήμανση λαθών μέσα από πολύωρες επικοδομητικές συζητήσεις που έγιναν ώστε να πάρει σάρκα και οστά η παρούσα Διπλωματική Εργασία. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον συνάδελφο Αναγνώστου Νικόλαο ο οποίος με βοήθησε μέσω της επιστημονικής υποστήριξης του αλλά και των γνώσεων του ώστε να γίνει αυτή η εργασία άξια οφθαλμού.*

*Νιώθω επιπλέον υποχρεωμένη έναντι του εργαστηρίου υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων του ΠΚΠΦΠκΦΕ Θεσσαλονίκης, οι οποίοι παρείχαν εκτός από την εκπαίδευση στην υγρή χρωματογραφία, τα αναλώσιμα και τον εργαστηριακό χώρο για την πραγματοποίηση των πειραματικών αναλύσεων, την τεράστια ηθική υποστήριξη τους καθόλη την διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος.*

*Κλείνοντας, ευχαριστώ μέσα από την καρδιά μου την μητέρα μου αλλά και τον σύντροφο μου για την ανοχή και κατανόηση που έδειξαν όλο αυτόν τον καιρό και τους ευγνομονώ που στέκονται σε κάθε βήμα πάντα δίπλα μου.*

## Περίληψη

Το αβοκάντο (*Persea americana*) στην Ελλάδα δεν αποτέλεσε ποτέ κύριο συστατικό ενός Ελληνικού νοικοκυριού λόγω της κυρίαρχης παρουσίας της Μεσογειακής διατροφής. Παρόλα αυτά λόγω της εξέλιξης του διαδικτύου και της εμφάνισης μέσω αυτού νέων τάσεων για μία πιο υγιεινή διατροφή, τα τρία τελευταία χρόνια υπήρξε μια ραγδαία αύξηση της ζήτησης φρούτων αβοκάντο. Πιστεύεται ότι συμβάλλουν στην μείωση εμφάνισης καρκίνων λόγω των καροτενοειδών, των μονοακόρεστων λιπαρών του και της βιταμίνης E. Επίσης συμπράτει στην προστασία του καρδιαγγειακού συστήματος λόγω της μείωσης της αρτηριακής πίεσης και της χοληστερόλης, ενώ παράλληλα προσφέρει υψηλή περιεκτικότητα σε φυτικές ίνες και ωμέγα-9 λιπαρά οξέα. Το θέμα που προέκυψε στην πορεία είναι η μεγάλη διαφοροποίηση της νομοθεσίας που διέπει τις χώρες παραγωγής του, οι οποίες είναι πιο ελαστικές εν αντιθέσει με της Ευρωπαϊκής Ένωσης η οποία έχει απαγορεύσει ρητά την χρήση των ζιζανιοκτόνων των τριαζινών. Η απαγόρευση προέκυψε ύστερα από κλινικές μελέτες της επικινδυνότητας των τριαζινών έπειτα από εμφάνιση καρκίνων, παρεμπόδιση του νευροενδοκρινικού συστήματος, διαταραχές του κύκλου ωορρηξίας και επιπλοκές στην φυσιολογική ιστολογία των όρχεων. Τα προβλήματα υγείας που προέκυψαν παρατίθενται αναλυτικά στην συνέχεια της μελέτης. Η προκατεργασία του δείγματος έγινε με την τροποποιημένη μέθοδο Quechers η οποία είναι ειδικά σχεδιασμένη για το αβοκάντο. Στην μέθοδο αυτή έχει εισαχθεί το βήμα της κατάψυξης για 1,5hr ύστερα από την πρώτη φυγοκέντρηση με σκοπό την απομάκρυνση των λιπαρών συστατικών του αβοκάντο. Για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας – φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS) με τεχνολογία τριπλού τετραπόλου. Η αναλυτική στήλη για τη μέθοδο ήταν Aquacil C18 (50 x 2,1mm, particle size 3µm), και είναι συνδεδεμένη με μία προστήλη Hypercil gold (10 mm x 4mm, particle size 5µm) και μία προστήλη Thermo HyPurity C18 (10 mm x 2.1 mm, particle size 5µm) της Thermo Fisher Scientific. Η θερμοκρασία του θαλάμου στηλών ορίστηκε σε 40°C. Η κινητή φάση A είναι διάλυμα 5µM φορμικού αμμωνίου σε νερό 1L και η κινητή φάση B είναι διάλυμα 5µM φορμικού αμμωνίου σε μεθανόλη 1L. Η ροή της κινητής φάσης είναι 0,5 ml/min. Η διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης είναι 16.5min. Έχει οριστεί ένα πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης το οποίο λειτουργεί από τα 0-3.5 min με διαλύτη 90% A και 10% B, ύστερα από τα 3.5-8min γίνεται γραμμική αύξηση της ισχύος έκλουσης σε 100% B και παραμένει για 2.5min. Στα

10.5-10.6 min το B πέφτει γραμμικώς έως ότου φτάσει το 10 % ενώ το A αυξάνεται γραμμικά έως ότου φτάσει το 90%. Ο φασματογράφος μάζας λειτούργησε με ηλεκτροψεκασμό με θερμοκρασία κώνου τους 350°C και η τάση της βελόνας ψεκασμού είναι στα 3700V, και σε κατάσταση σάρωσης SRM. Από τη μέθοδο ανιχνεύτηκαν 8 τριαζίνες . Οι μεταπτώσεις για την ποσοτικοποίηση και επιβεβαίωση των φυτοφαρμάκων είναι για το ametryn με m/z 228>186, 228>96, atrazine με m/z 216>174, 216>104, cyromazine με m/z 167>85, 167>108, cyanazine με m/z 241>214, 241>104, terbutryn με m/z 242>186, 242>68, terbuthylazine με m/z 230>174, 230>104, pymetrozine με m/z 218>105, 218>78 και simazine με m/z 202>132, 202>124. Το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης είναι τα 10 ppb για όλες τις τριαζίνες ενώ τα κατώτερα όρια ανίχνευσης αυτών ευρέθησαν 1.53 ppb, 0.96 ppb, 4.44 ppb, 2.7 ppb, 1.88 ppb, 1.62 ppb, 1.84 ppb και 2.52 ppb αντίστοιχα με την σειρά που αναφέρονται παραπάνω.

# THESSALONIKI 2020

DETERMINATION OF PESTICIDES RESIDUES OF PLANT PROTECTION COMPOUNDS OF THE TRIAZINE GROUP IN AVOCADO FRUITS (*Persea americana*) BY LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY

Ntagkali Stavroula

Department of Food Science and Technology of the International University of Greece, Thessaloniki

Date : 21/12/ 2020

Rapporteur: Rigas Pantelis

## Abstract

Avocado (*Persea americana*) in Greece has never been the main ingredient of a Greek household due to the predominant presence of the Mediterranean diet. However, due to the evolution of the internet and the emergence through it of new trends for a healthier diet, in the last three years there has been a rapid increase in demand for avocado fruit. It is believed that it helps reducing the incidence of cancer due to carotenoids, its monounsaturated fats and vitamin E. It is also protecting the cardiovascular system due to lowering blood pressure and cholesterol, while also offering a high content of fiber and  $\omega$ -fatty acids. The issue that has been risen along the way is the great differentiation of the legislation governing its producing countries, which is more flexible in contrast to the European Union which has explicitly banned the use of triazine herbicides. The ban came after clinical trials of the risk of triazines following cancer, obstruction of the neuroendocrine system, ovulation disorders and complications in normal testicular histology. The health problems that arose are listed in detail in the continuation of the study. The sample was pre-treated using the modified Quechers method which is specially designed for avocados. The freezing step for 1.5hr after the first centrifugation has been introduced in this method in order to remove the fatty components of the avocado. The liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) method with triple quadrupole technology was used for the analysis. The analytical column for the method was Aquacil C18 (50 x 2.1mm, particle size 3 $\mu$ m), and is connected to a Hypercil gold support (10 mm x 4mm, particle size 5 $\mu$ m) and a Thermo HyPurity C18 support (10 mm x 2.1 mm, particle size 5 $\mu$ m) by Thermo Fisher Scientific. The temperature of the LC column compartment was set at 40°C. Mobile phase A is a solution of 5 $\mu$ M ammonium formate in 1L water and mobile phase B is a 5 $\mu$ M solution of ammonium formate in 1L methanol. The flow of the mobile phase is 0.5 ml/min. The duration of the chromatographic analysis is 16.5min. A gradient elution program has been set which operates from 0-3.5 min with solvent 90% A and 10% B, after 3.5-8min there is a linear increase of the elution strength to 100% B and remains for 2.5min. At 10.5-10.6 min B falls linearly until it



reaches 10% while A increases linearly until it reaches 90%. The mass spectrometer operated by electrospray mode with a cone temperature of 350°C and the voltage of the spray needle is at 3700V, and in SRM scan mode. Eight (8) triazines were detected by the method. The transitions for the quantification and confirmation of pesticides are for ametryn with m / z 228>186, 228>96, atrazine with m/z 216>174, 216>104, cyromazine with m/z 167>85, 167>108 , cyanazine at m/z 241>214, 241>104, terbutryn at m/z 242>186, 242>68, terbuthylazine at m/z 230>174, 230>104, pymetrozine at m / z 218> 105, 218 > 78 and simazine at m / z 202> 132, 202>124. The lower quantification limit is 10 ppb for all triazines while the lower detection limits were 1.53 ppb, 0.96 ppb, 4.44 ppb, 2.7 ppb, 1.88 ppb, 1.62 ppb, 1.84 ppb and 2.52 ppb respectively in the order mentioned above.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

### ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Εισαγωγή</b> .....	<b>1</b>
<b>Κεφάλαιο 1</b> .....	<b>3</b>
<b>1.1 Νομοθετικό Πλαίσιο που διέπει την χρήση φυτοφαρμάκων</b> .....	<b>3</b>
<b>1.2 Μέθοδοι εκτίμησης των κινδύνων ύστερα από λήψη υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων.</b> .....	<b>5</b>
<b>1.3 Σύντομη ιστορική Αναδρομή</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Κατηγορίες τριαζινών</b> .....	<b>9</b>
<b>1.5 Τρόπος δράσης των ζιζανιοκτόνων των τριαζινών</b> .....	<b>26</b>
<b>1.6 Τοξικότητα των τριαζινών</b> .....	<b>27</b>
1.6.1 Σχηματισμός όγκων .....	28
1.6.2 Νευροενδοκρινικό σύστημα .....	29
1.6.3 Κύκλος ωορρηξίας .....	29
1.6.4 Ιστολογία όρχεων. Μείωση και ανωμαλία σπερματοζωαρίων .....	30
<b>1.7 Αποδόμηση των τριαζινών</b> .....	<b>32</b>
1.7.1 Έδαφος.....	32
1.7.2 Βιο-αποδόμηση τριαζινών στο έδαφος .....	33
1.7.3 Μη βιολογική αποδόμηση των τριαζινών .....	33
1.7.3.1 Υδρόλυση .....	33
1.7.3.1.1 Έδαφος .....	33
1.7.3.1.2 Νερό .....	34
1.7.4 Φωτόλυση .....	35
<b>Κεφάλαιο 2</b> .....	<b>36</b>
<b>Πολυυπολειμματικές μέθοδοι εκχύλισης</b> .....	<b>36</b>
2.1 Ολλανδική μέθοδος.....	36
2.2 QUECHERS.....	38
<b>Κεφάλαιο 3</b> .....	<b>41</b>
<b>Υγρή-Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματογραφία Μάζας</b>	<b>41</b>
<b>3.1 Δημιουργία ιόντων</b> .....	<b>44</b>
3.1.1 Ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων .....	44
3.1.2 Χημικός ιονισμός .....	45

3.1.2.1 Θετικός χημικός ιονισμός .....	46
3.1.2.2 Αρνητικός χημικός ιονισμός .....	47
3.1.3 Ιονισμός με ψεκασμό ηλεκτρονίων ( Electron spray Ionisation - ESI) .....	47
3.1.4 Χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric pressure chemical ionization - APCI) .....	48
3.1.5 Φωτοϊοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photo-ionization - APPI) .....	48
<b>3.2 Αναλυτής μάζας .....</b>	<b>49</b>
3.2.1 Τετραπολικός αναλυτής μάζας (Quadrupole).....	49
3.2.2 Αναλυτές χρόνου πτήσης (Time Of Flight) .....	50
3.2.3 Παγίδας ιόντων (Ion Trap).....	51
3.2.4 Αναλυτές μαγνητικού τομέα .....	52
<b>3.3 Ανιχνευτές .....</b>	<b>53</b>
3.3.1 Ηλεκτροπολλαπλασιαστής.....	53
3.3.2 Ανιχνευτής κυπέλλου Faraday .....	54
3.3.3 Ανιχνευτής Daly .....	54
3.3.4 Φωτοπολλαπλασιαστής.....	55
<b>Εικόνα 7: Διάταξη φωτοπολλαπλασιαστή (69) .....</b>	<b>55</b>
<b>3.4 Τεχνικές ανάλυσης στην φασματομετρία μαζών .....</b>	<b>56</b>
3.4.1 Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan).....	56
3.4.2 Τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ενός ιόντος ( Single Ion Monitoring).....	56
3.4.3 Φασματοσκοπία μάζας σε σειρά (Tandem mass spectroscopy) .....	57
<b>Κεφάλαιο 4 .....</b>	<b>59</b>
<b>Ειδικό μέρος .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1 Μεθοδολογία εκχύλισης .....</b>	<b>59</b>
<b>4.2 Εξοπλισμός και Αντιδραστήρια .....</b>	<b>60</b>
<b>4.3 Χρωματογραφική ανάλυση .....</b>	<b>63</b>
4.4.1 Μήτρα δείγματος .....	65
4.4.2 Ταυτοποίηση ένωσης .....	68
4.4.3 Όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (Limit of quantification-LOQ) .....	73
4.4.4 Όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Limit of detection-LOD).....	73
4.4.5 Γραμμικότητα .....	75
4.4.6 Ακρίβεια.....	85
4.4.6.1. Επαναληψιμότητα .....	86

4.4.6.2 Αναπαραγωγιμότητα .....	95
4.4.7 Αβεβαιότητα .....	107
<b>4.5 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός άγνωστων δειγμάτων ..</b>	<b>114</b>
<b>5. Συμπεράσματα .....</b>	<b>119</b>
<b>6. Μελλοντική έρευνα .....</b>	<b>121</b>
<b>7. Βιβλιογραφία.....</b>	<b>122</b>

## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ**

Εικόνα 1: Διάταξη τετραπολικού αναλυτή μάζας (64) .....	49
Εικόνα 2: Διάταξη αναλυτή χρόνου πτήσης (65) .....	50
Εικόνα 3: Διάταξη παγίδας ιόντων (66) .....	51
Εικόνα 4: Διάταξη αναλυτή μαγνητικού τομέα (67).....	52
Εικόνα 5: Διάταξη ηλεκτρονοπολλαπλασιαστή (40).....	53
Εικόνα 6: Διάταξη ανιχνευτή κυπέλλου Faraday (68).....	54
Εικόνα 7: Διάταξη φωτοπολλαπλασιαστή (69) .....	55

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1. Θανατηφόρου δόσης χορήγησης τριαζινών ανάλογα με τον τρόπο πρόσληψης .....	7
Πίνακας 2. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Ametryn.....	11
Πίνακας 3. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Atrazine.....	13
Πίνακας 4. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Cyromazine	15
Πίνακας 5. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Cyanazine ..	17
Πίνακας 6. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Terbutryn....	19
Πίνακας 7. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Terbutylazine .....	21
Πίνακας 8. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Pymetrozine	23
Πίνακας 9. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Simazine ....	25
Πίνακας 10. Πίνακας συνθηκών MS .....	66
Πίνακας 11. Χρόνοι κατακράτησης, μητρικά ιόντα και θυγατρικά ιόντα στην μελέτη των τριαζινών. ....	69
Πίνακας 12. Όρια ανίχνευσης της μεθόδου στην μελέτη των τριαζινών.....	74
Πίνακας 13. Όγκος σε μl που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς.....	75
Πίνακας 14. Συγκεντρωτικός πίνακας του εμβადού κορυφής των πρότυπων ουσιών των τριαζινών. ....	84
Πίνακας 15. Εξισώσεις παλινδρόμησης της ευθείας της πρότυπης καμπύλης σε εκχύλισμα αβοκάντο και ο συντελεστής συσχέτισης .....	85
Πίνακας 16. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 10 ppb.....	91
Πίνακας 17. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 500 ppb....	93
Πίνακας 18. Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε .....	104
Πίνακας 19. Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 100 ppb..	105
Πίνακας 20. Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 500 ppb..	106
Πίνακας 21. Σχετική τυπική αβεβαιότητα καμπυλών αναφοράς των τριαζινών ....	108
Πίνακας 22. Σχετική τυπική αβεβαιότητα λόγω αναπαραγωγιμότητας .....	109
Πίνακας 23. Τυπική και σχετική τυπική αβεβαιότητα όγκου διακριβωμένου εξοπλισμού του εργαστηρίου.....	111
Πίνακας 24. Σχετική τυπική αβεβαιότητα μάζας διακριβωμένου εξοπλισμού του εργαστηρίου .....	112
Πίνακας 25. Διευρυμένη αβεβαιότητα φυτοφαρμάκων .....	113

## ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

---

LC	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry	Υγρή Χρωματογραφία με Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας
ESI	ElectroSpray Ionization	Ιονισμός με Ηλεκτροψεκασμό
SRM	Selected Reaction Monitoring	Παρακολούθηση Επιλεγμένης Αντίδρασης
MRL	Maximum residue level	Ανώτατα όρια υπολειμμάτων
RL	Reporting Level	Όριο αναφοράς
ADI	Acceptable daily intake	Αποδεκτή ημερήσια λήψη
LOD	Limit of Detection	Κατώτερο Όριο Ανίχνευσης
LOQ	Limit of Quantitation	Κατώτερο Όριο Ποσοτικοποίησης
RSD	Relative Standard Deviation	Σχετική Τυπική Απόκλιση
ACN	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
LogK <sub>ow</sub>	Octanol/water partition coefficient	Συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού
K <sub>oc</sub>	Soil adsorption coefficient	Συντελεστής ρόφησης εδάφους
pKa	Acid dissociation constant	Σταθερά οξύτητας
LC <sub>50</sub>	Lethal concentration 50%	Η μέγιστη συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας στο εξωτερικό περιβάλλον των πειραματόζωων. στην οποία αναμένεται να θανατωθεί το 50% του πληθυσμού
LD <sub>50</sub>	Lethal Dose 50%	Η εφάπαξ δόση μίας χημικής ουσίας στην οποία αναμένεται να θανατωθεί το 50% των πειραματόζωων
NOAEL	No observed adverse effect level	Επίπεδο με μη παρατηρούμενη δυσμενή επίπτωση

PSA	primary secondary amine	Υδροξείδιο του νατρίου
SIM	Single ion monitoring	Επιλεκτική παρακολούθηση ιόντων
TIC	Total ion chromatograph	Ολικό χρωματογράφημα ιόντων
LOAEL	Lowest observed adverse effect level	Χαμηλότερο επίπεδο με παρατηρούμενη δυσμενή επίπτωση
FS	Full scan	Τεχνική πλήρους σάρωσης
MS/MS	Tandem Mass Spectrometry	Φασματοσκοπία μάζας σε σειρά
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate	Κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη
GnHR	Gonadotropin	Γοναδοτροπίνη
LH	Luteinizing hormone	Λουτροπίνη
PRL	Prolactin	Προλακτίνη
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	Χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης
EI	Electron impact	πρόσκρουση ηλεκτρονίων
APPI	Atmospheric Pressure Photo-ionization	Φωτοϊονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης
ΠΚΠΦΠκΦΕ		Περιφερειακά Κέντρα Προστασίας Φυτών, Ποιοτικού και Φυτοϋγειονομικού Ελέγχου
dSPE	Dispersive solid phase extraction	Εκχύλιση στερεάς φάσης με την τεχνική της διασποράς

## Εισαγωγή

---

Τα τελευταία χρόνια ο τομέας της επιστήμης της φυτοπροστασίας έχει κάνει τεράστια άλματα προόδου ως προς την αντιμετώπιση των εχθρών και ασθενειών των καλλιεργούμενων φυτών. Οι θετικές επιδράσεις των εφευρισκόμενων φυτοπροστατευτικών προϊόντων φάνηκαν απευθείας, αλλά ουδέν καλό αμιγές κακού. Όλος ο επιστημονικός κόσμος γνωρίζει ότι οτιδήποτε είναι τεχνητό έχει και παρενέργειες, και ότι τίποτα δεν είναι τόσο αθώο όσο εμφανίζεται. Για αυτόν τον λόγο σήμαναν το κώδωνα του κινδύνου και ξεκίνησαν οι μελέτες στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ώστε να ανευρεθεί ένα τρόπο, στον οποίο να απολαμβάνονται τα οφέλη αυτών αλλά ταυτόχρονα να προστατεύεται η υγεία του ανθρώπου. Με την πάροδο των χρόνων οι μελέτες άρχισαν να εμφανίζουν τα πρώτα τους αποτελέσματα. Προέκυψαν σοβαρές επιπτώσεις της χρήσεως των χημικών αυτών ενώσεων στην φυσιολογική λειτουργία ενός οργανισμού. Οι κλινικές μελέτες απέδειξαν ότι υπάρχουν σοβαρές επιπτώσεις στην υγεία όλων των έμβιων οργανισμών που μπορούν να αποβούν ακόμη και μοιραίες για τον ίδιο ή ακόμη και στις επόμενες γενεές (τερατογενέσεις κ.α.). Παρόλα αυτά η στάση των παραγωγών όσον αφορά την χρήση τους έχει παραμείνει ίδια. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε στην έλλειψη πληροφόρησης για τις παρενέργειες των φυτοφαρμάκων στο καταναλωτικό κοινό, και ακόμη και στους ίδιους την ώρα που γίνεται το ράντισμα, είτε μπορεί να οφείλεται στην άγνοια του κινδύνου ή και την αδιαφορία απέναντι στην ισχύουσα νομοθεσία. Ακόμη νέοι παραγωγοί που δεν μπορούν να χρησιμοποιήσουν την δικαιολογία της άγνοιας ξέροντας να χρησιμοποιούν και να ενημερώνονται μέσω του διαδικτύου, φαίνεται να γνωρίζουν τον ελλοχεύοντα κίνδυνο αλλά λειτουργούν σκεπτόμενοι μόνο για το κέρδος που θα επιφέρει η χρήση αυτών. Η παραπάνω ανάγκη έχει προωθήσει, την εύρεση νέων μεθόδων ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων αλλά και ποσοτικοποίησης αυτών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις.



Στην παρούσα εργασία πραγματοποιείται η επικύρωση της μεθόδου Quechers σε ιστό αβοκάντο με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας (LC-MS/MS) με αναλυτή μαζών τριπλού τετραπόλου, με σκοπό την ταυτόχρονη ανάλυση των οκτώ τριαζινών. Σκοπός είναι η ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση τους. Για την εγκυρότητα της μεθόδου πραγματοποιήθηκε έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου, του μέσου εύρους των ανακτήσεων, η γραμμικότητα, και ο υπολογισμός του κατώτερου ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης LOD και LOQ, αντίστοιχα. Τέλος υπολογίστηκε η διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα της κάθε τριαζίνης που βρισκόταν υπό έλεγχο.

# Κεφάλαιο 1

---

## 1.1 Νομοθετικό Πλαίσιο που διέπει την χρήση φυτοφαρμάκων

Ενας από τους συνηθέστερους τρόπους καταπολέμησης των εχθρών των φυτών και προφύλαξης των προϊόντων αυτών είναι η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Σύμφωνα με την Οδηγία 91/414 της Ε.Ε., ως **υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων** ορίζονται <<μία ή περισσότερες ουσίες, παρούσες εντός ή επί των φυτών ή των προϊόντων φυτικής προέλευσης, των βρώσιμων προϊόντων ζωικής προέλευσης ή αλλού στο περιβάλλον, προερχόμενες από τη χρήση φυτοπροστατευτικού προϊόντος περιλαμβανομένων των μεταβολιτών τους και των προϊόντων που προέρχονται από την αποικοδόμηση ή την αντίδρασή τους>>. Ωστόσο δυνητικός κίνδυνος μπορεί να προκληθεί και από την παρουσία υπολειμμάτων αυτών των χημικών ουσιών πάνω στα προϊόντα, στα υπόγεια ύδατα, στα ζώα που μπορεί να διατρέφονται από αυτά και γενικότερα σε όλη την διατροφική αλυσίδα. Για αυτόν τον λόγο δίνεται προτεραιότητα στην διασφάλιση της δημόσιας υγείας και της προστασίας του καταναλωτή και έτσι έχουν θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση όρια τα οποία πρέπει να τηρούνται αυστηρά από όλα τα κράτη μέλη.

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση το πρώτο βήμα είναι ο προσδιορισμός του **NOAEL** (επίπεδο με μη παρατηρούμενη δυσμενή επίπτωση). Πρόκειται για το υψηλότερο επίπεδο συνεχούς έκθεσης σε μια χημική ουσία το οποίο δεν προκαλεί καμία σημαντική δυσμενή επίπτωση στην μορφολογία, βιοχημεία, λειτουργική ικανότητα, ανάπτυξη και διάρκεια ζωής των στοχευόμενων ειδών των τοξικολογικών μελετών (1). Για την εξόρυξη της τιμής του NAOEL χρησιμοποιούνται πειραματόζωα συνήθως αρουραίου όπου τους δίνονται γνωστές δόσεις καθημερινώς του υπό μελέτη τοξικού. Τα πειραματόζωα στην συνέχεια θανατώνονται ώστε να μελετηθούν οι τυχόν επιδράσεις στα όργανά τους (2). Αντιστοίχως υπολογίζεται και το **LOAEL** (χαμηλότερο επίπεδο με παρατηρούμενη δυσμενή επίπτωση) το οποίο αφορά την μικρότερη συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας που εάν δοθεί, προκαλεί δυσμενείς επιπτώσεις.

Το δεύτερο βήμα που καλείται να κάνει είναι ο προσδιορισμός της αποδεκτής ημερήσιας δόσης (**ADI - acceptable daily intake**), η οποία ορίζεται ως η κατ' εκτίμηση ποσότητα της ουσίας στην τροφή, εκφραζόμενη βάσει του σωματικού βάρους, η οποία μπορεί να προσλαμβάνεται ημερησίως σε όλη τη διάρκεια της ζωής, χωρίς αξιόλογο κίνδυνο για οποιονδήποτε καταναλωτή βάσει όλων των γνωστών κατά τη στιγμή της αξιολόγησης στοιχείων, λαμβανομένων υπόψη των ομάδων του πληθυσμού που είναι ευάλωτες (π.χ. παιδιά και έμβρυα) (4) . Η **ADI** είναι αποτέλεσμα του στοιχείου που θα προκύψει από το **NOAEL** στο οποίο γίνεται χρήση ενός συντελεστή ασφαλείας και έτσι είναι δυνατή η επέκταση στον άνθρωπο (2).

Τέλος, και ύστερα από τον υπολογισμό των δύο παραπάνω εννοιών ,η Επιτροπή των Ευρωπαϊκών Κοινοτήτων έχει αναλάβει την θέσπιση κοινοτικών ανώτατων ορίων υπολειμμάτων (**MRLs - Maximum Residue Levels**). Τα **MRLs** είναι οι μέγιστες συγκεντρώσεις φυτοπροστατευτικών προϊόντων που μέχρι αυτό το όριο που έχει θεσπιστεί, είναι αποδεκτό να παραμείνουν ως υπόλειμματα γεωργικών φαρμάκων στα γεωργικά προϊόντα χωρίς να υπάρξουν κυρώσεις στον παραγωγό (3).

Για γεωργικά φάρμακα τα οποία δεν είναι εγκεκριμένα για χρήση εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης σαν μέγιστο όριο υπολειμμάτων ορίζεται το όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου (**LOD - Limit of Detection**). Ως όριο ανίχνευσης της αναλυτικής μεθόδου νοείται η επικυρωμένη κατώτατη περιεκτικότητα σε ουσία που μπορεί να ανιχνευθεί, να ταυτοποιηθεί και να προσδιορισθεί ποσοτικώς σε ένα δείγμα (5).

## 1.2 Μέθοδοι εκτίμησης των κινδύνων ύστερα από λήψη υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Ο βαθμός τοξικότητας ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος εξαρτάται από την φύση της χημικής ουσίας, της οδού εκθέσεως (δια στόματος, δέρματος και βλεννογόνου), της δόσης, της διάρκειας έκθεσης και τέλος της μορφολογικής και φυσιολογικής κατάστασης του οργανισμού.

Ανάλογα με το χρονικό διάστημα που χρειάζεται να επέλθουν οι δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου η τοξικότητα χωρίζεται σε οξεία τοξικότητα και χρόνια τοξικότητα. Η οξεία τοξικότητα αναφέρεται στην επίδραση στον οργανισμό είτε μίας εφάπαξ δόσης μιας χημικής ουσίας, είτε μέσω της επανειλημμένης έκθεσης σε αυτήν σε σύντομο χρονικό διάστημα. Αντιθέτως η χρόνια τοξικότητα αναφέρεται στις μακροπρόθεσμες επιπτώσεις, μέσω επαναλαμβανόμενων εκθέσεων των χαμηλότερων επιπέδων σε μία χημική ουσία. Τα αποτελέσματα της χρόνιας έκθεσης δεν εμφανίζονται αμέσως αλλά δρουν συσσωρευτικά. Παραδείγματα χρόνιας τοξικότητας είναι η καρκινογένεση, η τερατογένεση, η αλλεργιογένεση, η ογκογένεση, οι αναπαραγωγικές διαταραχές και οι νευρολογικές και ηπατικές βλάβες (1).

Για να βρεθεί η τιμή αναφοράς της οξείας τοξικότητας των γεωργικών φαρμάκων υπολογίζονται δύο όροι: το **LD<sub>50</sub>** και το **LC<sub>50</sub>**. Ο όρος LD<sub>50</sub> εκφράζεται ως η εφάπαξ δόση μιας ουσίας ανά μονάδα σωματικού βάρους του οργανισμού που μελετάται, που έχει την δυνατότητα να θανατώσει το 50% ενός γενετικά ομοιογενούς πληθυσμού των πειραματόζωων κάτω από προκαθορισμένες συνθήκες. Οι τιμές του εκφράζονται ως mg χημικής ουσίας ανά χιλιόγραμμο σωματικού βάρους. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε περίπτωση που αλλάξει η οδός έκθεσης της ουσίας στον οργανισμό ( πχ χορήγηση δια στόματος σε δερματική επαφή) τότε το LD<sub>50</sub> μπορεί να διαφέρει. Το LD<sub>50</sub> παρέχει μια μονάδα μέτρησης της οξείας τοξικότητας μιας χημικής ουσίας αλλά αυτό αλλάζει ανάλογα με το ζώο, την οδό έκθεσης, το φύλο, την φυσιολογική κατάσταση και την ηλικιακή ομάδα των πειραματόζωων που μελετούνται.

Αλλαγή οποιασδήποτε μεταβλητής μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετική τιμή. Ο όρος  $LC_{50}$  είναι η συγκέντρωση ενός χημικού που βρίσκεται στο εξωτερικό περιβάλλον του πειραματόζωου (νερό, αέρας) το οποίο μπορεί να προκαλέσει θνησιμότητα του 50% ενός γενετικά ομοιογενούς πληθυσμού δοκιμής. Το  $LC_{50}$  εκφράζεται ως mg χημικής ουσίας ανά κυβικό μέτρο (1).

Στην περίπτωση της ομάδας των τριαζινών, γενικώς έχουν χαμηλή οξεία τοξικότητα για τα πτηνά και τα θηλαστικά, ωστόσο ορισμένα είδη είναι άκρως ευάλωτα σε αυτά, π.χ. η θανατηφόρος δόση σε πρόβατο με simazine είναι 500-1400 mg/kg ενώ στα ποντίκια είναι μεγαλύτερη από 5000 mg/kg. Πληροφορίες διαφόρων ειδών σε μερικές τριαζίνες φαίνονται στον πίνακα 1.1.

Πίνακας 1. Θανατηφόρου δόσης χορήγησης τριαζινών ανάλογα με τον τρόπο πρόσληψης

(B.A. : 6,7,8,9,10)

Όνομα	LD <sub>50</sub> mg/kg δια στόματος (αρουραίοι)	LD <sub>50</sub> mg/kg δια στόματος (άλλα είδη)	Lc <sub>50</sub> mg/l,αέρας (αρουραίοι)	LD <sub>50</sub> mg/kg δια δέρματος
Ametryn	1160	>5620 (πάπιες, ορτύκια)	Για 4h >5.17	>2020 (Κουνέλια)
Atrazine	1869-3090	1332-3992 (Ποντίκια)	Για 4h >5.8	>3100 (αρουραίοι)
Cyanazine	182-334	141 (Κουνέλια)	Για 4h >2.46	>2000 (Κουνέλια)
Cyromazine	>3000	1467 (Κουνέλια)	Για 4h >2	>3000 (αρουραίοι)
Pymetrozine	5890	>2000 (πάπιες, ορτύκια)	Για 4h >1.800	>2000 (αρουραίοι)
Simazine	500-10000	>5000 ποντίκια	Για 4h >5,5	>2000 (αρουραίοι)
Terbutylazine	1590->2000	>1000 (πάπιες, ορτύκια)	Για 4h >5,3	>2000 (αρουραίοι)
Terbutryn	2000-2980	3880 (Ποντίκια)	Για 4h >8	>2000 (Κουνέλια)

### 1.3 Σύντομη ιστορική Αναδρομή

Τα ζιζανιοκτόνα των τριαζινών ανακαλύφθηκαν στα εργαστήρια της J. R. Geigy με έδρα την Βασιλεία της Ελβετίας. Η διερεύνηση των συμμετρικών τριαζινών ως πιθανά ζιζανιοκτόνα ξεκίνησε το 1950. Μετα την σύνθεση τους δοκιμάστηκαν πολλοί εκπρόσωποι των τριαζινών κατέληξαν ότι καμία από τις πρώτες υποκατεστημένες 4,6-διακλυλαμινο-3-τριαζίνες δεν επέδειξε την επιθυμητή ζιζανιοκτόνο δράση , έως ότου το 1952 ανακαλύφθηκε η 6-χλωρο-N-N'-διεθυλο, γνωστή και ως σιμαζίνη. Η δραστηριότητα αλλά και η εκλεκτικότητα η οποία είχε, οδήγησαν στην ανάπτυξη πολλών νέων τριαζινών με παρόμοια με αυτήν δομή. Στις 6 Αυγούστου του 1954 απονεμήθηκε το ελβετικό δίπλωμα ευρεσιτεχνίας και τα πρώτα προϊόντα διατέθηκαν στην αγορά το 1956 αφού έγινε η έγκριση της σιμαζίνης από τις ομοσπονδιακές αρχές της Ελβετίας . Στην αρχή η έγκριση περιλάμβανε την χρήση της μόνο σε σιδηροδρομικές γραμμές, δρόμους και πεζοδρόμια, αλλά μετά από μελέτες που έγιναν καθιερώθηκε και η χρήση της σε καλαμπόκια, αμπέλια αλλά και σπαράγγια. Δύο χρόνια αργότερα από την έγκριση της simazine δηλαδή το 1958, εισήχθη στην αγορά η atrazine η οποία χρησιμοποιήθηκε κατα πλείστον για την καταπολέμηση των ζιζανίων στις σιδηροδρομικές γραμμές, σε δρόμους και πεζοδρόμια αλλά και στην παραγωγή καλαμποκιού στην Ευρώπη (11,12).

Μετά την αρχική ανακάλυψη από την Geigy των δύο παραπάνω χλωροτριαζινών, μελετήθηκαν και αναπτύχθηκαν αρκετές επιπλέον χλωροτριαζίνες και άλλες κατηγορίες ζιζανιοκτόνων τριαζίνης όπως οι μεθοξυτριαζίνες, οι μεθυλοθειοτριαζίνες και οι ασύμμετρες τριαζίνες. Η χρήση των τριαζινών έφερε μια καινούργια εποχή για τον προφυτρωτικό έλεγχο των ζιζανίων λόγω του χαμηλού τους κόστους, της ευελιξίας στο χρονοδιάγραμμα εφαρμογής αλλά και της κάλυψης ενός μεγάλου φάσματος ζιζανίων και αυτό οδήγησε να γίνουν γρήγορα σπουδαία εργαλεία στα χέρια των αγροτών.

Για τους παραπάνω λόγους η ζήτηση των τριαζινών εκτοξεύθηκε και ιδρύθηκε ένα εργοστάσιο παραγωγής στο McIntosh της Αλαμπάμα το 1959. Μικρότερες μονάδες παραγωγής λειτουργούσαν στο Μεξικό, τη Βραζιλία και Ιταλία. Το 1970 κατασκευάστηκε μία μονάδα συνεχούς παραγωγής από την Geigy Agricultural Chemicals στις Ηνωμένες Πολιτείες (11,12).

## 1.4 Κατηγορίες τριαζινών

Οι τριαζίνες είναι ενώσεις που περιέχουν έναν εξαμελή ετεροκυκλικό δακτύλιο με τρία άτομα αζώτου. Όταν τα άτομα αζώτου είναι εναλλασσόμενα με τα άτομα του άνθρακα του δακτυλίου ονομάζονται συμμετρικές τριαζίνες ενώ όταν δεν εναλλάσσονται καλούνται ασύμμετρες. Οι συμμετρικές τριαζίνες πολλές φορές καλούνται και ως διάμινο-s-τριαζίνες γιατί στα δύο άτομα του άνθρακα που βρίσκονται στις θέσεις 4 και 6 του αρωματικού δακτυλίου φέρουν αλκυλο-αμινο-υποκαταστάτες. Ο υποκαταστάτης που βρίσκεται στην θέση 2 του αρωματικού δακτυλίου ορίζει την υποομάδα στην οποία θα ενταχθεί η χημική ένωση, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του μορίου αλλά και την κατάληξη που θα δοθεί στο όνομα της τριαζίνης. Οι τριαζίνες υποδιαιρούνται σε τρεις κύριες υποομάδες ανάλογα με τον υποκαταστάτη της θέσης 2 του αρωματικού δακτυλίου και αυτές είναι: οι μεθυλοθειοτριαζίνες με υποκαταστάτη μια μεθυλοθειομάδα (-SCH<sub>3</sub>), οι χλωροτριαζίνες με υποκαταστάτη χλώριο (Cl) και τις μεθοξυτριαζίνες με υποκαταστάτη μια μεθοξυομάδα (-OCH<sub>3</sub>). Όσον αφορά την διαμόρφωση του ονόματος ανάλογα με τον υποκαταστάτη της θέσης 2, οι μεθυλοθειοτριαζίνες έχουν κατάληξη -tryn, οι χλωροτριαζίνες έχουν κατάληξη -azine, και οι μεθοξυτριαζίνες έχουν κατάληξη -ton (13).

Στην υποομάδα των χλωροτριαζινών ανήκουν οι ενώσεις atrazine, simazine, terbuthylazine, propazine, cyanazine και trietazine. Στην υποομάδα των μεθυλοθειοτριαζινών ανήκουν οι ενώσεις ametryn, terbutryn, simetryn, prometryn, dimethametryn, dipropetryn και methoprotryne. Τέλος στην τελευταία υποομάδα των τριαζινών είναι οι μεθοξυτριαζίνες στην οποία ανήκουν οι ενώσεις prometon, secbumeton και terbumeton (13).



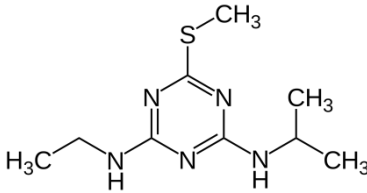
### **1.4.1 Ametryn** (AMESIP,AMERTREX)

**Χρήση:** Η ametryn είναι ένα διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο το οποίο αναστέλλει την φωτοσύνθεση και άλλες ενζυματικές διεργασίες. Χρησιμοποιείται για τον έλεγχο πλατύφυλλων ζιζανίων και ετήσιων αγρωστωδών στον ανανά, στα ζαχαρότευτλα ,τις μπανάνες, τα εσπεριδοειδή, τις φυτείες καφέ και τσαγιού, στα κακαόδεντρα, φοινικόδεντρα αλλά και για μη καλλιεργητικές χρήσεις (14). Η ametryn απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες. Μετακινείται ακροπεταλικά διαμέσου των αγγείων του ξυλώματος και συσσωρεύεται στα κορυφαία μεριστώματα (6).

**Περιγραφή:** Η ametryn είναι μια λευκή κρυσταλλική σκόνη. Είναι διαθέσιμη στο εμπόριο ως 80% γαλακτωποιήσιμο συμπύκνωμα, ως ρευστή βρέξιμη σκόνη ή βρέξιμη σκόνη. Παρουσιάστηκε από την εταιρεία J.R. Geigy S.A. ( τωρινή Syngenta AG).(6)

**Σταθερότητα:** Η ametryn είναι σταθερό σε ουδέτερα, ασθενώς όξινα και ασθενώς αλκαλικά μέσα. Υπόκεινται υδρόλυση σε ισχυρώς όξινες (pH=1) και ισχυρώς αλκαλικές (pH=13) συνθήκες σε παράγωγο το οποίο έχει ανενεργή ζιζανιοκτόνο δράση (14).

Πίνακας 2. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Ametryn  
B.A. (6,14)

<b>Κοινό Όνομα</b>	Ametryn
<b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b>	N2 -ethyl- N4- isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4- diamine
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>9</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> S
<b>Μοριακό βάρος</b>	227.32 g/mol
<b>Χημική δομή</b>	
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	200 mg l <sup>-1</sup> (25 °C)
<b>K<sub>oc</sub></b>	100-930
<b>Τάση ατμών</b>	3.7 x 10 <sup>-4</sup> Pa (20 °C)
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	2.63 (pH 7)
<b>pK<sub>a</sub></b>	4.1 (βάση)

Δεν είναι εγκεκριμένη δραστική για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση και έχει μέγιστο όριο υπολειμμάτων για την καλλιέργεια του αβοκάντο τα 10ppb.

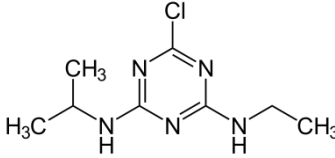
### **1.4.2 Atrazine** ( AATRAM , AATREX)

**Χρήση:** Η ατραζίνη χρησιμοποιείται είτε ως ζιζανιοκτόνο, είτε ως ρυθμιστής της ανάπτυξης των φυτών. Έχει μεγάλη εκλεκτικότητα και εφαρμόζεται προφυτρωτικά ή μεταφυτρωτικά για τον έλεγχο πλατύφυλλων ζιζανίων αλλά και αγρωστωδών σε καλλιέργειες όπως το καλαμπόκι, ο σόργος, το ζαχαροκάλαμο, ο ανανάς, οι ξηροί καρποί, και τα κωνοφόρα. Επίσης χρησιμοποιείται για χημική αγρανάπαυση αλλά και για την καταπολέμηση ζιζανίων σε βιομηχανικές εκτάσεις. Η ατραζίνη απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες. Μετακινείται ακροπεταλλικά διαμέσου των αγγείων του ξυλώματος και συσσωρεύεται στα κορυφαία μεριστώματα (6,14).

**Περιγραφή:** Η ατραζίνη είναι μια λευκή, άοσμη, κρυσταλλική, σε μορφή συμπαγή ή σε σκόνη. Στα εμπορικά σκευάσματα συναντάται επί το πλείστον ως αναμιγμένη ατραζίνη με ένα εύφλεκτο υγρό όπως η μεθανόλη. Παρουσιάστηκε από την εταιρεία J.R. Geigy S.A.( τωρινή Syngenta AG) (6,14).

**Σταθερότητα:** Η ατραζίνη υπόκειται υδρόλυση σε υδροξυτριαζίνη σε όξινα και αλκαλικά υδατικά διαλύματα, ενώ σε διαλύματα με ουδέτερο pH η υδρόλυση είναι ιδιαίτερα αργή (14).

Πίνακας 3. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Atrazine B.A. (6,14)

<b>Κοινό Όνομα</b>	Atrazine
<b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b>	6-chloro-N2,N4-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>
<b>Μοριακό βάρος</b>	215.72 g/mol
<b>Χημική δομή</b>	
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	33 mg l <sup>-1</sup> (22 °C, pH 7)
<b>K<sub>oc</sub></b>	39-155
<b>Τάση ατμών</b>	3 x 10 <sup>-7</sup> Pa (25 °C)
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	2.5 (25°C)
<b>pK<sub>a</sub></b>	1.7

Δεν είναι εγκεκριμένη δραστική για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση και έχει μέγιστο όριο υπολειμμάτων για την καλλιέργεια του αβοκάντο τα 50ppb.

### **1.4.3 Cyromazine** (Armor,Citation)

**Χρήση:** Η Cyromazine είναι ένα επιλεκτικό εντομοκτόνο επαφής που λειτουργεί ως ρυθμιστής της ανάπτυξης των εντόμων. Γίνεται χρήση διαμέσου της τροφής σε στάβλους βοοειδών, αλόγων, χοιροστασίων και πτηνοτροφίων λόγω της ύπαρξης κατάλληλου υποστρώματος για την ανάπτυξη των προνυμφών (κοπριά). Η Cyromazine ελέγχει την ανάπτυξη των προνυμφών των μυγών που αναπτύσσονται μέσα στην κοπριά. Χρησιμοποιείται για τον πεκασμό των φυλλωμάτων λαχανικών, καλλωπιστικών φυτών, πατατών και μανιταριών ώστε να ελεγχθεί ο πληθυσμός του φυλλοδέτη (δίπτερα) (6,15).

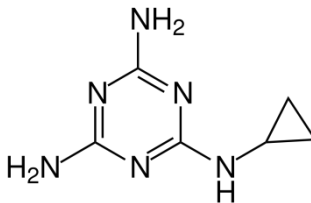
**Τρόπος δράσης του Cyromazine:** Παρεμποδίζει την διαδικασία έκδυσης των προνυμφών και των νυμφών που έχει ως αποτέλεσμα οι προνύμφες, οι νύμφες και τα ενήλικα έντομα να είναι είτε παραμορφωμένα είτε ακόμη και νεκρά. Ο ακριβής τρόπος δράσης παραμένει άγνωστος. Ωστόσο ιστολογικές μελέτες έδειξαν ότι προνύμφες οικιακών μυγών που τους έγινε χορήγηση με cyromazine δεν έδειξαν να έχουν επιδερμικές ανωμαλίες και για αυτόν τον λόγο γίνονται υποθέσεις ότι η χορήγηση της δεν επηρεάζει άμεσα την διαδικασία της έκδυσης αλλά την ορμόνη που ελέγχει την έκδυση και την εναπόθεση της χιτίνης. Τελικά θεωρείται ότι διαταράσσει το μυϊκό σύστημα των προνυμφών και την ορμονική ισορροπία που ελέγχει την ανάπτυξη αλλά ο ακριβής τρόπος δράσης δεν έχει βρεθεί πλήρως (16,17).

**Περιγραφή :** Η Cyromazine έχει χρώμα λευκό προς μπεζ με σύσταση κρυσταλλικό στερεό και με μια ελαφρώς γλυκιά οσμή. Το φυτοφάρμακο είναι διαθέσιμο στο εμπόριο είτε ως υδατοδιαλυτοί κόκκοι ή ως βρέξιμη σκόνη (18). Παρουσιάστηκε από την εταιρεία J.R. Geigy S.A.( τωρινή Syngenta AG) .

**Σταθερότητα :** Η cyromazine είναι σταθερή στην υδρόλυση σε pH 5,7 και 9 στους 70°C μέχρι και για 28 ημέρες (14).

Πίνακας 4. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας,  
Cyromazine

B.A. (16)

<b>Κοινό Όνομα</b>	Cyromazine
<b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b>	2- <i>N</i> -cyclopropyl-1,3,5-triazine-2,4,6-triamine
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>6</sub>
<b>Μοριακό βάρος</b>	166,18 g/mol
<b>Χημική δομή</b>	
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	13 g/L (pH 7.1 κ' 9) (25°C)
<b>K<sub>oc</sub></b>	79-1784
<b>Τάση ατμών</b>	4.48 x 10 <sup>-7</sup> Pa (25 °C)
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	<3
<b>pK<sub>a</sub></b>	5.22 (20 °C)

Είναι εγκεκριμένο για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε ορισμένες καλλιέργειες αλλά δεν περιλαμβάνεται το αβοκάντο, και έχει μέγιστο όριο υπολειμμάτων για την καλλιέργεια του αβοκάντο τα 50 ppb.

#### **1.4.4 Cyanazine** (BLADEX, CYNEX)

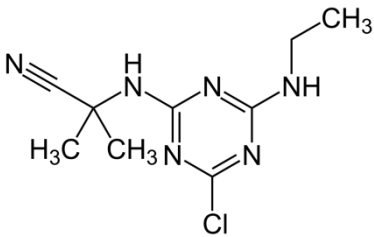
**Χρήση:** Η Cyanazine είναι ζιζανιοκτόνο το οποίο χρησιμοποιείται προφυτρωτικά ή μεταφυτρωτικά για τον έλεγχο ετήσιων αγροστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων. Κατά το πλείστον χρησιμοποιείται προφυτρωτικά στις καλλιέργειες καλαμποκιού, βαμβακιού και πατάτας για τον έλεγχο πλατύφυλλων ζιζανίων. Επίσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μη καλλιεργήσιμες εκτάσεις για την καταπολέμηση ζιζανίων. Η Cyanazine απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες, μετακινείται ακροπεταλλικά διαμέσου των αγγείων του ξυλώματος και συσσωρεύεται στα κορυφαία μεριστώματα (6,14).

**Περιγραφή:** Η Cyanazine είναι διαθέσιμη ως βρέξιμη σκόνη, ρευστό αιώρημα, ή κόκκους. Το χρώμα της είναι υπόλευκο προς αχυρόχρωμο κρυσταλλικό στερεό ή υγρό. Παρουσιάστηκε από την εταιρεία Shell Research Ltd (τωρινή BASF AG) (6).

**Σταθερότητα:** Η Cyanazine είναι σταθερή σε pH 7 και 9 στους 25°C. Υδρολύεται αργά σε pH 5 και αποδομείται γρηγορότερα κάτω από συνθήκες ηλιακής ακτινοβολίας (14).

Πίνακας 5. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας,  
Cyanazine

B.A. (14)

<b>Κοινό Όνομα</b>	Cyanazine
<b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b>	2-(4-chloro-6-ethylamino-1,3,5,- triazin-2-yl]amino]-2-methylpropanenitrile
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>
<b>Μοριακό βάρος</b>	240.7 g/mol
<b>Χημική δομή</b>	
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	171 mg l <sup>-1</sup> (25 °C)
<b>K<sub>oc</sub></b>	74-236
<b>Τάση ατμών</b>	2 x 10 <sup>-7</sup> Pa (20 °C)
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	2.1
<b>pK<sub>a</sub></b>	1.1

Δεν είναι εγκεκριμένη δραστική για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση και έχει μέγιστο όριο υπολειμμάτων για την καλλιέργεια του αβοκάντο 10ppb.



#### **1.4.5 Terbutryn** (Algenkiller)

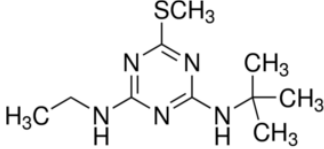
**Χρήση:** Η Terbutryn χρησιμοποιείται προφυτρωτικά ή μεταφυτρωτικά για τον έλεγχο των περισσότερων ετήσιων αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων. Χρησιμοποιείται κυρίως σε καλλιέργειες χειμερινών σιτηρών, πατάτας, όσπριων, καλαμποκιού, ζαχαροκάλαμου και εσπεριδοειδών. Διατίθεται και ως υδρόβιο ζιζανιοκτόνο για τον έλεγχο φυκιών και άλγεων (14).

**Περιγραφή:** Είναι λευκή σκόνη και διατίθεται στο εμπόριο σε μορφή κόκκων. Δεν είναι εγκεκριμένο για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση, παρά μόνο για χρήση σε δεξαμενές και λίμνες κήπων για την προστασία των τοιχωμάτων τους από τα φύκια και τα άλγη. Παρουσιάστηκε από την εταιρεία J.R. Geigy S.A. ( τωρινή Syngenta AG) (14).

**Σταθερότητα:** Η μεθυλοθειομάδα υδρολύεται σε υψηλό και χαμηλό pH, αλλά δεν υφίσταται υδρόλυση σε pH 5-9 στους 70°C (14).

Πίνακας 6. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Terbutryn

B.A. (14)

<b>Κοινό Όνομα</b>	Terbutryn
<b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b>	2- <i>N-tert</i> -butyl-4- <i>N</i> -ethyl-6-methylsulfanyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>10</sub> H <sub>19</sub> N <sub>5</sub> S
<b>Μοριακό βάρος</b>	241.4 g/mol
<b>Χημική δομή</b>	
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	25 mg l <sup>-1</sup> (20 °C)
<b>K<sub>oc</sub></b>	330-1060
<b>Τάση ατμών</b>	2.3 x 10 <sup>-4</sup> (25 °C)
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3.65
<b>pK<sub>a</sub></b>	4.3

Δεν είναι εγκεκριμένη δραστική για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση και έχει μέγιστο όριο υπολειμμάτων για την καλλιέργεια του αβοκάντο τα 10 ppb.

#### **1.4.6 Terbuthylazine** (Sulcotrek, Click premium)

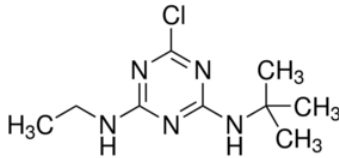
**Χρήση:** Η Terbuthylazine είναι ένα ζιζανιοκτόνο ευρέου φάσματος. Χρησιμοποιείται είτε προφυτρωτικά για την αντιμετώπιση ζιζανίων είτε μεταφυτρωτικά στο καλαμπόκι, τον σόργο, το αμπέλι, στα καφεόδεντρα, στα εσπεριδοειδή, στα όσπρια αλλά και σε δασικές περιοχές. Η Terbuthylazine απορροφάται από τα φύλλα και τις ρίζες, μετακινείται ακροπεταλλικά διαμέσου των αγγείων του ξυλώματος και συσσωρεύεται στα κορυφαία μεριστώματα (14).

**Περιγραφή :** Η Terbuthylazine είναι άχρωμη σκόνη (7). Στο εμπόριο διατίθεται ως γαλακτώδες αιώρημα, συμπυκνωμένο αιώρημα και ως μίγμα εναιωρήματος μικροκαψουλών και συμπυκνωμένου αιωρήματος. Παρουσιάστηκε από την εταιρεία J.R. Geigy S.A.( τωρινή Syngenta AG) (18).

**Σταθερότητα:** Η Terbuthylazine είναι σταθερή σε ουδέτερα, ασθενώς όξινα και ασθενώς αλκαλικά μέσα. Παραδείγματος χάριν η υδρόλυση της terbuthylazine σε pH 1 γίνεται σε 8 ημέρες, σε pH 5 γίνεται σε 86 ημέρες, σε pH 9 λαμβάνει χώρα για πάνω από 200 ημέρες και σε pH 13 υδρολύεται στις 12 ημέρες (14).

Πίνακας 7. Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας, Terbutylazine

B.A. (14)

<b>Κοινό Όνομα</b>	Terbutylazine
<b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b>	N2-tert-Butyl-6-chloro-N4-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>
<b>Μοριακό βάρος</b>	229.7 g/mol
<b>Χημική δομή</b>	
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	8.5 mg l <sup>-1</sup> (20 °C)
<b>K<sub>oc</sub></b>	162-278
<b>Τάση ατμών</b>	1.5 x 10 <sup>-4</sup> Pa (25 °C)
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	3.04 (μη-ιονισμένη μορφή)
<b>pK<sub>a</sub></b>	2.0 (βάση)

Είναι εγκεκριμένο για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση σε ορισμένες καλλιέργειες αλλά δεν είναι εγκεκριμένο για χρήση στην καλλιέργεια του αβοκάντο, και έχει ως μέγιστο όριο υπολειμμάτων για την καλλιέργεια του αβοκάντο τα 50 ppb .

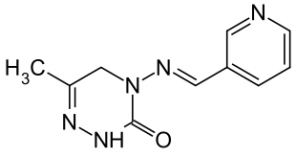
### **1.4.7 Pymetrozine** (Plenum, Chess)

**Χρήση:** Η Pymetrozine είναι ένα διασυστηματικό εντομοκτόνο επιλεκτικό έναντι της τάξεως Homoptera επηρεάζοντας της συμπεριφορά τους . Γίνεται άμεση παύση της σίτισης των αφίδων, του αλευρώδη και του δορυφόρου της πατάτας , μέσω αποτροπής της διείσδυσης του σιλέτου. Ελέγχει τον πληθυσμό των εντόμων σε καρυδιές πεκάν, διακοσμητικών φυτών, σε πατάτες και κονδυλώδη λαχανικά, στον λυκίσκο, το βαμβάκι, τον καπνό και σε φυλλώδη λαχανικά (19,20,21).

**Περιγραφή :** Η Pymetrozine έχει χρώμα λευκό προς μπέζ με σύσταση κρυσταλλικό στερεό και με μια ελαφριώς γλυκιά οσμή. Στο εμπόριο είναι διαθέσιμη ως βρέξιμοι κόκκοι (21). Παρουσιάστηκε από την εταιρεία J.R. Geigy S.A.( τωρινή Syngenta AG)

Πίνακας 8. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστικής ουσίας,  
Pymetrozine

B.A. (22)

<b>Κοινό Όνομα</b>	Pymetrozine
<b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b>	6-methyl-4-[(E)-pyridin-3-ylmethylideneamino]-2,5-dihydro-1,2,4-triazin-3-one
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O
<b>Μοριακό βάρος</b>	217.232 g/mol
<b>Χημική δομή</b>	
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	270 mg/L (pH 7,9, 25°C)
<b>K<sub>oc</sub></b>	402-7875
<b>Τάση ατμών</b>	4.2*10 <sup>-6</sup> Pa (25 °C)
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	<1.0
<b>pK<sub>a</sub></b>	4.06

Δεν είναι εγκεκριμένη δραστική για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση και έχει μέγιστο όριο υπολειμμάτων για την καλλιέργεια του αβοκάντο τα 50 ppb.

#### **1.4.8 Simazine** (GESARAN, GESATOP,ALCO)

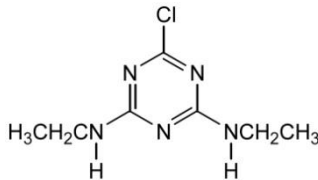
**Χρήση:** Η Simazine είναι ένα προφυτρωτικό ζιζανιοκτόνο και το οποίο χρησιμοποιείται για τον έλεγχο πλατύφυλλων ζιζανίων και ετήσιων αγρωστωδών για τις εξής καλλιέργειες: καλαμπόκι, ζαχαροκάλαμο, αγκινάρες, σπαράγγια, μούρα, ακρόδρυα, εσπεριδοειδή, λυκίσκο, φοινικόδεντρα, ελιές, καλλωπιστικά φυτά, λαχανικά, χλοοτάπητες, οπωρώνες και αμπελώνες. Σε μεγαλύτερη συχνότητα χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ορισμένων πολυετών ζιζανίων σε βιομηχανικές περιοχές (6). Επίσης διατίθεται και ως υδρόβιο ζιζανιοκτόνο και φυκοκτόνο για τον έλεγχο των φυκών και των βυθισμένων ζιζανίων (14).

**Περιγραφή :** Η simazine είναι διαθέσιμη στο εμπόριο ως βρέξιμη σκόνη, υδατοδιαλυτοί κόκκοι, υγρά και κοκκώδη σκευάσματα. Είναι εύφλεκτη, άοσμη, κρυσταλλική με λευκό έως υπόλευκο χρωματισμό , σε μορφή στερεή ή σκόνη. Παρουσιάστηκε από την εταιρεία J.R. Geigy S.A.( τωρινή Syngenta AG) (6).

**Σταθερότητα :** Η simazine είναι σταθερή σε ουδέτερα, ασθενώς όξινα και ασθενώς αλκαλικά μέσα. Υπόκειται ταχύτατη υδρόλυση σε υψηλά και χαμηλά pH (14).

Πίνακας 9. Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά καθαρής δραστηκής ουσίας,  
Simazine

B.A. (14)

<b>Κοινό Όνομα</b>	Simazine
<b>Χημική ονομασία κατά IUPAC</b>	6-chloro-N-N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine
<b>Μοριακός τύπος</b>	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>
<b>Μοριακό βάρος</b>	201.66 g/mol
<b>Χημική δομή</b>	
<b>Διαλυτότητα στο νερό</b>	6.2 mg l <sup>-1</sup> (22 °C)
<b>K<sub>oc</sub></b>	20-180
<b>Τάση ατμών</b>	2.9 x 10 <sup>-6</sup> Pa (25 °C)
<b>Log K<sub>ow</sub></b>	2.1 (μη-ιονισμένη μορφή)
<b>pK<sub>a</sub></b>	1.7 (βάση)

Δεν είναι εγκεκριμένη δραστηκή για χρήση στην Ευρωπαϊκή Ένωση και έχει μέγιστο όριο υπολειμμάτων για την καλλιέργεια του αβοκάντο τα 10 ppb.



## 1.5 Τρόπος δράσης των ζιζανιοκτόνων των τριαζινών

Η φωτοσύνθεση ξεκινάει με την απορρόφηση της ηλιακής ενέργειας από τις χλωροφύλλες των φωτοσυστημάτων PSII και PSI. Η διεγερμένη ενέργεια μεταφέρεται στα κέντρα αντίδρασης: P680 στο φωτοσύστημα II και P700 στο φωτοσύστημα I. Η P680 και η P700 είναι εξειδικευμένα μόρια χλωροφύλλης που έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν ένα μεγάλο διαχωρισμό, ο οποίος δίνει P680<sup>+</sup> και Pheo<sup>-</sup> (φαιοφυτίνη) στην φωτεινή αντίδραση II και P700<sup>+</sup> και FeS<sup>-</sup> (κέντρα σιδήρου-θείου) στην φωτεινή αντίδραση I. Οι διαχωρισμοί φορτίου ακολουθούνται από ηλεκτρονιακές και πρωτονιακές αντιδράσεις μετατόπισης. Η ηλεκτρονική "τρύπα" του P680<sup>+</sup> συμπληρώνεται από ένα ηλεκτρόνιο που προέρχεται από το νερό. Η διάσπαση του νερού δεν αποδίδει μόνο ηλεκτρόνια αλλά πρωτόνια και οξυγόνο. Η φαιοφυτίνη είναι αυτή που μεταφέρει τα ηλεκτρόνια από την κινόνη Qa στην κινόνη Qb (23).

Η λειτουργία της φωτοσύνθεσης περιλαμβάνει πλήθος αντιδράσεων με τις οποίες τα φυτά, έχουν την ικανότητα να εκμεταλλεύονται την ηλιακή ενέργεια και να ανάγουν το CO<sub>2</sub> της ατμόσφαιρας στο επίπεδο του υδατάνθρακα. Σκοπός των τριαζινών είναι να παρεμποδίσουν την ομαλή λειτουργία της φωτοσύνθεσης. Αυτό συνοπτικά επιτυγχάνεται μέσω της παρεμπόδισης της μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ της κινόνης Qa και κινόνης Qb, οι οποίες είναι η πρωταρχική και οι δευτερεύων αποδέκτες και μεταφορείς ηλεκτρονίων. Οι τριαζίνες έχοντας τον ρόλο των παρεμποδιστών δρουν δεσμεύοντας την θέση την οποία θα καταλάμβανε η κινόνη Qb στο πολυπεπτιδίο D1 (24).

Πιο αναλυτικά η χλωροφύλλη P680 η οποία βρίσκεται στο φωτοσύστημα II δέχεται ένα φωτόνιο και διεγείρεται. Η ροή των ηλεκτρονίων προς το φωτοσύστημα I πραγματοποιείται μέσω μιας αλυσίδας ενδιάμεσων φορέων, οι οποίοι λειτουργούν ως οξειδοαναγωγικά ζεύγη. Όταν διεγερμένη η P680\* προσφέρει ένα ηλεκτρόνιο στον επόμενο φορέα ηλεκτρονίων, την φαιοφυτίνη. Αφού η φαιοφυτίνη λάβει το ηλεκτρόνιο το μεταβιβάζει στους δευτερογενείς δέκτες. Υπάρχουν δύο δευτερογενείς δέκτες η κινόνη A και η

κινόνη B που σύμφωνα με τους Magdolna Droppa et.al, 1981 (25) είναι δεσμευμένα μόρια πλαστοκινόνης που περικλείονται σε πρωτεϊνούχο περιβάλλον.

Αφού το ηλεκτρόνιο ληφθεί από την κινόνη A (Qa) η οποία βρίσκεται στην πρωτεΐνη D2, μεταβιβάζει το ηλεκτρόνιο στην κινόνη B (Qβ) που βρίσκεται στην πρωτεΐνη D1. Παρότι που η κινόνη A έχει ισχυρές δυνάμεις συγκράτησης με την πρωτεΐνη D2 η κινόνη B (Qβ) δεν συγκρατείται ισχυρά από την πρωτεΐνη D1 (27,28). Σε εκείνο ακριβώς το σημείο οι τριαζίνες παρεμβάλλονται, εκτοπίζουν τον φυσικό κάτοχο και καταλαμβάνουν αυτές την θέση εκείνη, που υπό κανονικές συνθήκες θα προσδενόταν η κινόνη Qb , και συνεπώς διακόπτεται η ροή ηλεκτρονίων προς το φωτοσύστημα I (26).

## 1.6 Τοξικότητα των τριαζινών

Ως σήμερα, ένα ευρέως διαδεδομένο πρόβλημα αποτελεί η αλλοίωση του φυσικού περιβάλλοντος, προκαλούμενη από την χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Το υψηλό ποσοστό χρήσης αυτών των χημικών έχει επιφέρει μία αυξανόμενη ανησυχία στον επιστημονικό κόσμο, ο οποίος ερευνά εκτενέστερα τις επιπτώσεις που έχουν στην ανθρώπινη υγεία, και αν αυτές προκαλούν οξείες ή χρόνιες τοξικότητες. Οι επίμονοι αυτοί ρύποι μπορούν να μολύνουν όλους τους οργανισμούς σε όλη την τροφική αλυσίδα και δύναται να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στον άνθρωπο. Σύμφωνα με μελέτες που έχουν γίνει, χρησιμοποιώντας αρουραίους για τον λόγο ότι είναι βιολογικά όμοιοι σε ποσοστό 98% ταυτόσημο DNA με τον άνθρωπο, έχουν καταλήξει στα παρακάτω συμπεράσματα.

### 1.6.1 Σχηματισμός όγκων

Τα τριαζινούχα ζιζαντιοκτόνα φαίνεται να δρουν ως επαγωγείς της δραστηριότητας της αρωματάσης, χωρίς όμως να αλληλεπιδρούν με την καταλυτική λειτουργία του ενζύμου άμεσα. Η ατραζίνη ενήργησε αυξάνοντας τα επίπεδα του ενδοκυτταρικού cAMP (κυκλική μονοφωσφορική αδενοσίνη) πιθανώς μέσω αναστολής της δραστηριότητας της φωσφοδιεστεράσης. Διάφορες τριαζινικές ενώσεις έχουν βρεθεί να έχουν την ικανότητα να δρουν ως αναστολείς της φωσφοδιεστεράσης 4 (PDE 4) στους μαλακούς μυϊκούς ιστούς (29). Η αρωματάση είναι υπεύθυνη για την μετατροπή των ανδρογόνων σε οιστρογόνα. Επαγωγή του ενζύμου αυτού οδηγεί σε αυξημένη τοπική παραγωγή οιστρογόνων που έχει ως αποτέλεσμα την πρόκληση όγκων (30). Σε πειράματα που έχουν γίνει σε θηλυκούς αρουραίους, χορηγώντας την ατραζίνη απεδείχθη ότι έγινε πρόκληση όγκων στον μαστικό αδένα και στα αναπαραγωγικά όργανα. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν συσχετίσει την μακροχρόνια έκθεση σε τριαζινούχα ζιζανιοκτόνα με αυξημένο κίνδυνο για καρκίνο των ωοθηκών σε εργάτριες στην Ιταλία, αλλά και αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου του μαστού στον ευρύτερο πληθυσμό στο Κεντάκυ των Ηνωμένων Πολιτειών (31). Σύμφωνα με τους Ralph L., et al, 1996 (32) ούτε η ατραζίνη ούτε η σιμαζίνη φαίνεται να είναι γονιδιοτοξική και έτσι κατέληξαν ότι η χορήγηση χλωροτριαζινών προκαλεί πρόωρη αναπαραγωγική γήρανση, ούτως ώστε αυτό προάγει ένα ευνοϊκό ενδοκρινικό περιβάλλον για την ανάπτυξη όγκων του μαστικού αδένα.

### 1.6.2 Νευροενδοκρινικό σύστημα

Σύμφωνα με ερευνητές της USEPA το 2006 (33) οι οποίοι μελέτησαν τον κίνδυνο που προκαλούν οι τριαζίνες στον άνθρωπο απεφάνθησαν ότι αυτές εμπλέκονται στην μεταβολή της υποθαλαμικής ορμόνης απελευθέρωσης της GnHR η οποία προκαλεί την έκκριση των γοναδοτροφινών και επηρεάζει το επίπεδο των κατεχολαμινών (ντοπαμίνη και νορεπινεφρίνη). Οι κατεχολαμίνες αυξάνουν την αρτηριακή πίεση, τον καρδιακό παλμό, την πνευματική διέγερση αλλά και την αύξηση της ροής του αίματος προς τα κύρια όργανα. Το αποτέλεσμα της τροποποίησης της GnHR και των κατεχολαμινών οδηγεί σε μετατροπή των LH και PRL. Η λουτροπίνη (LH) διεγείρει την σύνθεση των οιστρογόνων και της προγεστερόνης ενώ η προλακτίνη (PRL) δρα ως σημαντικός ρυθμιστής του ανοσοποιητικού συστήματος. Η επηρέαση του άξονα του υποθαλάμου-υπόφυσης από τις τριαζίνες οδηγεί σε προβλήματα όλου του συστήματος που είναι αναμεμιγμένος αυτός, δηλαδή στην ανάπτυξη του αναπαραγωγικού συστήματος αλλά και στην συντήρηση και ομαλή λειτουργία του κατά την ενηλικίωση. Επιπροσθέτως οι αναπαραγωγικές ορμόνες ρυθμίζουν εκτός των άλλων και την λειτουργία πολλών άλλων μεταβολικών διεργασιών (π.χ. σχηματισμό οστών, ανοσοποιητικό, κεντρικό νευρικό σύστημα και καρδιαγγειακό σύστημα).

### 1.6.3 Κύκλος ωορρηξίας

Έχει αποδειχθεί ότι οι τριαζίνες προκαλούν διαταραχές στον φυσιολογικό κύκλο της έμμηνου ρύσης αλλά και προβλήματα στην ωορρηξία (καθυστερημένη ωορρηξία, ανωορρηξία) .Η ατραζίνη δρα ως ανταγωνιστής του υποδοχέα της εστραδιόλης. Μεγάλες δόσεις χορήγησης της σε ποντίκια μετέβαλλαν τον κύκλο της έμμηνου ρύσης , και προκάλεσαν μεγαλύτερο χρόνο παραμονής σε αυτήν αλλά και αύξηση των ημερών του κύκλου. Επίσης παρατηρήθηκαν επαναλαμβανόμενες ψευδο-κυήσεις, και σε ορισμένες περιπτώσεις και ανωορρηξία (34).

Σύμφωνα με D. Andrew Crain, et al, 2008 (35) μελέτες που διεξήχθησαν σε αρουραίους τους οποίους τους χορηγήθηκαν σημαντικές δόσεις ατραζίνης κατά την 17<sup>η</sup>-19<sup>η</sup> ημέρα κυοφορίας κατά τις οποίες ημέρες λαμβάνει χώρα η επιθηλιακή ανάπτυξη, έδειξαν παρεκώλυση της εφηβικής ανάπτυξης αλλά και καθυστέρηση των μαστικών αδένων ανεξαρτήτως των υπαρχουσών κυκλοφορούντων ορμονικών επιπέδων. Αυτό είχε ως επακόλουθο την ανεπαρκή παραγωγή μητρικού γάλακτος που είχε ως συνέπεια το μειωμένο βάρος των τέκνων τους. Αξιοσημείωτο εύρημα όμως αποτελούν οι περαιτέρω έρευνες που έγιναν κατά την προγεννητική περίοδο και έδειξαν ότι χορήγηση ακόμη και σε χαμηλές δόσεις μεταβολιτών της ατραζίνης αναστέλλουν την ανάπτυξη του μαστικού αδένα.

Οι Bhardwaj JK, Saraf P, 2014 αναφέρουν ότι πειράματα στα οποία δόθηκε δόση ατραζίνης δια στόματος, είτε ενέσιμη κατά την διάρκεια της εγκυμοσύνης σε αρουραίους είχε ως συνέπεια αυξημένο ποσοστό θανάτου των εμβρύων (36).

#### **1.6.4 Ιστολογία όρχεων. Μείωση και ανωμαλία σπερματοζωαρίων**

Σύμφωνα με μελέτες που διεξήχθησαν από τους Song Yang , et al, 2014 κατέληξαν ότι όσο πιο πολύ αυξανόταν η δόση της ατραζίνης σε αρσενικά ποντίκια τόσο πιο πολύ μειώνονταν ο αριθμός των σπερματοζωαρίων της επιδιδυμίδας. Επίσης απεφάνθησαν ότι το μη φυσιολογικό ποσοστό σπερματοζωαρίων ήταν εξαρτώμενο από την δόση της ατραζίνης που θα χορηγούνταν. Όσο πιο μεγάλη ήταν η δόση τόσο μεγαλύτερο ποσοστό ανωμαλιών υπήρχαν στα σπερματοζωάρια (32).

Οι όρχεις είναι το πιο σημαντικό όργανο στο αναπαραγωγικό σύστημα των αρσενικών ποντικών και εμπλέκεται στην λειτουργία της σπερματογένεσης αλλά και της έκκρισης τεστοστερόνης. Μελετήθηκαν τέσσερα ένζυμα (ACP, AKP, LDH, SDH) ώστε να γίνει αποτίμηση της τοξικής δράσης της ατραζίνης. Το ένζυμο ACP βρίσκεται κυρίως στο κυτόπλασμα των

κυττάρων Sertoli και είναι συσχετισμένο με την μετουσίωση του σπερματογόνου επιθηλίου αλλά και της φαγοκυττάρωσης των κυττάρων Sertoli. Το ένζυμο AKP συνδέεται με την διαίρεση των κυττάρων σπερματογένεσης και την μεταφορά θρεπτικών συστατικών σε αυτά, για τον πολλαπλασιασμό και διαφοροποίηση τους. Ύστερα από χορήγηση ατραζίνης, η δραστηριότητα των δύο παραπάνω ενζύμων μειώθηκε δραστικά με αποτέλεσμα τον ατελή σχηματισμό σπερματοζωαρίων και αυτό οφείλεται στην διατάραξη της μεταφοράς των θρεπτικών συστατικών, στην παρεμπόδιση των μεταβολικών διεργασιών και στην μείωση της διαφοροποίησης των κυττάρων σπερματογένεσης. Τα ένζυμα LDH και SDH τα οποία είναι κατανεμημένα στα σπερματικά σωληνάρια και στα αναπαραγωγικά κύτταρα, σχετίζονται με την ωρίμανση των κυττάρων σπερματογένεσης και των σπερματοζωαρίων. Χορήγηση μεγάλων δόσεων ατραζίνης οδήγησε σε σημαντική μείωση της δραστηριότητας τους. Επίσης αναφέρθηκε ότι η έκθεση σε ατραζίνη μείωσε τα ενδοορχιακά και κυκλοφορούντα επίπεδα της τεστοστερόνης στα έφηβα και ενήλικα ποντίκια το οποίο οφείλεται στον εκφυλισμό και την μείωση των κυττάρων Leydig τα οποία είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της τεστοστερόνης (32).

Η χορήγηση υψηλής δόσης ατραζίνης έδειξε να παίζει ρόλο στην αποδιοργάνωση της φυσιολογικής διάταξης των κυττάρων μέσα στα σπερματικά σωληνάρια δημιουργώντας ορατές τρύπες ανάμεσα στα κύτταρα αλλά και στην μείωση του συνολικού αριθμού των αναπαραγωγικών κυττάρων μέσα στα σπερματικά σωληνάρια (32).

## 1.7 Αποδόμηση των τριαζινών

Η μεγάλη χρήση των χημικών στην αγροκαλλιέργεια, ιδίως η χρήση ζιζανιοκτόνων έχει προκαλέσει μία τεράστια περιβαλλοντική ανησυχία λόγω της πιθανής απορροής αυτών των ενώσεων διαμέσου του εδάφους και της κατάληξης αυτών στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα και την μόλυνση αυτών. Τρεις κύριες διεργασίες καθορίζουν την τύχη των τριαζινών στο έδαφος : η αποδόμηση, η κατακράτηση και η μεταφορά. Οι διεργασίες αυτές καθορίζουν την κινητικότητα και την επιμονή των οργανικών ρύπων στο έδαφος.

### 1.7.1 Έδαφος

Στα εδάφη η αποδόμηση των τριαζινών φαίνεται να είναι κυρίως αποτέλεσμα που προκαλείται από τους μικροοργανισμούς. Ωστόσο η μοίρα των τριαζινών επηρεάζεται και από διάφορα χαρακτηριστικά του εδάφους όπως είναι η περιεκτικότητα σε άργιλο, η περιεκτικότητα σε οξείδια σιδήρου, το pH του εδάφους, η περιεκτικότητα σε νερό, η χημική δομή της τριαζίνης, η επιφάνεια των σωματιδίων του εδάφους, ο χρόνος επώασης των τριαζινών επί του εδάφους (aging), ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας και τέλος η περιεκτικότητα σε οργανικές και ανόργανες ουσίες. Πιο σημαντικό χαρακτηριστικό του εδάφους θεωρείται η ενσωμάτωση σε αυτό οργανικών βελτιωτικών τα οποία μπορούν να τροποποιήσουν το pH και αυτό ακολούθως να μεταβάλλει τα ποσοστά προσρόφησης των ζιζανιοκτόνων αλλά επίσης και να επηρεάσει την δραστηριότητα της μικροβιακής βιομάζας (8,37).

## **1.7.2 Βιο-αποδόμηση τριαζινών στο έδαφος**

Στα εδάφη η αποδόμηση της ατραζίνης είναι αποτέλεσμα μικροβιακής δραστηριότητας. Μια μεγάλη ποικιλία μικροοργανισμών του εδάφους μέσω συν-μεταβολικών διεργασιών οδηγούν στον σχηματισμό μεταβολίτων της. Άλλοι μικροοργανισμοί έχουν την ικανότητα της πλήρους ανοργανοποίησης της σε διοξείδιο του άνθρακα και την παράγωγη θρεπτικών συστατικών. Αυτοί οι μικροοργανισμοί περιλαμβάνουν ένα μεγάλο φάσμα απομονωμένων στελεχών όπως τα *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium radiobacter* J14a, *Ralstonia* sp., *Acinetobacter* sp., *Comamonas* sp., και *Nocardioide* sp. Η μακροπανίδα του εδάφους μπορεί επίσης να επηρεάσει είτε έμμεσα είτε άμεσα την τύχη της ατραζίνης. Αναφέρεται ότι οι γαιοσκώληκες δύναται να επηρεάσουν σημαντικά τις φυσικοχημικές ιδιότητες του εδάφους και συνεπώς την απόδοση αποδόμησης των οργανικών μορίων των μικροβιακών πληθυσμών (38).

## **1.7.3 Μη βιολογική αποδόμηση των τριαζινών**

### **1.7.3.1 Υδρόλυση**

#### **1.7.3.1.1 Έδαφος**

Οι τριαζίνες υπόκεινται και μία αργή χημική αποδόμηση γνωστή και ως υδρόλυση η οποία λαμβάνει χώρα είτε στο νερό είτε στο έδαφος. Για παράδειγμα η χημική υδρόλυση της ατραζίνης είναι μια διαδικασία στην οποία το άτομο χλωρίου απομακρύνεται και αντικαθίσταται με ένα υδροξύλιο. Η χημική υδρόλυση πραγματοποιείται σχετικά γρηγορότερα σε όξινα και αλκαλικά εδάφη, ενώ είναι πιο αργή σε ουδέτερα. Στα ουδέτερα εδάφη ο ρυθμός της χημικής υδρόλυσης μπορεί να αυξηθεί άμα η τριαζίνη προσροφηθεί στην επιφάνεια των σωματιδίων του εδάφους. Οι υδροξυτριαζίνες που είναι τα προϊόντα της χημικής υδρόλυσης έχουν ισχυρές δυνάμεις συγκράτησης με την επιφάνεια του εδάφους και ως εκ τούτου γίνεται πολύ αργή κίνηση σε αυτό. Παρόλα αυτά αν και η παρουσία των μεταβολίτων της ένωσης δίνει μια σχετική αποδόμηση της μητρικής ένωσης αυτοί



παρουσιάζουν παρόμοια τοξικότητα, μεγαλύτερη υδατοδιαλυτότητα και σθεναρή αλληλεπίδραση συγκράτησης με τα συστατικά του εδάφους (38).

Η ποσότητα της τριαζίνης που απορροφάται σε ένα έδαφος κυμαίνεται από 50%-82% του ποσού εφαρμογής. Η απορρόφηση των τριαζινών αυξάνεται με την μείωση του pH του εδάφους (37).

#### **1.7.3.1.2 Νερό**

Οι τριαζίνες λόγω ότι τα άτομα του αζώτου που βρίσκονται στον τριαζινικό διακτύλιο είναι βασικά όταν βρεθούν σε όξινο περιβάλλον πρωτονιώνονται και για αυτόν τον λόγο οι τριαζίνες σε υδατικά διαλύματα συμπεριφέρονται ως ασθενείς βάσεις. Οι χλωρο-τριαζίνες είναι σχετικά σταθερές σε υδατικά διαλύματα με pH 5-9. Όσο το pH μειώνεται τόσο αυξάνεται η υδατοδιαλυτότητα τους (39). Ο βαθμός υδρόλυσης των τριαζινών εξαρτάται εκτός από το pH, από την θερμοκρασία αλλά και την παρουσία διαλυμένων συστατικών τα οποία μπορεί να καταλύσουν την υδρόλυση. Στο έδαφος και το νερό ο διαλυμένος οργανικός άνθρακας περιλαμβάνει χουμικά και φουλβικά οξέα, χαμηλού μοριακού βάρους, καρβοξυλικά οξέα και φαινόλες. Τα ζιζανιοκτόνα των τριαζινών σχηματίζουν σύμπλοκα με τέτοια συστατικά μέσω μεταφοράς πρωτονίου, δεσμούς υδρογόνου ή με αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Ο σχηματισμός αυτών των συμπλόκων μπορεί να ενισχύσει ή να καταλύσει την υδρόλυση. Παραδείγματος χάριν, η υδρόλυση της ατραζίνης καταλύεται παρουσία φουλβικού οξέος λόγω της συμπλοκοποίησης μεταξύ ατραζίνης και πρωτονιωμένων καρβοξυλικών ομάδων του φουλβικού οξέος μέσω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου. Ενώ αντιθέτως η ατραζίνη υδρολύεται με παρόμοιο τρόπο παρουσίας χουμικού οξέος σε πολύ χαμηλές τιμές pH (37).

Η υδατοδιαλυτότητα της δραστικής ουσίας καθορίζει το πόσο εύκολα γίνεται η έκλυση. Ζιζανιοκτόνα με διαλυτότητα μεγαλύτερη των 30mg/L είναι πιο πιθανό να ξεπλυθούν από το έδαφος ενώ με μικρότερη των 1mg/L είναι πιθανό να παραμείνουν στην επιφάνεια του εδάφους ακόμη και ύστερα από καταιγίδα. Ο συντελεστής προσρόφησης του εδάφους ( $K_{oc}$ ) είναι ένας βαθμός

μέτρησης της τάσης του ζιζανιοκτόνου να απορροφηθεί στα σωματίδια του εδάφους. Μεγάλη τιμή ( $K_{oc}$ ) σημαίνει τόσο πιο ισχυρή απορρόφηση ενώ ζιζανιοκτόνα με μικρότερες τιμές  $K_{oc}$  των 500 mL/g τείνουν να μεταφέρονται κυρίως στην διαλυμένη φάση, ενώ μεγαλύτερες τιμές 1000 mL/g μεταφέρονται πρωτίστως στα αιωρούμενα σωματίδια του ιζήματος (40).

#### 1.7.4 Φωτόλυση

Οι περιβαλλοντικές φωτοαντιδράσεις προϋποθέτουν την απορρόφηση από την ένωση, ηλιακής ενέργειας είτε άμεσα είτε έμμεσα. Παρότι που η στοιβάδα του όζοντος απορροφάει σχεδόν όλη την εκπεμπόμενη ηλιακή ακτινοβολία κάτω από το μήκος κύματος των 290 nm είναι γενικά αποδεκτό ότι μόνο το φως μεγαλύτερο του μήκους κύματος των 290 nm είναι διαθέσιμο για τις φωτοαντιδράσεις. Θεωρείται ότι μόνο η ενέργεια της φασματικής περιοχής κοντά στο υπεριώδες (399 KJ/mol στα 300 nm και 297 KJ/mol στα 400 nm) είναι διαθέσιμη και επαρκής για να σπάσει τους ομοιοπολικούς δεσμούς ενός μορίου. Οντότητες/μονάδες που έχουν την ικανότητα απορρόφησης του φωτός καλούνται χρωμοφόρα. Ως άμεση φωτόλυση θεωρείται η απευθείας απορρόφηση του φωτός του ζιζανιοκτόνου, συνεπαγόμενη από χημικές αντιδράσεις διάσπασης των δεσμών. Ενώ ως έμμεση φωτόλυση ορίζεται η απορρόφηση του φωτός από χρωμοφόρα του υποστρώματος (νερού, εδάφους). Αυτά καλούνται ευαισθητοποιητές και είναι αυτά τα οποία μεταφέρουν την απορροφημένη ενέργεια από τον εαυτό τους στο υπόστρωμα στο οποίο βρίσκονται ώστε να καταστεί δυνατή η διάσπαση της ένωσης. Ένας άλλος τρόπος έμμεσης φωτόλυσης είναι η απορρόφηση από τον ευαισθητοποιητή του φωτός, ο σχηματισμός αντιδραστικών ειδών όπως ρίζες υδροξυλίου ή μονοατομικού οξυγόνου, ακολουθούμενες από χημικές αντιδράσεις με το υπόστρωμα και διάσπαση της ένωσης (37).

## Κεφάλαιο 2

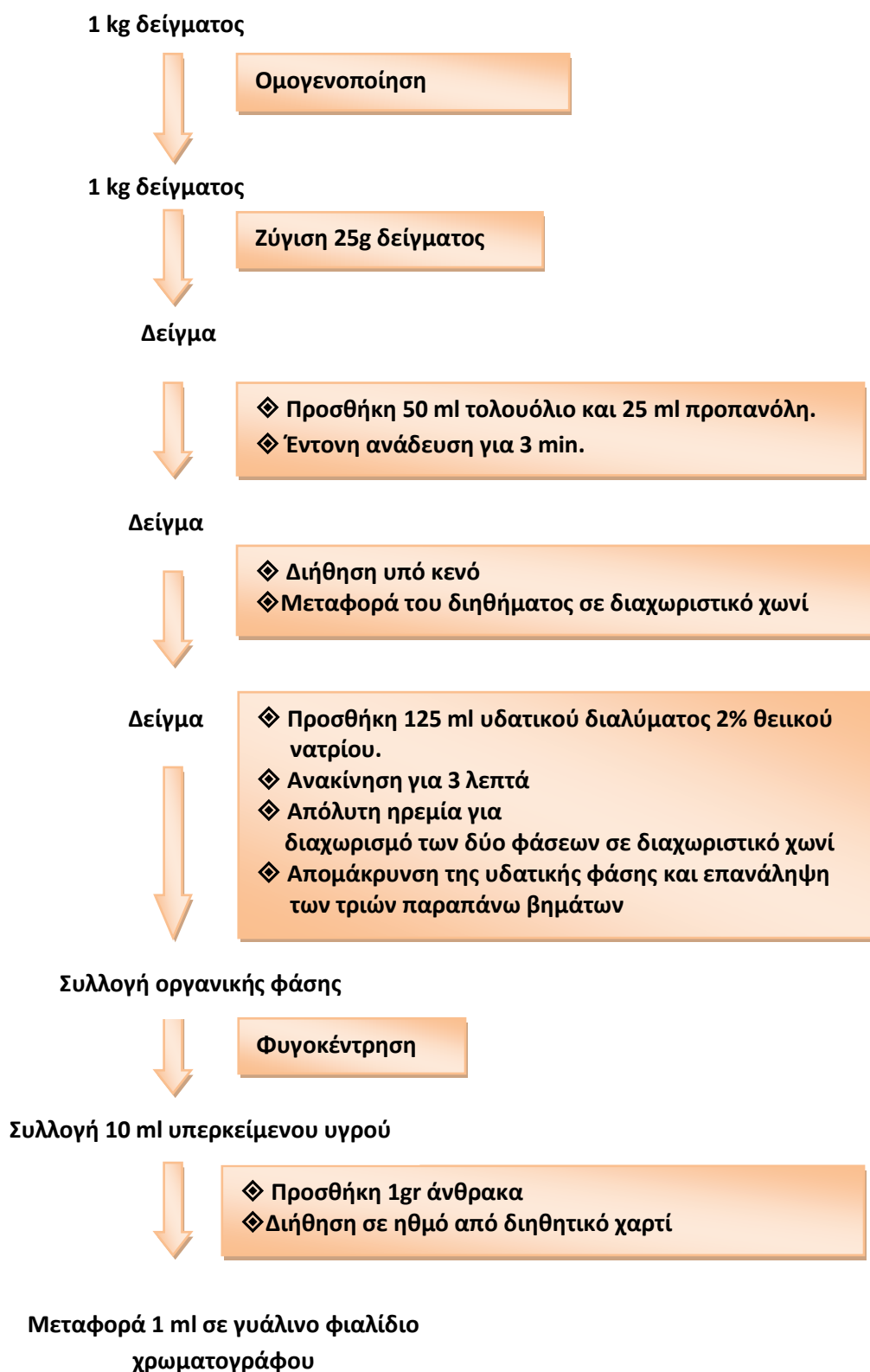
### Πολυυπολειμματικές μέθοδοι εκχύλισης

---

Πλέον όλα τα εργαστήρια υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων έχουν εντάξει στην καθημερινότητα τους πολυυπολειμματικές μεθόδους εκχύλισης. Αυτό οφείλεται στο γεγονός του μεγάλου όγκου δειγμάτων, της συνεχούς εισαγωγής νέων φαρμάκων στο πεδίο τους αλλά και την συνεχή εξέλιξη που υφίσταται ο τομέας της παραγωγής γεωργικών φαρμάκων.

#### 2.1 Ολλανδική μέθοδος

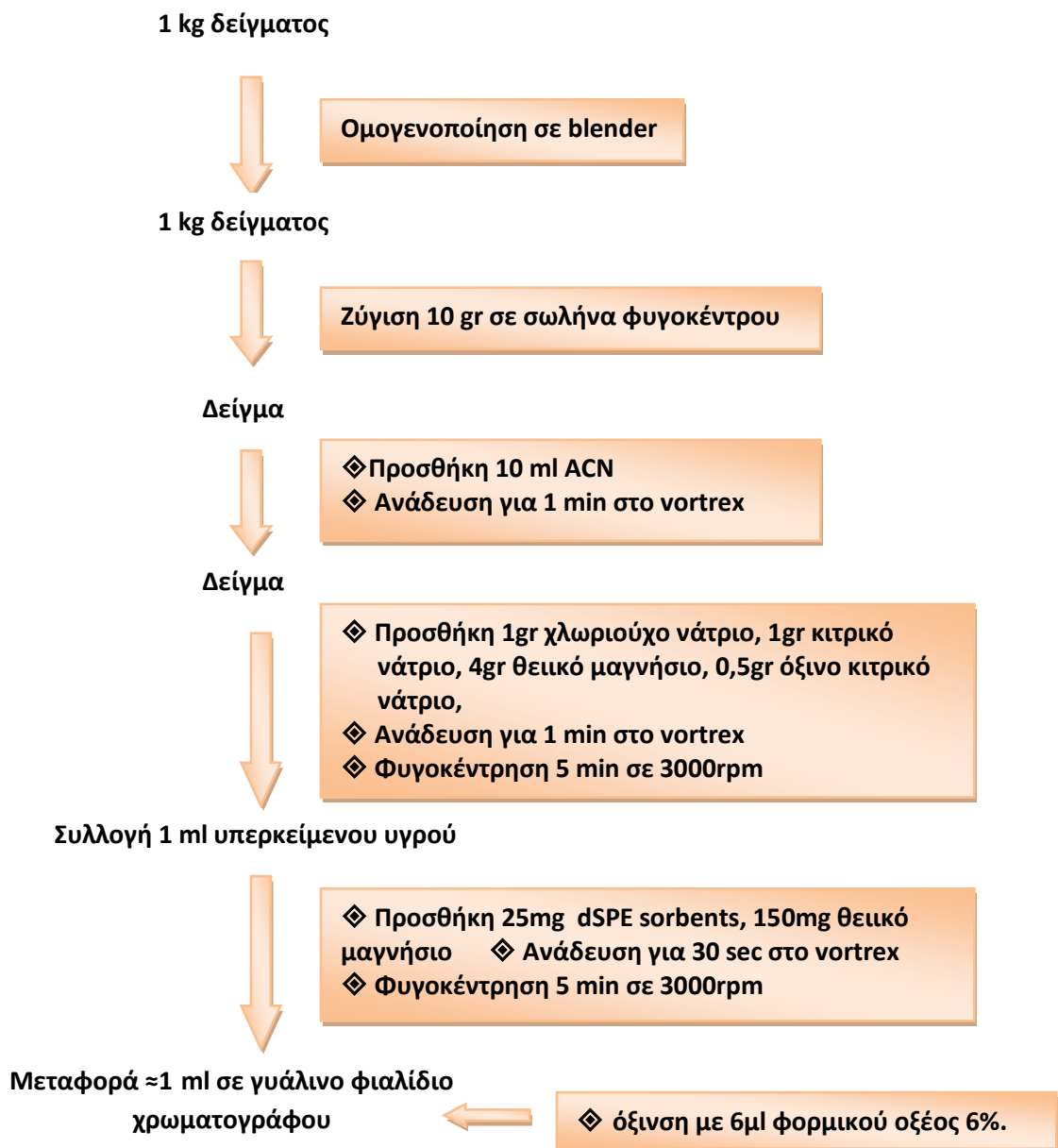
Σύμφωνα με την ολλανδική μέθοδο (41) προκατεργασίας δείγμα ενός κιλού πολτοποιείται σε blender. Ζυγίζονται 25g πολτοποιημένου δείγματος σε κωνική φιάλη των 100ml. Γίνεται προσθήκη 50 ml τολουολίου και 25 ml προπανόλης και ακολουθεί έντονη ανάδευση για 3 min σε ομογενοποιητή. Το δείγμα διηθείται μέσω πορσελάνινου χωνιού με ηθμό και συλλέγεται με την βοήθεια συσκευής κενού (vacuum system) σε κωνική φιάλη. Το διήθημα μεταφέρεται σε διαχωριστικό χωνί και προστίθεται σε αυτό 125 ml υδατικού διαλύματος 2% θειικού νατρίου. Ανακινείται για 3 λεπτά στον αναταράκτη διαχωριστικών χωνιών και στην συνέχεια αφήνεται σε απόλυτη ηρεμία για τον διαχωρισμό των δύο φάσεων. Αφού έχει επέλθει ο διαχωρισμός γίνεται απομάκρυνση της υδατικής φάσης ενώ το γαλάκτωμα και η οργανική φάση παραμένει στο διαχωριστικό χωνί. Ξαναπροστίθενται 125 ml υδατικού διαλύματος 2% θειικού νατρίου, ανακινείται και αφήνεται σε απόλυτη ηρεμία για δεύτερη φορά. Αφού γίνει πλήρης διαχωρισμός των φάσεων η υδατική φάση απομακρύνεται και η οργανική φάση μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου. Φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 3000rpm. Τα 10 ml υπερκείμενου υγρού μεταφέρονται σε δοκιμαστικό σωλήνα και προστίθεται 1g άνθρακα. Αφού γίνει ανακίνηση, το δείγμα διηθείται μέσω διηθητικού χαρτίου. Λαμβάνεται 1ml σε γυάλινο φιαλίδιο χρωματογράφου (41).



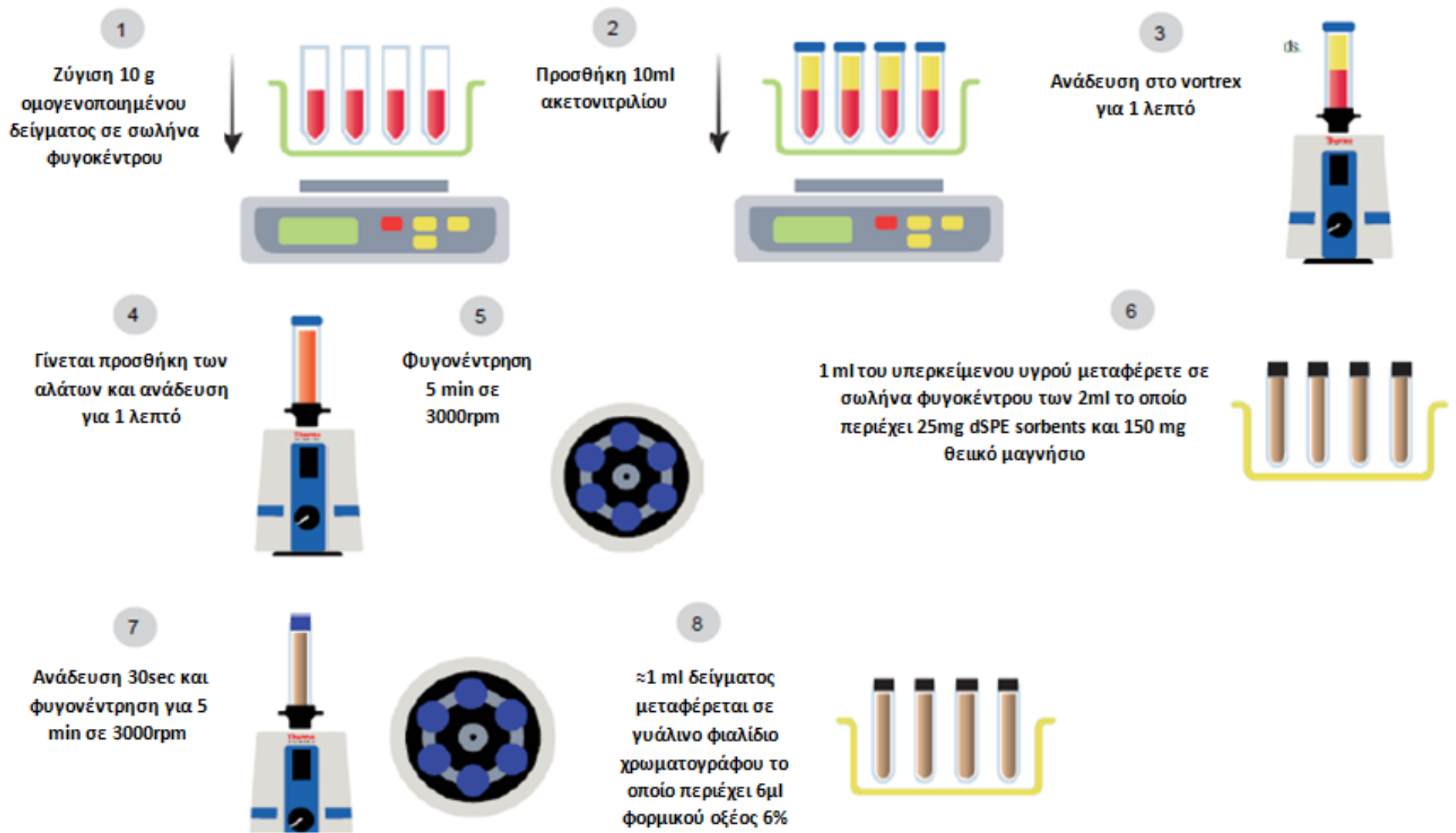
Σχήμα 1. Διάγραμμα ροής προετοιμασίας δείγματος Ολλανδικής μεθόδου (41).

## 2.2 QUECHERS

Στην πιο απλή μορφή κατά την εφαρμογή της μεθοδολογίας Quechers (42) ακολουθούνται τα παρακάτω βήματα. Φυσικά υπάρχουν και ορισμένες διαφοροποιήσεις στα βήματα που ακολουθούνται ανάλογα με την περιεκτικότητα σε νερό (π.χ. ξηροί καρποί), ή την παρουσία ελαίων ( π.χ. αβοκάντο, ελαιόλαδο). Δείγμα ενός κιλού πολτοποιείται σε blender. Ζυγίζονται 10g πολτοποιημένου δείγματος σε σωλήνα φυγοκέντρου. Γίνεται προσθήκη 10 ml ακετονιτρίλιο και το δείγμα αναδεύεται για 1 min σε vortex. Στην συνέχεια γίνεται προσθήκη μείγματος αλάτων αποτελούμενο από 1g χλωριούχο νάτριο, 1g κιτρικό νάτριο, 4g θειικό μαγνήσιο και 0,5g όξινο κιτρικό νάτριο. Το δείγμα αναδεύεται για ένα λεπτό και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 3000 rpm. Λαμβάνεται 1ml του υπερκείμενου υγρού και μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρου των 2 ml ο οποίος περιέχει μίγμα αλάτων αποτελούμενο από 25 mg dSPE sorbents (PSA και C18 on silica) αλλά και 150 mg θειικό μαγνήσιο. Γίνεται ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα και φυγοκεντρείται για 5 λεπτά σε 3000 rpm. Μεταφέρεται  $\approx$ 1 ml σε γυάλινο φιαλίδιο χρωματογράφου και γίνεται όξινση με 6ml φορμικού οξέος 6% (42).



Σχήμα 2. Διάγραμμα ροής προετοιμασίας δείγματος μεθόδου Quechers (42).



Σχήμα 3. Σχηματική απεικόνιση των βημάτων της μεθοδολογίας Quechers (43).

## Κεφάλαιο 3

# Υγρή-Αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματογραφία Μάζας

---

Όσον αφορά την αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με φασματογράφο μάζας είναι μία δημοφιλής και πολύ πολύτιμη τεχνική και αποτελεί έναν συνεργιστικό συνδυασμό δύο ισχυρών μικροαναλυτικών τεχνικών. Ο αέριος χρωματογράφος είναι αυτός που θα διαχωρίσει τα συστατικά ενός μίγματος με βάση τον χρόνο κατακράτησης ενώ το φασματόμετρο μάζας παρέχει πληροφορίες που βοηθούν στην δομική ταυτοποίηση του κάθε συστατικού.

Στην πιο απλή του μορφή περιλαμβάνει την λήψη μιας μικροποσότητας δείγματος από την σύριγγα του δειγματολήπτη και την μετατροπή του από υγρό σε αέριο μέσω της ευθείας εισαγωγής του σε ένα θερμαινόμενο στόμιο. Παράλληλα το σύστημα τροφοδοτείται με το φέρον αέριο που αποτελεί την κινητή φάση του συστήματος λειτουργίας του αέριου χρωματογράφου , και είναι αυτή η οποία θα μεταφέρει το δείγμα από τον εγχυτήρα στην στήλη, και τέλος στον φασματογράφο μάζας. Η κινητή φάση είναι συνήθως He, N<sub>2</sub> ή H<sub>2</sub> το οποίο προέρχεται από μία δεξαμενή αερίου υψηλής πίεσης. Η στήλη περιέχει ένα στρώμα στατικής φάσης του οποίου η πολικότητα θα πρέπει να ομοιάζει με την πολικότητα των ουσιών που επρόκειτο να διαχωριστούν. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται εξαιτίας των διαφόρων δυνάμεων συγκράτησης και έκλυσης ανάμεσα στα συστατικά του δείγματος, του υλικού πληρώσεως της στήλης και της ροής του φέροντος αερίου. Τέλος οι ουσίες φτάνουν στον φασματογράφο μάζας (44).



Στον φασματογράφο μάζας η ουσία βομβαρδίζεται καθώς εξέρχεται από την στήλη είτε από μία υψηλής ενέργειας δέσμης ηλεκτρονίων τα οποία εκκρίνονται από ένα πυρακτωμένο νήμα είτε γίνεται χημικός ιονισμός ενός αντιδρώντος αερίου και αυτό με την σειρά του θα ιονίσει την ουσία. Τα ηλεκτρόνια αυτά ιονίζουν τα μόρια της ουσίας προκαλώντας ρήξη των δεσμών και επακολούθως τον μοριακό τους κατακερματισμό. Τα φορτισμένα θραύσματα διέρχονται μέσα από έναν αναλυτή μάζας (συνήθως τετραπολικό, χρόνου πτήσης, παγίδας ιόντων κ.α.) και διαχωρίζονται ως αποτέλεσμα της συνάρτησης μάζας και χρόνου. Τέλος φτάνουν στον ανιχνευτή ο οποίος θα "μετατρέψει" τα ιόντα σε σήμα. Το φάσμα που θα παρθεί παρέχει ένα χαρακτηριστικό μοτίβο κατακερματισμού του κάθε συστατικού το οποίο θα αποτελέσει το χημικό του αποτύπωμα και σε συνδυασμό με τον χρόνο κατακράτησης θα μπορέσει να γίνει η ταυτοποίηση του (44).

Εν αντιθέση το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας (LC) ως αναλυτική τεχνική χρησιμοποιείται για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αμινοξέων, περιβαλλοντικών τοξινών, ναρκωτικών, φαρμάκων, υδατανθράκων αλλά και πολλών άλλων ενώσεων. Αυτοί οι τύποι δειγμάτων συχνά δεν μπορούν να αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία επειδή οι ενώσεις δεν είναι αρκετά πτητικές ή είναι θερμοευαίσθητες. Εκτιμάται ότι μόνο περίπου το 20% των οργανικών ενώσεων μπορεί να αναλυθεί με αέρια χρωματογραφία (44).

Υπάρχουν πολλά είδη μηχανισμών που μπορούν να λάβουν χώρα κατά την υγρή χρωματογραφία για τον διαχωρισμό ενός μίγματος αλλά το πιο διαδεδομένο και χρησιμοποιούμενο είδος μηχανισμού είναι η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

Η γενική αρχή της υγρής χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης είναι ότι το δείγμα εισέρχεται στην στήλη είτε μέσω μικροσύριγγας, είτε μέσω μιας ειδικής βαλβίδας συνήθως έξι θέσεων. Η βαλβίδα αποτελείται από έναν βρόχο. Το δείγμα εισέρχεται στον βρόχο και στην συνέχεια με την βοήθεια της κινητής φάσης οδηγείται στην στήλη. Η ροή με την οποία θα εισαχθεί το δείγμα εξαρτάται από το μέγεθος της στήλης και κυμαίνεται από 1-10 ml min<sup>-1</sup>. Στην στήλη γίνεται ο διαχωρισμός των αναλύτων ενός μίγματος. Το υλικό πλήρωσης των στηλών είναι άμεσα εξαρτώμενο των ενώσεων των οποίων θα απαιτηθεί ο διαχωρισμός τους. Αποτελείται από διοξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες ομάδες όπως αλκύλια, αμινομάδες, φαινύλια κ.α. Παράλληλα με την εισαγωγή του δείγματος στην στήλη γίνεται και η εισαγωγή κινητής φάσης για την προώθηση του δείγματος. Η κινητή φάση είναι μίγμα διαφόρων οργανικών διαλυτών και νερού ή ρυθμιστικών διαλυμάτων σε διαφορετικές αναλογίες. Για να γίνει όμως η προώθηση του μίγματος με την κινητή φάση έως την πηγή ιονισμού χρησιμοποιείται αντλία υψηλής πίεσης που έχει ως βασικό ρόλο την άντληση κινητής φάσης από το δοχείο και διαβίβαση της μέσα από την στήλη. Η αντλία υψηλής πίεσης δουλεύει σε πιέσεις έως 400 bar. Ο χρόνος με τον οποίο θα γίνει η έκλουση των αναλύτων στην πηγή ιονισμού επηρεάζεται από την διαφορετική κατανομή των αναλύτων μεταξύ στατικής και κινητής φάσης (45).

### 3.1 Δημιουργία ιόντων

Υπάρχουν διάφοροι μέθοδοι ιονισμού οι οποίοι εξυπηρετούν διαφορετικούς σκοπούς. Θα γίνει αναφορά στους σημαντικότερους από αυτούς: Ο ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact - EI) , ο χημικός ιονισμός (Chemical Ionization - CI), Ιονισμός με ψεκασμό ηλεκτρονίων (Electron spray Ionization- ESI), Χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric pressure chemical ionization - APCI) Φωτοϊονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photo-ionization - APPI).

#### 3.1.1 Ιονισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων

Στον ιονισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων τα ηλεκτρόνια παράγονται από ένα πυρακτωμένο νήμα βολφραμίου W ή ρηνίου Re (κάθοδος) με δυναμικό της τάξεως των 70 eV. Τα περισσότερα οργανικά μόρια θραυσματοποιούνται πλήρως στα 30 eV. Το δυναμικό της τάξεως των 70 eV χρησιμοποιείται έτσι ώστε τα φάσματα που θα παρθούν από διαφορετικά όργανα ανά τον κόσμο να μπορούν να παραμένουν επαναλήψιμα και να μπορεί να γίνει άντληση πληροφοριών σε μία παγκόσμια βάση δεδομένων για χημική ταυτοποίηση διαφόρων ενώσεων.

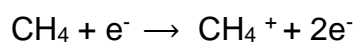
Τα ηλεκτρόνια αφού παραχθούν επιταχύνονται προς την άνοδο, συγκρούονται με τα αέρια μόρια του δείγματος το οποίο εξέρχεται από την στήλη του GC και παράγονται θετικά φορτισμένα ιόντα που αντιστοιχούν στο μοριακό ιόν.



Ορισμένες κλάσεις ενώσεων δεν μπορούν να παράγουν ένα σταθερό μοριακό ιόν ύστερα από τον ιονισμό με πρόσκρουση ηλεκτρονίων. Για αυτόν τον λόγο χρησιμοποιείται ένας εναλλακτικός και πιο ήπιος τρόπος ιονισμού ο οποίος παρουσιάστηκε από τους Munson και Field το 1966, και ονομάζεται χημικός ιονισμός. Ο χημικός ιονισμός θεωρείται πιο επιλεκτικός και ευαίσθητος γιατί μειώνεται η θραυσματοποίηση και έτσι παράγονται λιγότερα αλλά πιο έντονα ιόντα που έχει ως επακόλουθο την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ακόμη και ενώσεων σε μικρές συγκεντρώσεις (46).

### 3.1.2 Χημικός ιονισμός

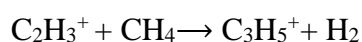
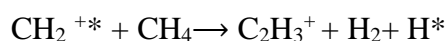
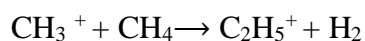
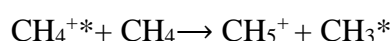
Εν αντιθέση ο χημικός ιονισμός χρησιμοποιεί ένα αντιδρόν αέριο (μεθάνιο, ισοβουτάνιο, αμμωνία) το οποίο θα ιονιστεί με υψηλής ενέργειας δέσμης ηλεκτρονίων ( $> 200 \text{ eV}$ ) και προκαλείται ιονισμός και θραύση του.



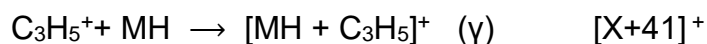
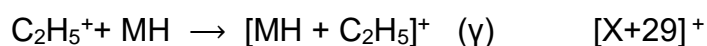
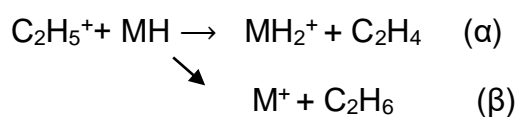
Υπάρχουν δύο είδη χημικού ιονισμού. Ο θετικός και ο αρνητικός χημικός ιονισμός.

### 3.1.2.1 Θετικός χημικός ιονισμός

Ιονισμός του αερίου με πρόσκρουση ηλεκτρονίων σε χαμηλή πίεση ( $<10^{-5}$ Torr ) παρέχει ένα σύνολο πρωτογενών ιόντων :  $\text{CH}_4^{+*}$ ,  $\text{CH}_3^+$ ,  $\text{CH}_2^{+*}$ ,  $\text{CH}^+$ ,  $\text{C}^{+*}$ ,  $\text{H}_2^{+*}$ ,  $\text{H}^+$ . Αυξάνοντας την πίεση του μεθανίου πάνω από  $10^{-2}$  Torr αλλάζει ολοσχερώς το πλήρες φάσμα ενώ ανεβάζοντας ακόμη παραπάνω την πίεση στα 0,5 Torr τα κύρια ιόντα είναι  $\text{CH}_5^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_5^+$  και  $\text{C}_3\text{H}_5^+$ . Αυτά τα ιόντα σχηματίζονται μέσω της αντιδράσεως μεταξύ των πρωτογενών ιόντων του μεθανίου και των ουδέτερων μορίων του μεθανίου. Πιο αναλυτικά:



Εκτός των παραπάνω υφίστανται και ορισμένα ιόντα τα οποία έχουν πολύ μικρή ένταση και χωρίς ιδιαίτερη συνεισφορά στον ολικό ιονισμό :  $\text{C}_3\text{H}_7^+$ ,  $\text{C}_2\text{H}_2^{+*}$ ,  $\text{C}_2\text{H}_4^{+*}$ ,  $\text{C}_3\text{H}_4^{+*}$ . Τα προκύπτοντα κύρια ιόντα  $\text{CH}_5^+$  και  $\text{C}_2\text{H}_5^+$  είναι αυτά τα οποία θα αντιδράσουν με την ουσία MH είτε με την συντέλεση μεταφοράς πρωτονίου (α) είτε απόσπασης υβριδίου (β) και ενίοτε με την παραγωγή ιοντικών συμπλόκων (γ).



Το μοριακό βάρος της ένωσης θα είναι πάντα (M+1). Ανάλογα με την δομή της ουσίας μπορεί να παρατηρηθούν ιόντα (M-1) για κορεσμένους υδρογονάνθρακες και (M+15) για μόρια με πολικές ομάδες (46,47,48,49).

### 3.1.2.2 Αρνητικός χημικός ιονισμός

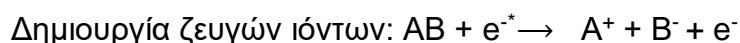
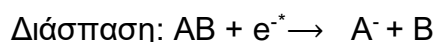
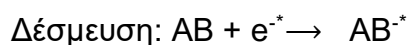
#### Δημιουργία αρνητικών ιόντων

Ο ιονισμός του αερίου από τα πρωταρχικά ηλεκτρόνια συνοδεύεται και από την δημιουργία δευτερευόντων χαμηλής ενέργειας ηλεκτρονίων . Σε μεταγενέστερες ιονίζουσες ή μη συγκρούσεις μεταξύ των ηλεκτρονίων και των μορίων του αερίου αντιδραστηρίου, η ενεργειακή στάθμη των ηλεκτρονίων μειώνεται σε πολύ μεγάλο βαθμό και καλούνται θερμικά ηλεκτρόνια (0-0,1 eV). Για την επίτευξη της δημιουργίας θερμικών ηλεκτρονίων είναι η μείωση της θερμοκρασίας της πηγής που έχει ως άμεση συνέπεια την ελάττωση της κινητικής ενέργειας των ηλεκτρονίων (45,48,50).



όπου  $e^{*-}$  : θερμικά ηλεκτρόνια ,  $e^-$  : ανακάμπτοντα υψηλής ενέργειας ηλεκτρόνια

Τα θερμικά ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν με τα μόρια του δείγματος και σχηματίζουν αρνητικά ιόντα. Οι μηχανισμοί παραγωγής των αρνητικών ιόντων είναι :



### 3.1.3 Ιονισμός με ψεκασμό ηλεκτρονίων ( Electron spray Ionisation - ESI)

Στο άκρο της τριχοειδούς στήλης βρίσκεται η βελόνα η οποία θα διασπείρει το αερόλυμα. Αυτή κυκλικά περιβάλλεται από ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο στο οποίο εφαρμόζεται δυναμικό 3-5 kV. Εκεί λαμβάνει χώρα ο ιονισμός του δείγματος είτε μέσω μεταφοράς θετικών ιόντων (ηλεκτροχημική οξειδωση), είτε απομάκρυνσης αρνητικών ιόντων (ηλεκτροχημική αναγωγή). Παράλληλα

με την τριχοειδή σωλήνα υπάρχει ένας ακόμη ο οποίος διαβιβάζει N<sub>2</sub> ως αέριο νεφελοποίησης ενώ από την αντίθετη κατεύθυνση γίνεται παροχή θερμαινόμενου N<sub>2</sub> το οποίο σε αυτήν την περίπτωση χρησιμοποιείται ως αέριο ξήρανσης. Το νέφος που πλέον αποτελείται από ηλεκτρικά φορτισμένα σταγονίδια θα δεχτεί ατμοσφαιρική πίεση υπό την επίδραση θερμαινόμενου αζώτου και θα γίνει απελευθέρωση των ιόντων από τα σταγονίδια λόγω της εξάτμισης της κινητής φάσης . Όταν τα ιόντα απελευθερωθούν θα εισέλθουν στον αναλυτή μάζας (45).

#### **3.1.4 Χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric pressure chemical ionization - APCI)**

Το άκρο της τριχοειδούς στήλης έχει θερμοκρασία 400-500°C . Καθώς το υγρό δείγμα διαπερνά την θερμαινόμενη τριχοειδή στήλη , εξατμίζεται. Στον χώρο του ιονισμού βρίσκεται μια ακίδα στην οποία εφαρμόζεται υψηλή τάση. Έτσι προκαλούνται ηλεκτρικές εκκενώσεις που ιονίζουν τα μόρια του υλικού έκλουσης τα οποία στην συνέχεια μεταφέρουν το φορτίο τους στα μόρια του αναλύτη (45).

#### **3.1.5 Φωτοϊονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (Atmospheric Pressure Photo-ionization - APPI)**

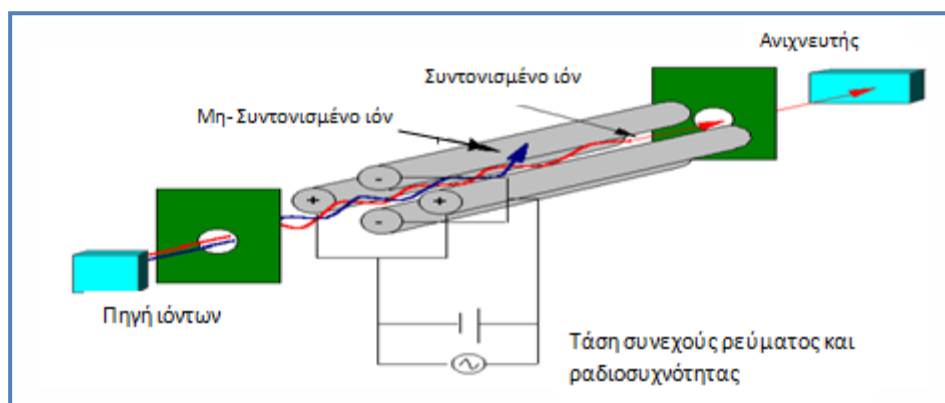
Στην περίπτωση του φωτοϊονισμού ακολουθείται η διάταξη του APCI αλλά αντί για ακίδα υπάρχει μια λάμπα υπεριώθρων, η οποία παράγει φωτόνια τα οποία ιονίζουν τα μόρια του υλικού έκλουσης και αυτά με την σειρά τους τα μόρια του αναλύτη (45).

## 3.2 Αναλυτής μάζας

Όταν ιονισθεί το δείγμα, τα φορτισμένα πλέον ιόντα επιταχύνονται και εξέρχονται από μια σχισμή στην έξοδο της πηγής ιονισμού. Σκοπός του επόμενου σταδίου του φασματομέτρου μάζας είναι να διαχωρίσει τις διαφορετικές μάζες και αυτό επιτυγχάνεται με την χρήση διαφόρων αναλυτών (μαγνητικού πεδίου, τετραπόλου, παγίδας ιόντων, χρόνου πτήσης κ.α.).

### 3.2.1 Τετραπολικός αναλυτής μάζας (Quadrupole)

Η αρχή του τετραπολικού αναλυτή μάζας παρουσιάστηκε το 1953 από τους Paul και Steinwedel. Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας απαρτίζεται από τέσσερις κυλινδρικές ράβδους που είναι παράλληλες μεταξύ τους. Οι δύο αντικριστές ράβδοι συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους και δημιουργούν ένα ταλαντευόμενο ηλεκτρικό πεδίο. Τα ιόντα όταν διέρχονται μέσα στο τετράπολο ταξινομούνται κάτω από την επίδραση ενός προγραμματισμένου δυναμικού συνεχούς ρεύματος (DC), και ενός εναλλασσόμενου δυναμικού ραδιοσυχνότητας (RF) που εφαρμόζεται στα αντικριστά διαγώνια ζεύγη ράβδων. Στο ένα ζεύγος ράβδων εφαρμόζεται ένα συγκεκριμένο DC/RF και στο άλλο ζεύγος το αντίθετο πολικότητας. Τα ιόντα εισέρχονται μέσα στο τετράπολο από τον άξονα Z και αρχίζουν να ταλαντεύονται μεταξύ του άξονα X και Y. Ιόντα με σταθερή τροχιά στον κεντρικό άξονα του τετραπόλου ή ιόντα με συγκεκριμένο  $m/z$  εφόσον αυτό έχει δοθεί θα μπορέσουν να διασχίσουν το τετράπολο και να φτάσουν στο ανιχνευτή. Τα υπόλοιπα ιόντα συγκρούονται με τις ράβδους, εκφορτίζονται και απομακρύνονται (45,48,51).

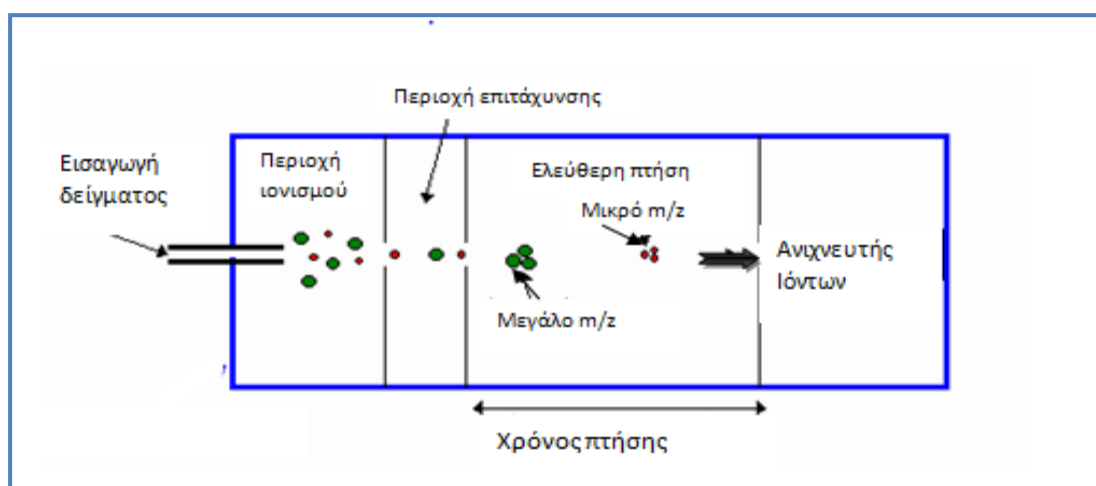


Εικόνα 1: Διάταξη τετραπολικού αναλυτή μάζας (52)



### 3.2.2 Αναλυτές χρόνου πτήσης (Time Of Flight)

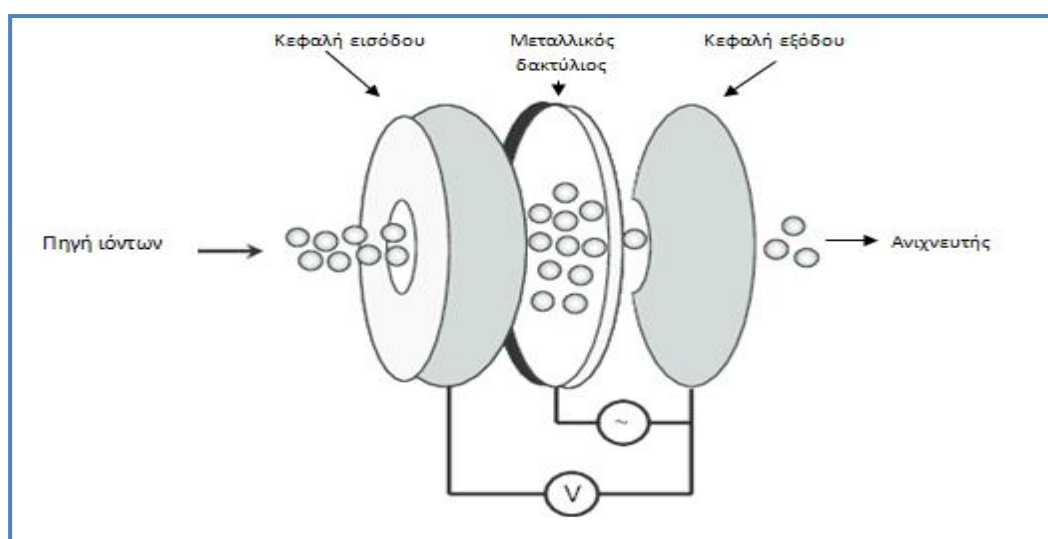
Ένας αναλυτής χρόνου πτήσης διαχωρίζει τα ιόντα ανάλογα με την ταχύτητα τους (49). Τα ιόντα επιταχύνονται, αποκτούν όλα μια κοινή προκαθορισμένη κινητική ενέργεια ανεξαρτήτως λόγου μάζας προς φορτίο, και ύστερα διαπερνάνε ένα σωλήνα διέλευσης ο οποίος στερείται πεδίου και φτάνουν στον ανιχνευτή. Ο χρόνος που χρειάζεται ένα ιόν να φτάσει στον ανιχνευτή είναι ανάλογος με το μοριακό βάρος του (55). Τα ιόντα με μικρότερο μοριακό βάρος θα ταξιδέψουν γρηγορότερα από αυτά με μεγαλύτερο. Οι πρωταρχικοί σωλήνες φτάνανε σε μήκος και το 1m. Οι πιο πρόσφατοι σωλήνες πτήσης είναι μικρότερου μήκους λόγω της εφαρμογής σε αυτούς ενός σχεδίου ανακλάσεων στο οποίο ο σωλήνας είναι διπλωμένος αλλά εσωτερικά του υπάρχουν καθρέφτες οι οποίοι ανακλούν τα ιόντα πάνω κάτω έως ότου φτάσουν τελικώς στον ανιχνευτή (53).



Εικόνα 2: Διάταξη αναλυτή χρόνου πτήσης (54)

### 3.2.3 Παγίδας ιόντων (Ion Trap)

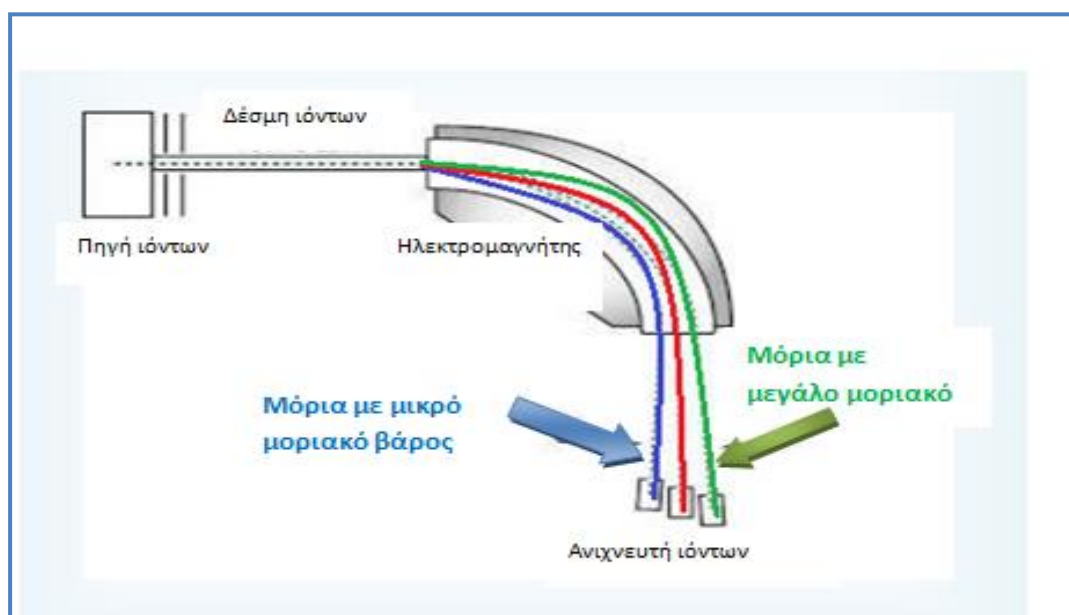
Ο αναλυτής της παγίδας ιόντων ανακαλύφθηκε από τον Wolfgang Paul και απέκτησε ιδιαίτερη εκτίμηση από το κοινό λόγω του χαμηλού του κόστους και της υψηλής του ευαισθησίας. Ο αναλυτής αποτελείται από μία διάταξη τριών ηλεκτροδίων. Τα δύο ηλεκτρόδια που βρίσκονται απέναντι το ένα από το άλλο ονομάζονται κεφαλές ενώ το τρίτο βρίσκεται στο ενδιάμεσο αυτών και έχει την μορφή ενός μεταλλικού δακτυλίου (48). Τα ιόντα εισάγονται στην παγίδα με την βοήθεια ενός ηλεκτροστατικού παλμού. Το μέγεθος του δακτυλίου, η τάση της ραδιοσυχνότητας RF και το εύρος του συνεχούς ρεύματος διαμορφώνουν την σταθερότητα ενός συγκεκριμένου ιόντος στην παγίδα. Συγκρούσεις με ήλιο (~ 1 mTorr) το οποίο βρίσκεται στην παγίδα μειώνει την κινητική ενέργεια των ιόντων και βοηθάει έτσι στην εστίαση της τροχιάς των ιόντων στο κέντρο της (56). Μετά την διαδικασία της παγίδευσης, τα ιόντα μετρώνται αλλάζοντας την εφαρμοζόμενη τάση. Όσο η τάση του RF αυξάνεται τα ιόντα αποκτούν ασταθείς ταλαντώσεις και εκτινάσσονται. Η αρχή που διέπει τον αναλυτή παγίδας ιόντων είναι ότι κατά την αυξητική τάση της RF ξεκινάνε να φεύγουν από την παγίδα πρώτα τα ελαφρύτερα ιόντα (μικρός λόγος  $m/z$ ) και αργότερα τα πιο βαριά (μεγαλύτερος λόγος  $m/z$ ) (45,48). Ένας προκαθορισμένος αριθμός ιόντων βγαίνει από μία σχισμή εξόδου που βρίσκεται στην κάτω κεφαλή και φτάνει στον ανιχνευτή (48).



Εικόνα 3: Διάταξη παγίδας ιόντων (57)

### 3.2.4 Αναλυτές μαγνητικού τομέα

Τα ιόντα καθώς εξέρχονται από την πηγή ιονισμού επιταχύνονται με ένα δυναμικό επιτάχυνσης  $V$  και ακολουθούν μία ομαλή ευθύγραμμη πορεία . Αφού εισέλθουν μέσα στον αναλυτή μαγνητικού πεδίου με την βοήθεια ενός ηλεκτρομαγνήτη δημιουργείται ένα μαγνητικό πεδίο το οποίο εφαρμόζεται κάθετα της τροχιάς των ιόντων και εξαναγκάζονται να κινούνται σε κυκλική τροχιά. Ο διαχωρισμός των ιόντων γίνεται σύμφωνα με την ακτίνα της τροχιάς του κάθε ιόντος ,αφού η ακτίνα της τροχιάς τους είναι ανάλογη με τον λόγο  $m/z$  (58). Μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένη ακτίνα τροχιάς θα μπορέσουν να φτάσουν στον ανιχνευτή . Για να γίνει πλήρης σάρωση των ιόντων θα πρέπει είτε να μεταβάλλεται το δυναμικό επιτάχυνσης είτε το μαγνητικό πεδίο ώστε να συλλεχθούν ιόντα με διαφορετικό  $m/z$  στον ανιχνευτή (48).



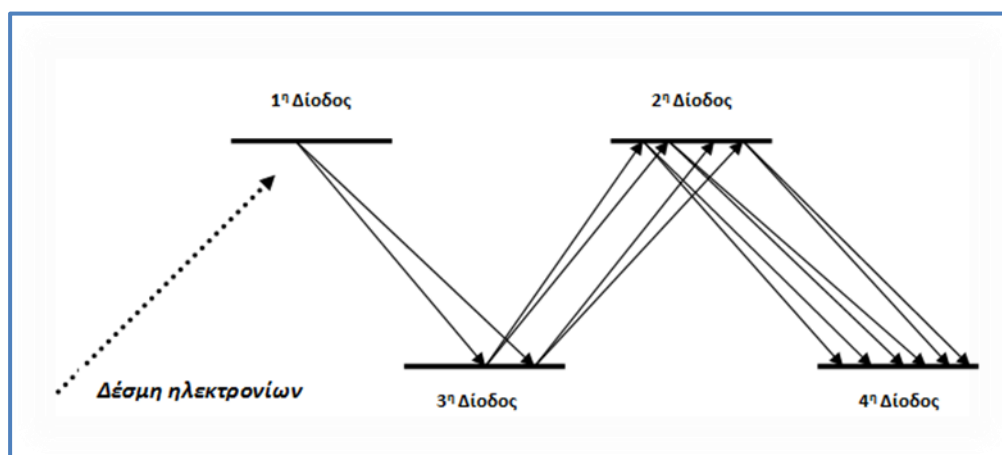
Εικόνα 4: Διάταξη αναλυτή μαγνητικού τομέα (59)

### 3.3 Ανιχνευτές

Ο ανιχνευτής είναι το μέρος εκείνο του φασματομέτρου στο οποίο καταλήγουν τα ιόντα αφού έχει γίνει ο διαχωρισμός τους σύμφωνα με τον λόγο μάζας προς φορτίο. Όταν τα ιόντα φεύγουν από τον αναλυτή μάζας, χτυπάνε σε έναν ανιχνευτή ο οποίος δημιουργεί ένα συνονθύλευμα ηλεκτρονίων ή φωτονίων για την παραγωγή σήματος. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη με την αφθονία των ιόντων ενός συγκεκριμένου  $m/z$ .

#### 3.3.1 Ηλεκτρονοπολλαπλασιαστής

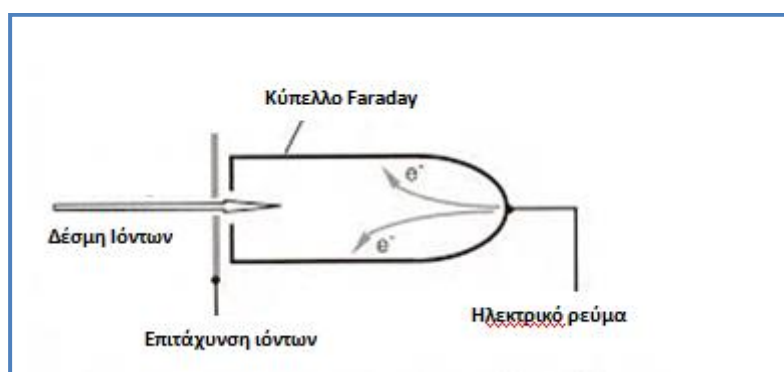
Ο πολλαπλασιαστής ηλεκτρονίων αποτελείται από μία σειρά ηλεκτροδίων (δύνοδοι) συνήθως συστάσεως κράματος χαλκού-βηρυλλίου (Cu-Be). Οι δύνοδοι λειτουργούν σε ηλεκτρικό δυναμικό της τάξεως των 1-3 kV και στοχεύουν στην ενίσχυση των μικρού ρεύματος ιόντων από  $10^{-9}$  σε  $10^{-13}$  A. Η δέσμη ιόντων εστιάζεται πρώτα σε ένα δυναμικό μετατροπής όπου με την πρόσκρουση των ιόντων πάνω στην μεταλλική επιφάνεια γίνεται δευτερογενής εκπομπή ηλεκτρονίων τα οποία κατευθύνονται και επιταχύνονται στην επόμενη δύνοδο παράγοντας περισσότερα ηλεκτρόνια και συνεχίζουν έως ότου φτάσουν σε μία άνοδο. Η τάση επιτάχυνσης αυξάνεται διαδοχικά στην κάθε δύνοδο ώστε στο τέλος να παραχθεί ένα μετρήσιμο ρεύμα λόγω συσσωρεύσεως μεγάλου πληθυσμού ηλεκτρονίων. Η πληθώρα ηλεκτρονίων συλλέγεται ως ηλεκτρικό ρεύμα στην άνοδο και το ηλεκτρικό ρεύμα μετατρέπεται σε σήμα με την χρήση του κατάλληλου λογισμικού (48,49,58).



Εικόνα 5: Διάταξη ηλεκτρονοπολλαπλασιαστή (50)

### 3.3.2 Ανιχνευτής κυπέλλου Faraday

Ο ανιχνευτής κυπέλλου Faraday αποτελείται από μία γειωμένη μεταλλική κοιλότητα. Τα ιόντα φέρουν ένα θετικό και ένα αρνητικό ηλεκτρικό φορτίο. Η δέσμη ιόντων πριν φτάσει στην είσοδο του κυπέλλου Faraday θα επιταχυνθεί και τα ιόντα θα προσκρούσουν με μεγάλη ταχύτητα πάνω στην γειωμένη μεταλλική επιφάνεια και θα αδρανοποιηθούν είτε με την προσφορά, είτε με την αποδοχή ηλεκτρονίων. Κατά την πρόσκρουση των ιόντων πάνω στην πλάκα εκλύονται ηλεκτρόνια τα οποία θα παράγουν ηλεκτρικό ρεύμα. Πίσω από την πλάκα υπάρχει ένα ηλεκτρόμετρο το οποίο καταγράφει το προσπίπτον ηλεκτρικό ρεύμα το ενισχύει και το αποδίδει ως σήμα. Κατά την πρόσκρουση όμως θα προκληθεί και η εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων και για αυτό χρησιμοποιείται συνδυαστικά το λεγόμενο κύπελλο Faraday στο οποίο συλλέγονται τα δευτερογενή ηλεκτρόνια ώστε να μην επηρεαστεί το σήμα (50).



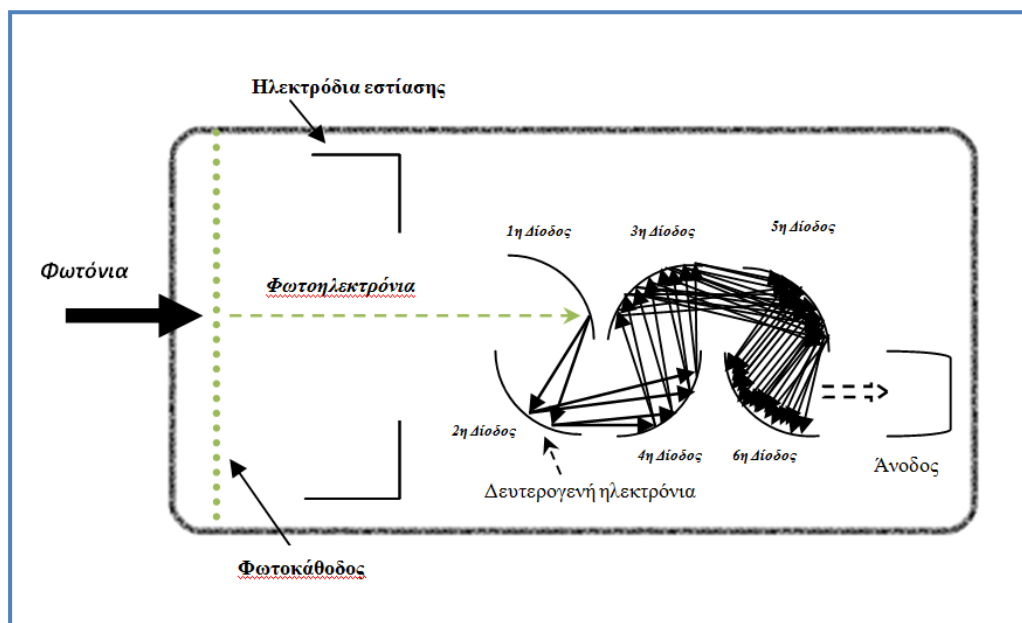
Εικόνα 6: Διάταξη ανιχνευτή κυπέλλου Faraday (60)

### 3.3.3 Ανιχνευτής Daly

Η δέσμη ιόντων προσκρούεται σε μία δύνοδο ενός ηλεκτρονιακού πολλαπλασιαστή και γίνεται η εκπομπή δευτερογενών ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται προς μία δεύτερη δύνοδο που καλείται σπινθηριστής και στην συγκεκριμένη περίπτωση είναι επικαλυμμένη με μία ουσία (συνήθως φώσφορο) που εκπέμπει φωτόνια. Το εκπεμπόμενο φως ανιχνεύεται από έναν φωτοπολλαπλασιαστή και μετατρέπεται σε ηλεκτρικό ρεύμα το οποίο δίνει το σήμα.(50)

### 3.3.4 Φωτοπολλαπλασιαστής

Τα φωτόνια εισέρχονται μέσα σε έναν γυάλινο σωλήνα που βρίσκεται υπό κενό και προσκρούουν πάνω σε μία φωτοκάθοδο. Σκοπός της ύπαρξης της φωτοκάθοδου είναι η εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Τα φωτοηλεκτρόνια εστιάζονται και επιταχύνονται με την βοήθεια των ηλεκτρονίων εστίασης στην πρώτη δύνοδο ενός ηλεκτρονικού πολλαπλασιαστή. Σύμφωνα με την αρχή λειτουργίας του ηλεκτρονικού πολλαπλασιαστή καθώς τα φωτοηλεκτρόνια προσπίπτουν πάνω στην πρώτη δύνοδο πραγματοποιείται δευτερογενής εκπομπή ηλεκτρονίων τα οποία κατευθύνονται και επιταχύνονται στην επόμενη δύνοδο παράγοντας περισσότερα ηλεκτρόνια και συνεχίζουν έως ότου φτάσουν σε μία άνοδο. Η πληθώρα ηλεκτρονίων συλλέγεται ως ηλεκτρικό ρεύμα στην άνοδο και το ηλεκτρικό ρεύμα μετατρέπεται σε σήμα με την χρήση του κατάλληλου λογισμικού (61).



Εικόνα 7: Διάταξη φωτοπολλαπλασιαστή (62)

### 3.4 Τεχνικές ανάλυσης στην φασματομετρία μαζών

Οι κύριες τεχνικές ανάλυσης που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών είναι: η τεχνική πλήρους σάρωσης (FS-Full Scan), η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ενός ιόντος (SIM-Single Ion Monitoring), και τέλος η φασματοσκοπία μαζών σε σειρά (MS/MS -Tandem Mass Spectrometry), η οποία με την σειρά της υποδιαιρείται σε άλλες μικρότερες κατηγορίες τεχνικών σάρωσης, όπως για παράδειγμα η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης αντιδράσεων (SRM-Selected Reaction Monitoring), η σάρωση θυγατρικών ιόντων, η σάρωση μητρικού ιόντος και τέλος η σάρωση ανίχνευσης της απώλειας ουδέτερου μορίου.

#### 3.4.1 Τεχνική πλήρους σάρωσης (Full Scan)

Η τεχνική της πλήρους σάρωσης χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό αγνώστων ενώσεων όπου και είναι αναγκαία η καταγραφή του ολικού φάσματος. Κατά την ανάλυση πλήρους σάρωσης ανιχνεύονται όλα εκείνα τα ιόντα μίας προκαθορισμένης περιοχής μαζών πάνω από ένα δεδομένο όριο έντασης και για συγκεκριμένο χρονικό εύρος (63,64).

#### 3.4.2 Τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ενός ιόντος ( Single Ion Monitoring)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται όταν γίνεται ειδική αναζήτηση για προκαθορισμένες ουσίες με γνωστούς λόγους  $m/z$  και η ποσοτικοποίηση αυτών. Στην λειτουργία αυτή επιλέγονται τα πιο χαρακτηριστικά ιόντα της υπό διερεύνηση ουσίας (μεγάλης μάζας/υψηλής έντασης). Σε αυτήν την προσέγγιση αποδίδεται όχι μόνο ο χρόνος κατακράτησης αλλά επίσης και σημαντικές πληροφορίες σχετικά με την παρουσία των χαρακτηριστικών ιόντων της ένωσης και λόγω αυτού βελτιώνεται η εκλεκτικότητα της διαδικασίας και ως εκ τούτου η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων και η χαμηλή ευαισθησία. Στην ανάλυση SIM συνήθως επιλέγονται δύο ιόντα της ένωσης. Το ένα το οποίο αποκαλείται μητρικό ιόν και είναι υψηλής έντασης και μάζας και το οποίο ποσοτικοποιείται, ενώ το δεύτερο καλείται θυγατρικό ιόν και βοηθάει αποκλειστικά στην επιβεβαίωση της ένωσης (63,64).

### 3.4.3 Φασματοσκοπία μάζας σε σειρά (Tandem mass spectroscopy)

Η φασματοσκοπία μάζας σε σειρά χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο, λόγω της ύπαρξης υπερβολικού χημικού θορύβου σε εκχυλίσματα που λαμβάνονται από βιολογικά δείγματα, τρόφιμα, έδαφος κ.α. Αυτό συνεπάγει την αδυναμία ανίχνευσης και προσδιορισμού των αναλύτων με ακρίβεια και έχει ως αποτέλεσμα την αβεβαιότητα ως προς την αξιοπιστία του αποτελέσματος, λόγω παρουσίας υπερβολικών παρεμβολών και ακαθαρσιών (65).

Η φασματοσκοπία μάζας σε σειρά περιλαμβάνει την σύζευξη αναλυτών μάζας σε διαδοχική διάταξη κατά την οποία τα ιόντα υποβάλλονται σε δύο ή περισσότερα διαδοχικά στάδια ανάλυσης. Ένα κλασικό παράδειγμα σύζευξης διαδοχικών αναλυτών μάζας είναι η χρήση του τριπλού τετράπολου (QQQ). Στο πρώτο στάδιο το πρώτο τετράπολο Q1 εκτελεί ένα συγκεκριμένο καθαρισμό του δείγματος ώστε να καταστεί δυνατή η διάκριση των ιόντων "στόχων" και επιτρέπει να περάσουν μόνο ιόντα συγκεκριμένου λόγου  $m/z$ . Τα μητρικά ιόντα τότε εισέρχονται σε μία κυψέλη θραύσης η οποία είναι πληρωμένη με ένα αέριο συγκρούσεων. Οι συγκρούσεις μεταξύ των μορίων των ιόντων και του αερίου επιτρέπουν στην μεταφορά επιπλέον ενέργειας στο μητρικό ιόν με αποτέλεσμα την διάρρηξη των δεσμών του και την εμφάνιση των θυγατρικών του ιόντων. Το δεύτερο τετράπολο Q3 είναι αυτό το οποίο θα αναλύσει και θα καταγράψει τα θυγατρικά ιόντα και σύμφωνα με αυτά θα επικυρωθεί η ύπαρξη του αναλύτη. Η ταυτοποίηση των αναλύτων ενός μίγματος γίνεται είτε με την σύγκριση των φασματογραφημάτων με αυτά που υπάρχουν στις βάσεις δεδομένων είτε με την βοήθεια ενώσεων αναφοράς (50, 63, 65, 66).



Το τριπλό τετράπολο υποδιαιρείται σε τέσσερις τεχνικές σάρωσης :

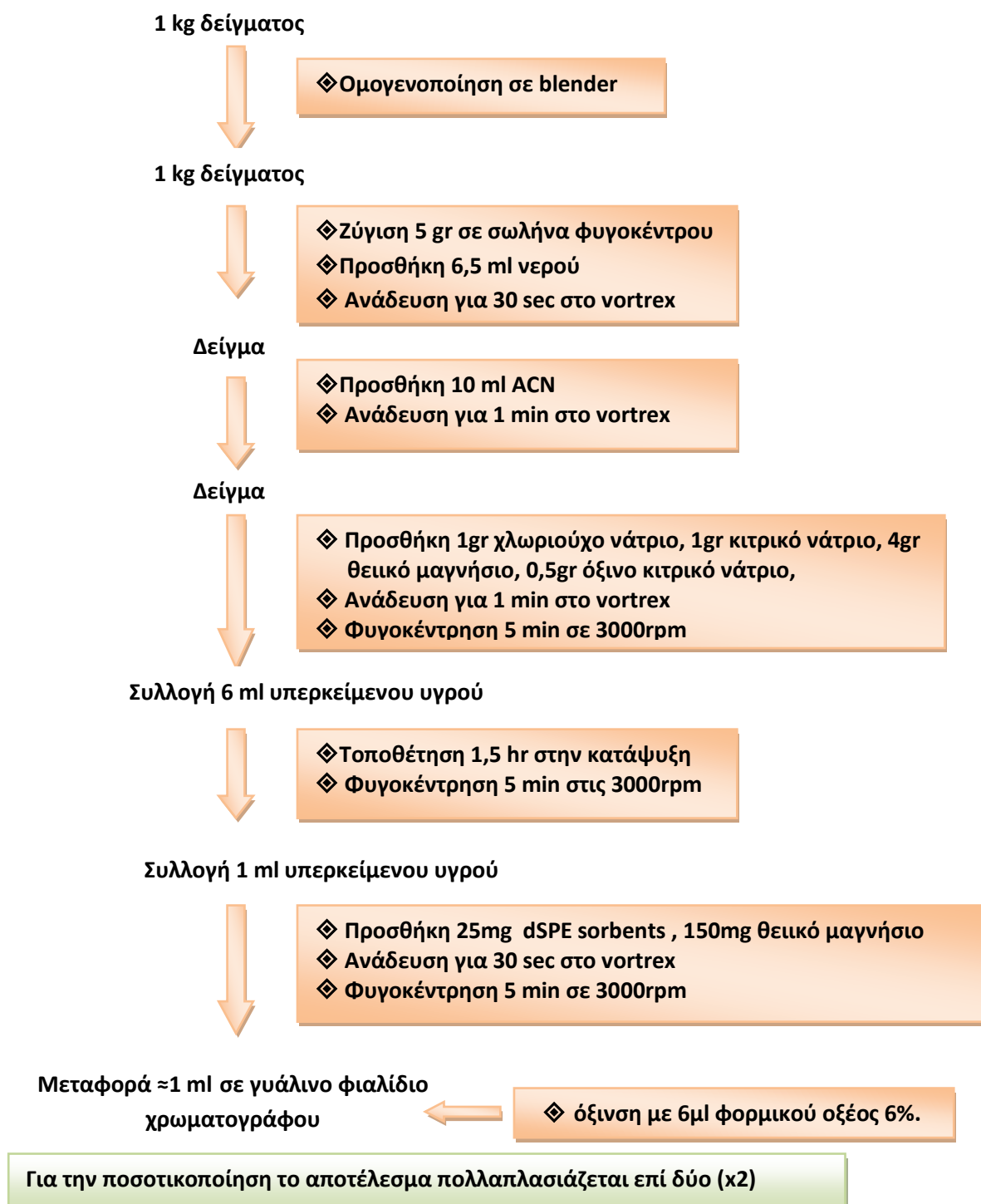
- ❖ **Σάρωση θυγατρικών ιόντων** στην οποία, στο πρώτο τετράπολο Q1 επιλέγεται ενός συγκεκριμένου  $m/z$  μητρικό ιόν, το οποίο συνεχίζει στον χώρο θραύσης, θραυσματοποιείται και περνάει στο τετράπολο Q3 το οποίο δουλεύει σε πλήρη σάρωση και σαρώνει όλα τα παραγόμενα θυγατρικά ιόντα (67).
- ❖ **Σάρωση μητρικών ιόντων** στην οποία το πρώτο τετράπολο Q1 δουλεύει σε πλήρη σάρωση, τα ιόντα μεταφέρονται και θραυσματοποιούνται στην κυψέλη θραύσης και τέλος στο δεύτερο τετράπολο Q3 επιτρέπει να φτάσουν στον ανιχνευτή μόνο τα θυγατρικά ιόντα συγκεκριμένου  $m/z$  . Ο ανιχνευτής δίνει σήμα μόνο εφόσον στο Q1 υπάρχει το μητρικό ιόν της ένωσης στόχου και στο Q3 υπάρχουν τα θυγατρικά ιόντα αυτού (68).
- ❖ **Σάρωση ανίχνευσης απώλειας ουδέτερου μορίου** η οποία λειτουργεί πραγματοποιώντας σάρωση και στα δύο τετράπολα τα οποία ορίζονται να έχουν μία συνεχή διαφορά μάζας μεταξύ τους ( $m/z$  Q1 >  $m/z$  Q3). Στην συγκεκριμένη περίπτωση σάρωσης ανιχνεύονται μόνο τα ιόντα τα οποία χάνουν μία γνωστή μάζα στην κυψελίδα θραύσης (68).
- ❖ **Επιλεκτική παρακολούθηση αντιδράσεων** κατά την οποία παρακολουθείται όλη η πορεία της αντίδρασης ενός προκαθορισμένου μητρικού ιόντος συγκεκριμένου λόγου  $m/z$  στο Q1, την θραυσματοποίηση του και τέλος την σάρωση όλων των παραγόμενων θυγατρικών αυτού στο Q3 (68).

## Κεφάλαιο 4

### Ειδικό μέρος

#### 4.1 Μεθοδολογία εκχύλισης

Σύμφωνα με την τροποποιημένη μέθοδο Quechers (69) η οποία είναι ειδικά σχεδιασμένη για αβοκάντο ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:



Σχήμα 4. Διάγραμμα ροής μεθοδολογίας εκχύλισης Quechers σε αβοκάντο

## 4.2 Εξοπλισμός και Αντιδραστήρια

**Ο εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε για την προετοιμασία- εκχύλιση και ανάλυση υπολειμμάτων τριαζινών στο αβοκάντο ήταν ο ακόλουθος :**

- Ομογενοποιητής (mixer) (Thermomix, Vorwerk)
- Ζυγός EG300-3M του οίκου KERN (0,02-300g)
- Ζυγός XL-810 του οίκου DENVER (0,01-1810g)
- Ζυγός ακριβείας πέντε δεκαδικών METTLER TOLEDO
- Αναδευτήρα (vortex) TK3S του οίκου technokartell
- Αναδευτήρα (vortex) VORTEX 3 S000 του οίκου IKA
- Αναδευτήρας 16 θέσεων (minishaker ) RSLAB-6 PRO του οίκου Technokartell
- Αναδευτήρας 14 θέσεων (minishaker ) MS2 του οίκου IKA
- Φυγόκεντρο laboratory centrifuges του οίκου Sigma 6 K 16.000 τουλάχιστον στροφών/min με ελεγχόμενη θερμοκρασία.
- Συσσκευή υπερήχων (ultrasonic bath) του οίκου Clifton
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας Finnigan Surveyor της εταιρίας Thermo Fisher Scientific
- Φασματογράφος μάζας τριπλού τετραπόλου συζευγμένος Finnigan TSQ Quantum Discovery max της εταιρίας Thermo Fisher Scientific
- Γεννήτρια Αζώτου, καθαρότητας 99.5% (PEAK Scientific)
- Μηχανική αντλία χαμηλού θορύβου για το σύστημα κενού της EDWARD 30.
- Στήλη Thermo Aquacil C18 (50 mm x 2.1 mm, particle size 3 $\mu$ m) (Thermo Fisher Scientific)
- Προσθήλη Hypersil gold (10 mm x 4mm, particle size 5 $\mu$ m) (Thermo Fisher Scientific)
- Προσθήλη Thermo HyPurity C18 (10 mm x 2.1 mm, particle size 5 $\mu$ m) (Thermo Fisher Scientific)
- Σωλήνες φυγόκεντρου πολυπροπυλενίου των 50ml και των 2 ml
- Σύριγγες διήθησης δείγματος του 1ml

- Φίλτρα διηθήσεως δείγματος (PTFE, 0.45μm, 4mm)
- Αυτόματες πιπέτες BRAND 1-10ml, 10-100 μl, 100-1000 μl
- Ποτήρια ζέσεως των 100 ml
- Ογκομετρικές φιάλες των 5, 10 ml για την παρασκευή των διαλυμάτων
- Ογκομετρικοί κύλινδροι των 1000ml
- Γυάλινα φιαλίδια χρωματογράφου των 2 ml
- Γυάλινα σκοτεινόχρωμα φιαλίδια προτύπων

**Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα αντιδραστήρια :**

- Ακετονιτρίλιο καθαρότητας HPLC grade PESTANAL (Riedel-de Haen)
- Υπερκάθαρο νερό καθαρότητας HPLC (VWR chemicals)
- Μεθανόλη καθαρότητας HPLC (VWR chemicals)
- Νερό καθαρότητας LC-MS (VWR chemicals)
- Μεθανόλη καθαρότητας LC-MS (VWR chemicals)
- Θειικό μαγνήσιο ( Panreac Applichem)
- Χλωριούχο Νάτριο (VWR chemicals)
- Κιτρικό νάτριο (VWR chemicals)
- Μονόξινο κιτρικό νάτριο (Sigma aldrich)
- Υδροξείδιο του νατρίου, PSA (Supelco)
- Φορμικό αμμώνιο (PRS Panreac QUIMICA SA)
- Φορμικό οξύ 98% (Sigma aldrich)
- Πρότυπες δραστικές :

➤ Simazine 99,1%	(Dr. Ehrenstorfer)
➤ Terbutylazine 99,4%	(Sigma Aldrich)
➤ Ametryn 99,5%	(Chem Service)
➤ Atrazine 99,1%	(Sigma Aldrich)
➤ Cyanazine 99%	(Dr. Ehrenstorfer)
➤ Cyromazine 98,8%	(Analytical Standard)
➤ Pymetrozine 99,9%	(Sigma Aldrich)
➤ Terbutryn 99,1%	(Riedel)

- Διαλύματα προτύπων υλικών αναφοράς συγκέντρωσης 1000μg/ml

- Αργό (Ar) καθαρότητας χρωματογραφίας (99,999%)

### 4.3 Χρωματογραφική ανάλυση

Οι αναλύσεις έγιναν σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας-φασματογραφίας μάζας.

Ο υγρός χρωματογράφος Finnigan Surveyor αποτελείται από τα εξής επιμέρους τμήματα :

1) Τον υποδοχέα δυνατότητας τεσσάρων γυάλινων φιαλών διαλυτών

Κινητή Φάση (Mobile Phase)

- A: Νερό 1000ml με 5mM Φορμικό Αμμώνιο
- B: Μεθανόλη 1000ml με 5mM Φορμικό Αμμώνιο
- C: μεθανόλη/νερό σε αναλογία 70/30 για πλύσιμο

2) Αντλία λειτουργίας βαθμιδωτής έκλουσης τεσσάρων διαλυτών. Έχει οριστεί ένα πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (gradient) με ροή της κινητής φάσης σε 0.5 ml/min.

**Συνθήκες βαθμιδωτής έκλουσης**

Χρόνος (min)	A%	B%
0	90	10
3.5	90	10
8	0	100
10.5	0	100
10.6	90	10
16.5	90	10

Η συνολική διάρκεια του προγράμματος της βαθμιδωτής έκλουσης είναι τα 16.5 min. Από 0-1.40 min μέσω βαλβίδας η ροή κατευθύνεται στα απόβλητα. Μετά από το 1.40-16.00 min η ροή κατευθύνεται στην στήλη, και τέλος 16.00-16.50 min η ροή εξέρχεται στα απόβλητα.

3) Θερμοστατούμενος θάλαμος στηλών ρυθμισμένος στους 40°C.

4) Στήλη Aquacil C18 (50 mm x 2.1 mm, particle size 3μm) συνδεδεμένη με μία προστήλη Hypercil gold (10 mm x 4mm, particle size 5μm) και μία προστήλη Thermo HyPurity C18 (10 mm x 2.1 mm, particle size 5μm)

5) Αυτόματος δειγματολήπτης 200 θέσεων ρυθμισμένος στους 20°C. Ο όγκος έγχυσης των δειγμάτων έχει οριστεί στα 10μL.

Ο φασματογράφος μάζας Finnigan TSQ Quantum Discovery Max περιέχει τα εξής επιμέρους τμήματα:

1) Την πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI). Η θερμοκρασία στο κώνο και η τάση της βελόνας ψεκασμού έχουν ρυθμιστεί 350°C και 3700V. Το αέριο νεφελοποίησης λειτουργεί στα 65 psi ενώ το αέριο ξήρανσης στα 25 psi. Η πίεση διάσπασης έχει οριστεί στο 1.5 mTorr.

2) Τον αναλυτή μάζας τριπλού τετραπόλου με επιλεγμένη λειτουργία σάρωσης την παρακολούθηση θυγατρικών ιόντων. Το πρώτο τετράπολο αφήνει να περάσουν μόνο επιλεγμένα μητρικά ιόντα. Τα μητρικά ιόντα περνάνε στην κυψελίδα θραύσης και θραυσματοποιούνται τα θυγατρικά ιόντα και τέλος στο τρίτο τετράπολο μεταφέρονται μόνο τα θυγατρικά ιόντα των ουσιών ενδιαφέροντος ώστε να γίνει η σάρωση και η καταγραφή αυτών.

3) Ο έλεγχος του συστήματος φασματογραφίας μάζας και η επεξεργασία των δεδομένων γίνεται με τα υπολογιστικά προγράμματα XCalibur Software Ver. 2.1 & FreeStyle Ver. 1.6.

## 4.4 Προϋποθέσεις επικύρωσης

Για να γίνει η επικύρωση μιας μεθόδου θα πρέπει να εκτιμηθεί η επίδραση της μήτρας, η γραμμικότητα, το όριο ανίχνευσης LOD και το όριο ποσοτικοποίησης LOQ, η επιλεκτικότητα μέσω διαδικασιών αναγνώρισης-επιβεβαίωσης, η ανάκτηση και η RSD<sub>r</sub> (70). Τέλος υπολογίζεται η αβεβαιότητα της μεθόδου η οποία στην περίπτωση των φυτοφαρμάκων έχει οριστεί  $\pm 50\%$  του αποτελέσματος SANTE/12682/2019 πάραυτα υπολογίζεται αναλυτικά ώστε να αποδειχθεί ότι η μέθοδος βρίσκεται εντός αποδεκτών ορίων αβεβαιότητας. Τα κριτήρια επικύρωσης αναλύονται και τοποθετούνται μαζί με τα αποτελέσματα του πειράματος παρακάτω.

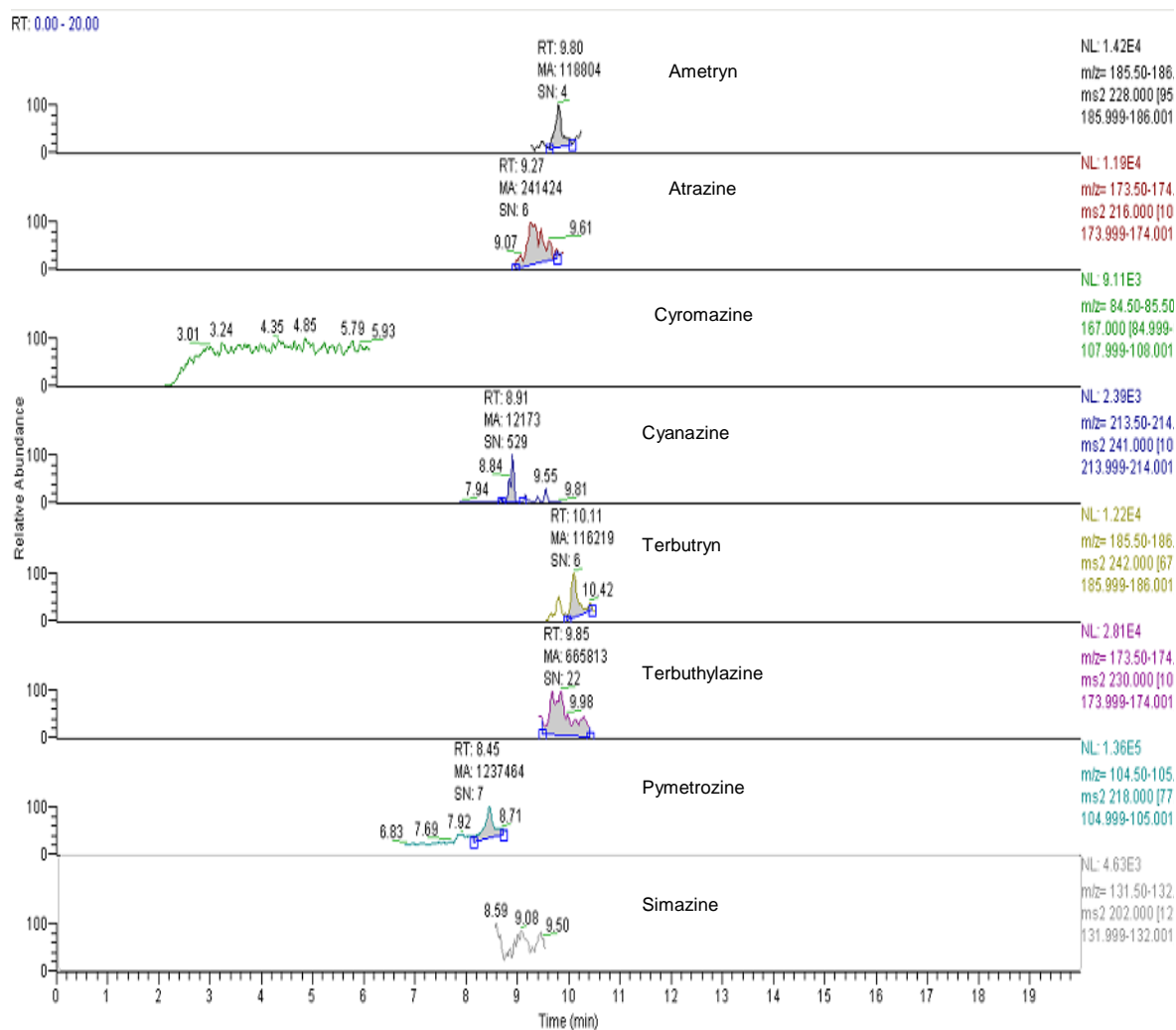
### 4.4.1 Μήτρα δείγματος

Η μήτρα του δείγματος είναι δυνατόν να περιέχει ουσίες οι οποίες να έχουν την ίδια χημική συμπεριφορά με αυτήν των αναλύτων. Οι ουσίες αυτές είτε αντιδρούν με τα αντιδραστήρια είτε μπορεί να προκαλούν αποκρίσεις στα αναλυτικά όργανα οι οποίες δεν μπορούν να διαχωριστούν από αυτές του αναλύτη. Οι παρεμποδίσσεις αυτές ονομάζονται επιδράσεις μήτρας και για αυτόν τον λόγο πριν χρησιμοποιηθεί η μήτρα του δείγματος ως ιστός για επικύρωση πρέπει να έχει ελεγχθεί εκ των προτέρων. Παρακάτω παρατίθεται το χρωματογράφημα το οποίο ανήκει στον ιστό του αβοκάντο που χρησιμοποιήθηκε για την επικύρωση των τριαζινών και το οποίο ελέγχθηκε από το ΠΚΠΦΠκΦΕ Θεσσαλονίκης.



Πίνακας 10. Πίνακας συνθηκών MS

<b>Συνθήκες MS</b>	
<b>Θερμοκρασία θαλάμου στηλών</b>	40° C
<b>Θερμοκρασία αυτόματου δειγματολήπτη</b>	20° C
<b>Όγκος έγχυσης</b>	10 µL
<b>Ροή κινητής φάσης</b>	0,5 ml/min
<b>Θερμοκρασία κώνου</b>	350° C
<b>Τάση βελόνας</b>	3700V
<b>Αέριο νεφελοποίησης</b>	65 psi
<b>Αέριο ξήρανσης</b>	25 psi
<b>Πίεσης αερίου διάσπασης</b>	1.5 mTorr
<b>Cycle time</b>	0.700 s
<b>Q1 peak width</b>	0.7u
<b>Q3 peak width</b>	0.7u



Σχήμα 5. Χρωματογράφημα των οκτώ ιόντων ποσοτικοποίησης (αριστερά) και των αντίστοιχων ιόντων επιβεβαίωσης (δεξιά) των τριαζινών της μήτρας του αβοκάντο.

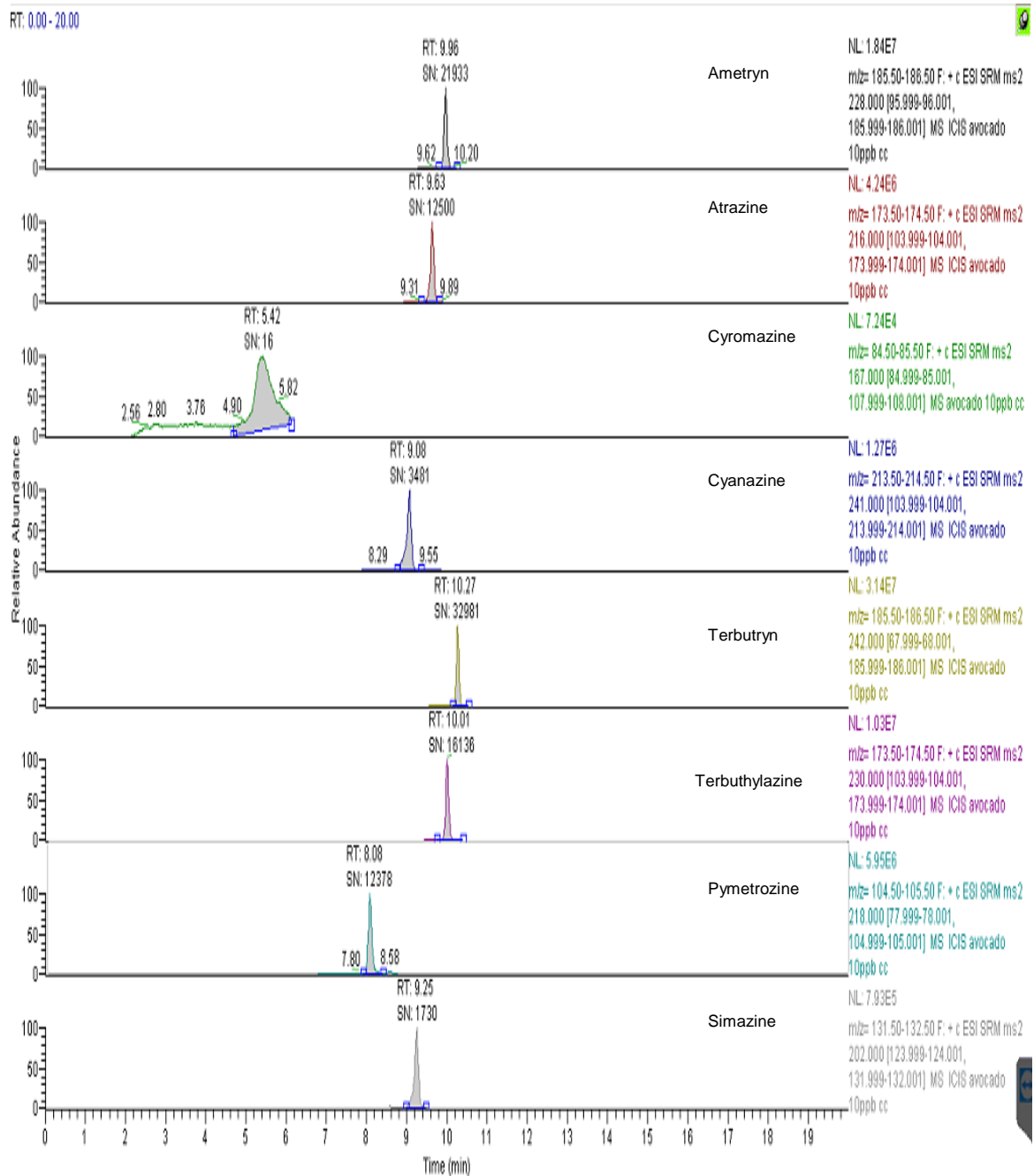
(Αποδείχθηκε η απουσία υπολειμμάτων τριαζινών λόγω πολύ μικρού σήματος των ιόντων ποσοτικοποίησης στο καθαρό δείγμα όπως φαίνεται και στο παραπάνω χρωματογράφημα ).

#### 4.4.2 Ταυτοποίηση ένωσης

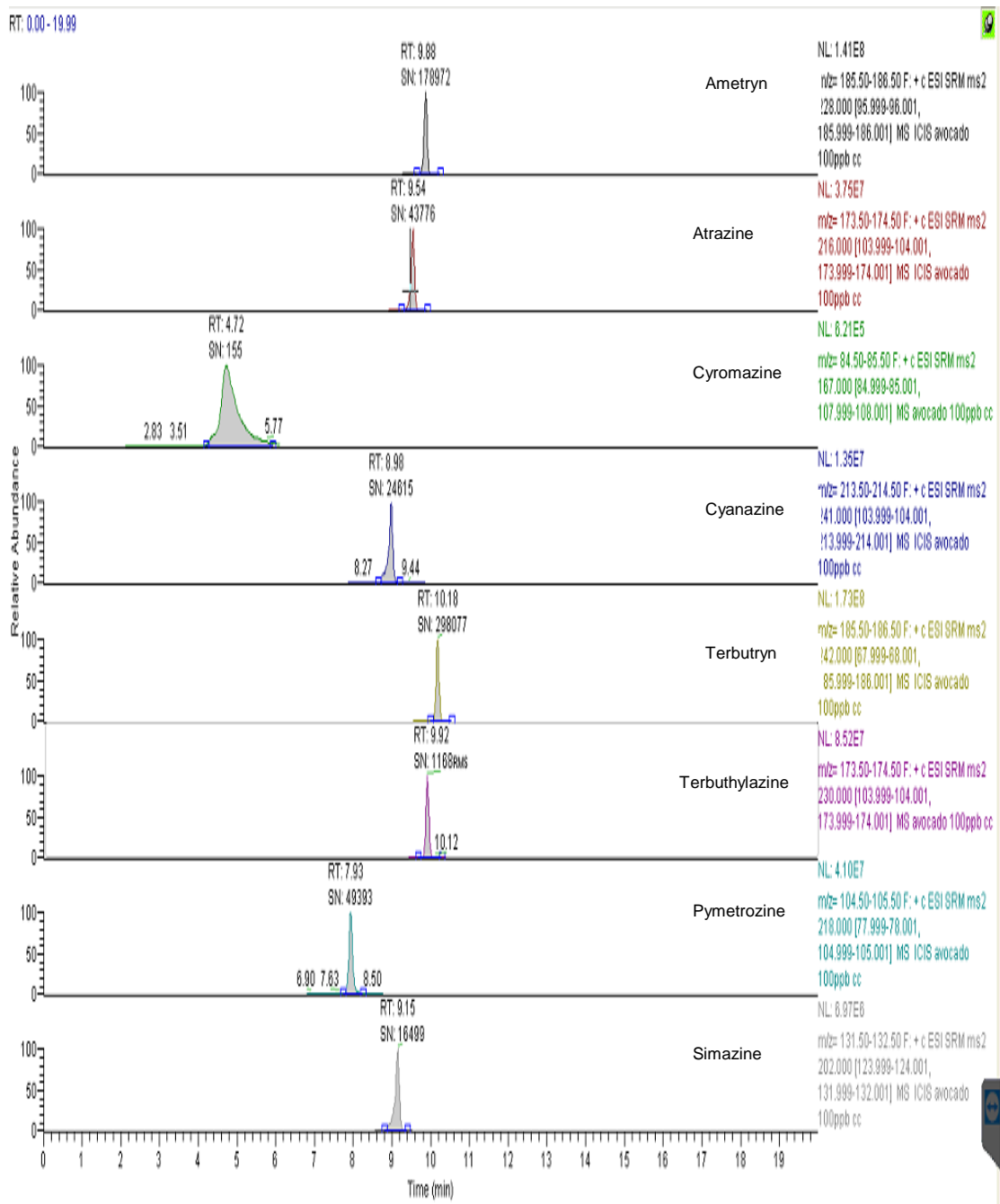
Η ταυτοποίηση μιας ένωσης πραγματοποιείται με την αναγνώριση της μάζας του μητρικού ιόντος και δύο θυγατρικών ιόντων του μητρικού ιόντος καθώς επίσης και της ταυτοποίησης του χρόνου κατακράτησης της ένωσης. Η ποσοτικοποίηση της ύποπτης ουσίας γίνεται με το ισχυρό θυγατρικό ιόν ενώ η επιβεβαίωση της ταυτότητας της ύποπτης ουσίας γίνεται με τη δεύτερη μετάπτωση και την αναλογία των εντάσεων των δύο θυγατρικών ιόντων (% Ion Ratio). Τα θυγατρικά ιόντα ή αλλιώς θραύσματα δημιουργούνται από την διάσπαση του μητρικού ιόντος και είναι χαρακτηριστικά της κάθε αναλυόμενης ουσίας. Ως θραύσμα ποσοτικοποίησης (quantifier ion ) θεωρείται συνήθως το θυγατρικό ιόν με την μεγαλύτερη ένταση και είναι αυτό με το οποίο γίνεται ο ποσοτικός προσδιορισμός της αναλυόμενης ουσίας ενώ ως θραύσμα επιβεβαίωσης (qualifier ion) το δεύτερο σε ένταση θυγατρικό ιόν που χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση της αναλυόμενης ουσίας σύμφωνα με τις προϋποθέσεις της SANTE/12682/2019 κατά την οποία απαιτούνται τουλάχιστον δύο ιόντα σε χρωματογραφική/φασματοσκοπική ανάλυση MS/MS .Οι μέγιστες επιτρεπόμενες τιμές ανοχής για την αναλογία των δύο μεταπτώσεων με τη χρήση φασματομετρικών τεχνικών είναι 30% σε σχέση με την ένταση των δύο θυγατρικών ιόντων που έχει βρεθεί από το πρότυπο διάλυμα (71). Ο απόλυτος χρόνος κατακράτησης της προς ταυτοποίηση ένωση πρέπει να συμπίπτει με το χρόνο κατακράτησης της ουσίας σε πρότυπο διάλυμα με μία ανοχή  $\pm 0.1 \text{ min}$  (71). Ενδεικτικά στον παρακάτω πίνακα παρατίθενται οι χρόνοι κατακράτησης των τριαζινών, τα m/z του θραύσματος ποσοτικοποίησης και επιβεβαίωσης και το % ion ratio των δύο θραυσμάτων ιόντων .

Πίνακας 11. Χρόνοι κατακράτησης, μητρικά ιόντα και θυγατρικά ιόντα στην μελέτη των τριαζινών.

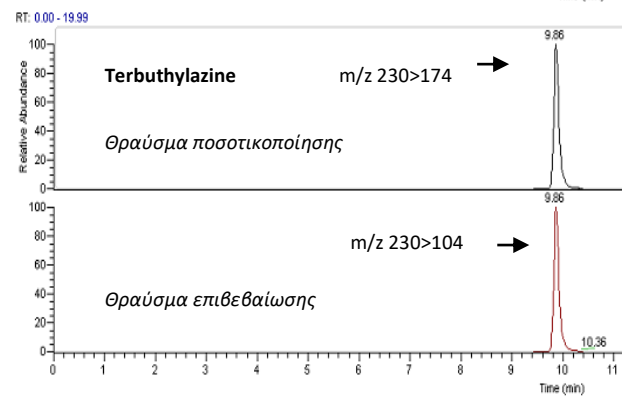
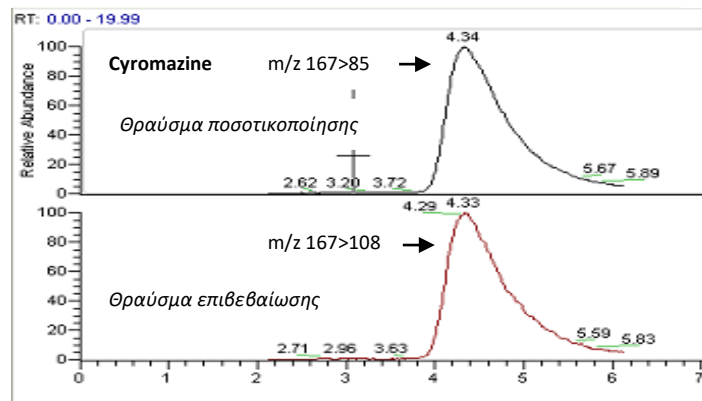
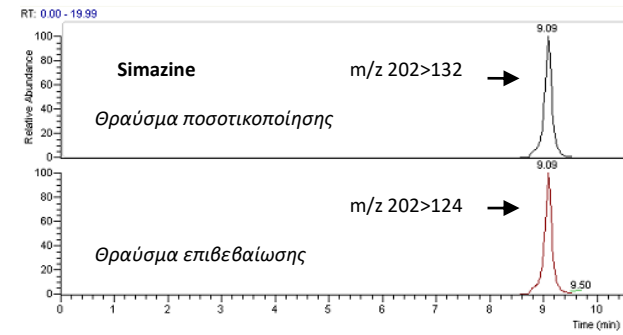
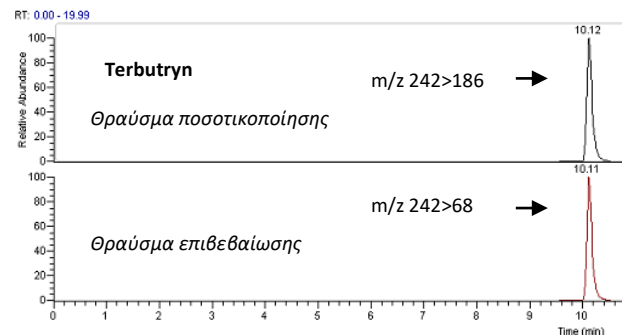
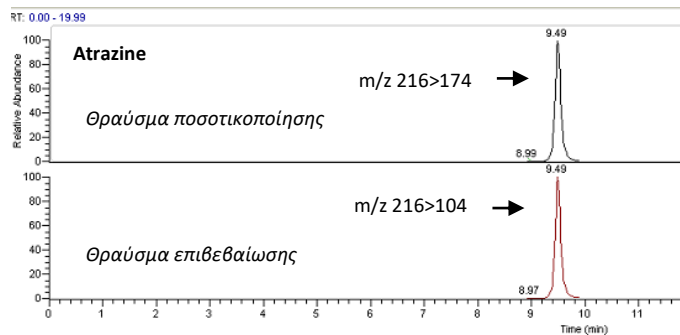
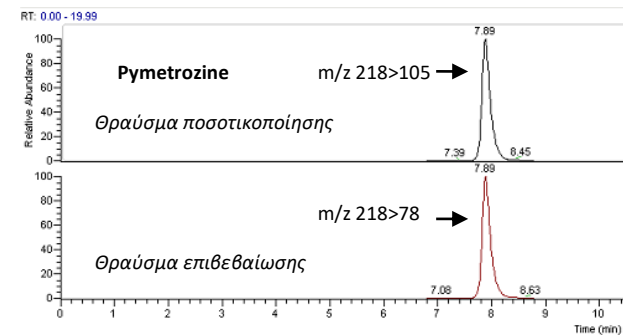
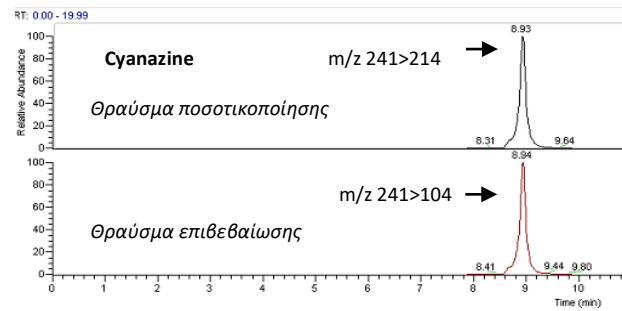
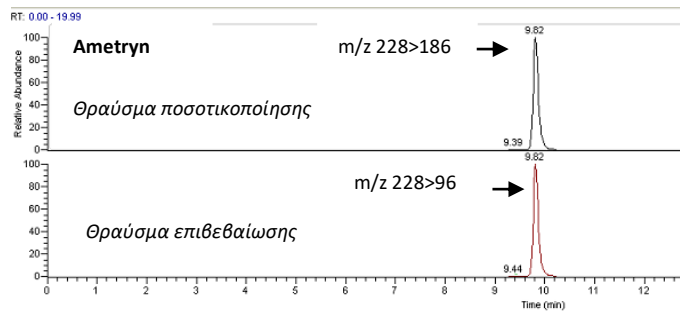
Δραστική ουσία	Χρόνος κατακράτησης (min)	Μητρικό ιόν (m/z)	Θραύσμα ποσοτικοποίησης (m/z)	Θραύσμα επιβεβαίωσης (m/z)	% ion Ratio
Ametryn	9.89	228	186	96	21,7
Atrazine	9.56	216	174	104	19,22
Cyromazine	4.61	167	85	108	32,27
Cyanazine	9.00	241	214	104	12,17
Terbutryn	10.21	242	186	68	27,85
Terbuthylazine	9.95	230	174	104	11,83
Pymetrozine	7.97	218	105	78	16,49
Simazine	9.05	202	132	124	87,16



Σχήμα 6. Χρωματογράφημα των οκτώ ιόντων ποσοτικοποίησης των τριαζινών επιφορτισμένου εκχυλίσματος αβοκάντο σε συγκέντρωση 10 ppb.



Σχήμα 7. Χρωματογράφημα των οκτώ ιόντων ποσοτικοποίησης των τριαζινών επιφοτισμένου εκχυλίσματος αβοκάντο σε συγκέντρωση 100 ppb.



Σχήμα 8.Χρωματογραφήματα ιόντων ποσοτικοποίησης-επιβεβαίωσης των θυγατρικών ιόντων των τριαζινών.

#### **4.4.3 Όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (Limit of quantification-LOQ)**

Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου είναι η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να υπολογιστεί ποσοτικά και να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Με βάση τον ΚΑΝ 396/2005 το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται στα 10 ppb, το οποίο είναι και το κατώτερο όριο των MRL σε πληθώρα φυτοφαρμάκων και το οποίο επιτεύχθηκε. Το εργαστήριο έχει ορίσει ως όριο ποσοτικοποίησης τα 10 ppb το οποίο είναι ίσο με το σημείο αναφοράς του εργαστηρίου .

#### **4.4.4 Όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Limit of detection-LOD)**

Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου αποτελεί την χαμηλότερη συγκέντρωση που μπορεί να ανιχνευτεί χωρίς να αποτελεί αξιόπιστη μέτρηση απλά αποτελεί μία ένδειξη ανίχνευσης πάνω από αυτή του τυφλού. Τα LOD μπορούν να υπολογιστούν με βάση την τυπική απόκλιση της απόκρισης ( $S_y$ ) της καμπύλης και την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης ( $S$ ) σε επίπεδα που προσεγγίζουν το LOD σύμφωνα με τον τύπο:  $LOD = 3.3 (S_y / S)$ . Η τυπική απόκλιση της απόκρισης μπορεί να προσδιοριστεί με βάση την τυπική απόκλιση των  $y$ -intercepts των γραμμών παλινδρόμησης. Σημείωση: η κλίση και το  $S$  μπορούν να ληφθούν με μία τάξη μεγέθους της καμπύλης βαθμονόμησης. Για τον υπολογισμό των LOD έγιναν 10 μετρήσεις σε συγκέντρωση 10 ppb το οποίο είναι το χαμηλότερο σημείο των καμπυλών αναφοράς αλλά και το όριο ποσοτικοποίησης. Υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση των 10 μετρήσεων η οποία διαιρέθηκε με την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης και πολλαπλασιάστηκε επί 3.3 όπως δίνεται από τον παραπάνω τύπο.



Πίνακας 12. Όρια ανίχνευσης της μεθόδου στην μελέτη των τριαζινών

<b>Φυτοφάρμακο</b>	<b>LOD (ppb)</b>
Ametryn	1,53
Atrazine	0,96
Cyromazine	4,44
Cyanazine	2,7
Terbutryn	1,88
Terbuthylazine	1,62
Pymetrozine	1,84
Simazine	2,52

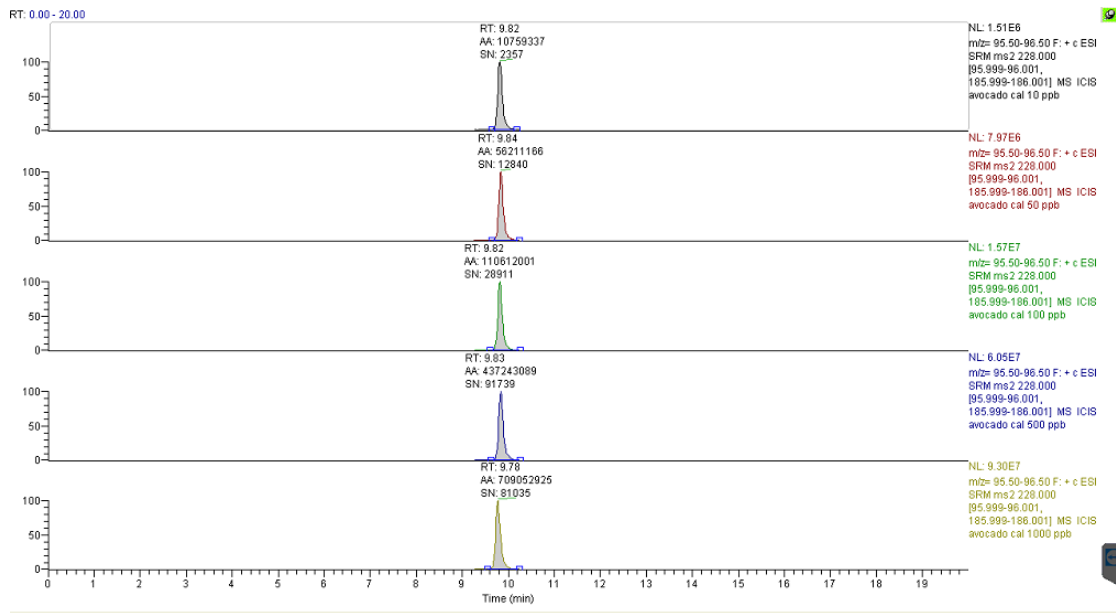
#### 4.4.5 Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα ελέγχεται με την δημιουργία καμπυλών αναφοράς για κάθε αναλυόμενη ουσία. Οι απαιτήσεις σύμφωνα με την SANTE/12682/2019 για την γραμμή βαθμονόμησης είναι ότι ο συντελεστής συσχέτισης πρέπει να είναι  $> 0,98$  και το χαμηλότερο επίπεδο βαθμονόμησης πρέπει να είναι ίσο ή χαμηλότερο από το όριο αναφοράς (RL-reporting level) . Για την παρασκευή των καμπυλών χρησιμοποιήθηκε καθαρό εκχύλισμα αβοκάντο. Οι πρότυπες ουσίες του simazine, atrazine, terbutylazine, cyanazine, ametryn ,terbutryn, pymetrozine και cyromazine είχαν καθαρότητα 99,1% ,99,1%, 99,4%, 99,0%, 99,5%, 99,1%, 99,9%, 98,8%, αντίστοιχα. Η διαδικασία παρασκευής της καμπύλης γίνεται αρχικά για την κάθε μία τριαζίνη ξεχωριστά από την παρασκευή ενός πυκνού διαλύματος συγκέντρωσης 1000μg/ml σε μεθανόλη. Το πυκνό διάλυμα αραιώνεται έως ότου να φτάσει στην επιθυμητή συγκέντρωση. Η καμπύλη που χρησιμοποιήθηκε περιελάμβανε τις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 500 και 1000 ppb. Για την παρασκευή της παραθέτονται αναλυτικά στον παρακάτω πίνακα οι αναλογίες που πάρθηκαν:

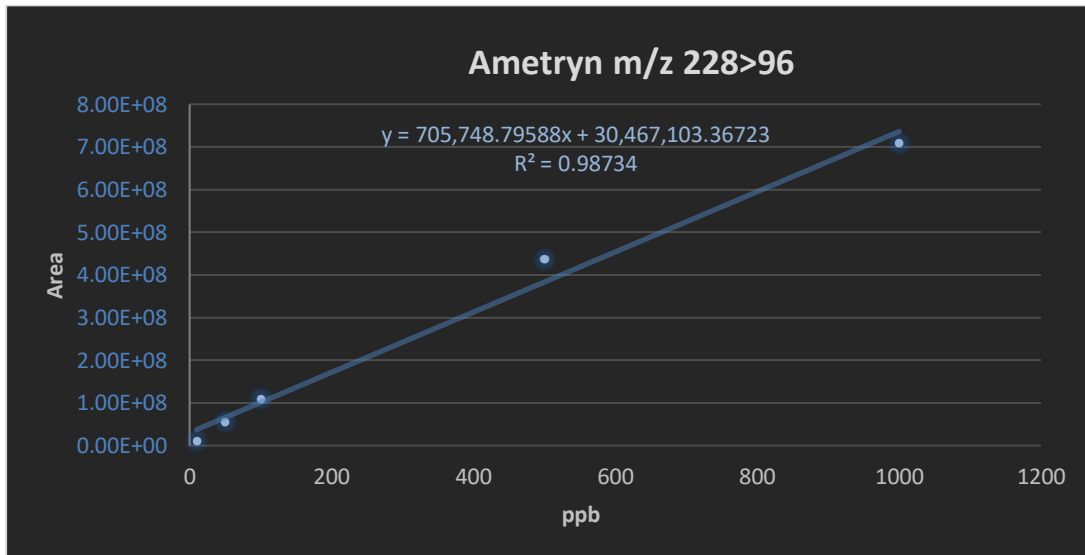
Πίνακας 13. Όγκος σε ml που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς

Συγκέντρωση καμπύλης αναφοράς ( ppb)	Διάλυμα συγκέντρωσης 10 μg/ml	Διάλυμα συγκέντρωσης 1 μg/ml	Εκχύλισμα μάρτυρα
10		10 μl	990 μl
50		50 μl	950 μl
100		100 μl	900 μl
500	50 μl		950 μl
1000	100 μl		900 μl

## Ametryn



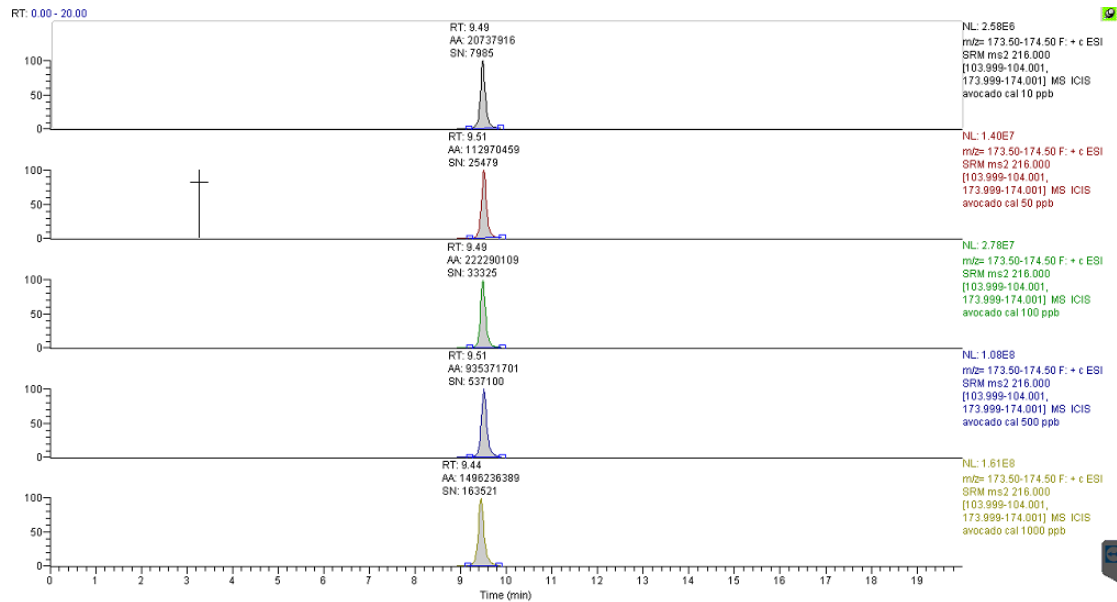
Σχήμα 9. Χρωματογραφήματα των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς του Ametryn



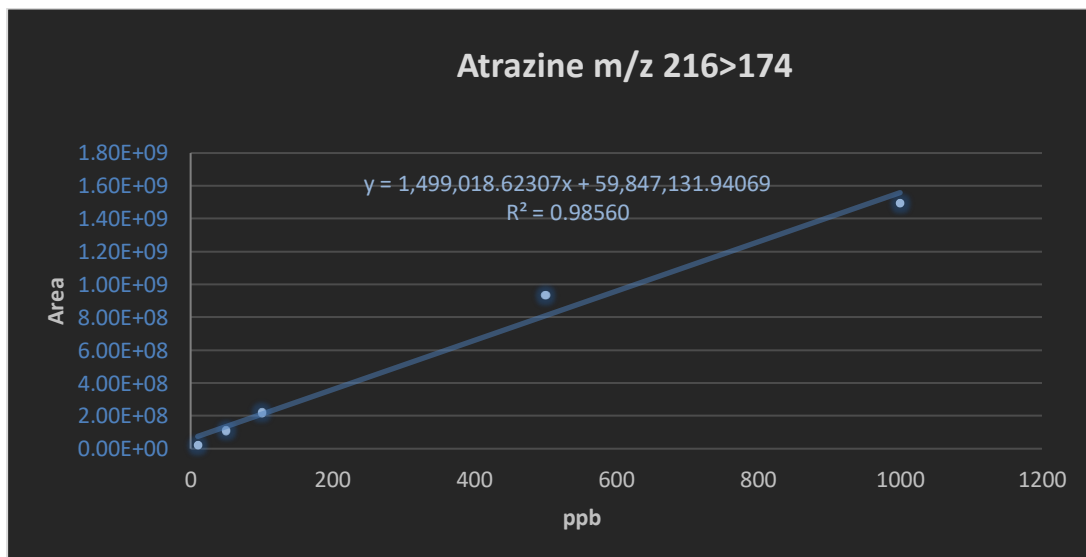
Σχήμα 10. Γραμμή αναφοράς Ametryn

\* Το ametryn λόγω υψηλού σήματος του ιόντος της μεγαλύτερης έντασης ( $m/z$  228>186) έδωσε αποκρίσεις που δεν ήταν αναλογικές των συγκεντρώσεων λόγω overload του αναλυτικού οργάνου. Έτσι χρησιμοποιήθηκε το δεύτερο σε ένταση θυγατρικό ιόν ( $m/z$  228>96) ως θραύσμα ποσοτικοποίησης.

# Atrazine

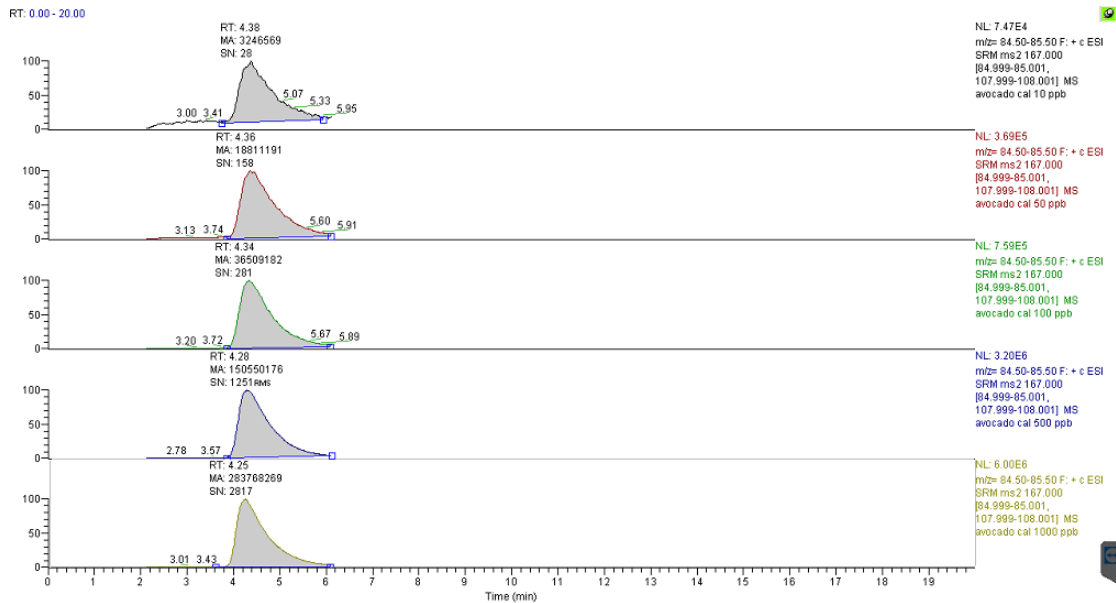


Σχήμα 11. Χρωματογραφήματα των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς του Atrazine

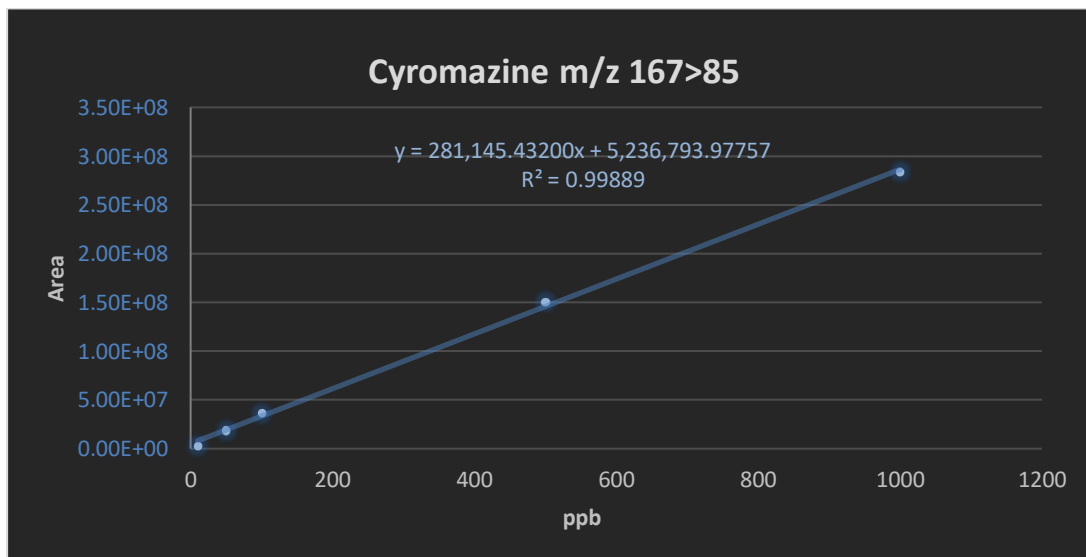


Σχήμα 12. Γραμμή αναφοράς Atrazine

# Cyromazine

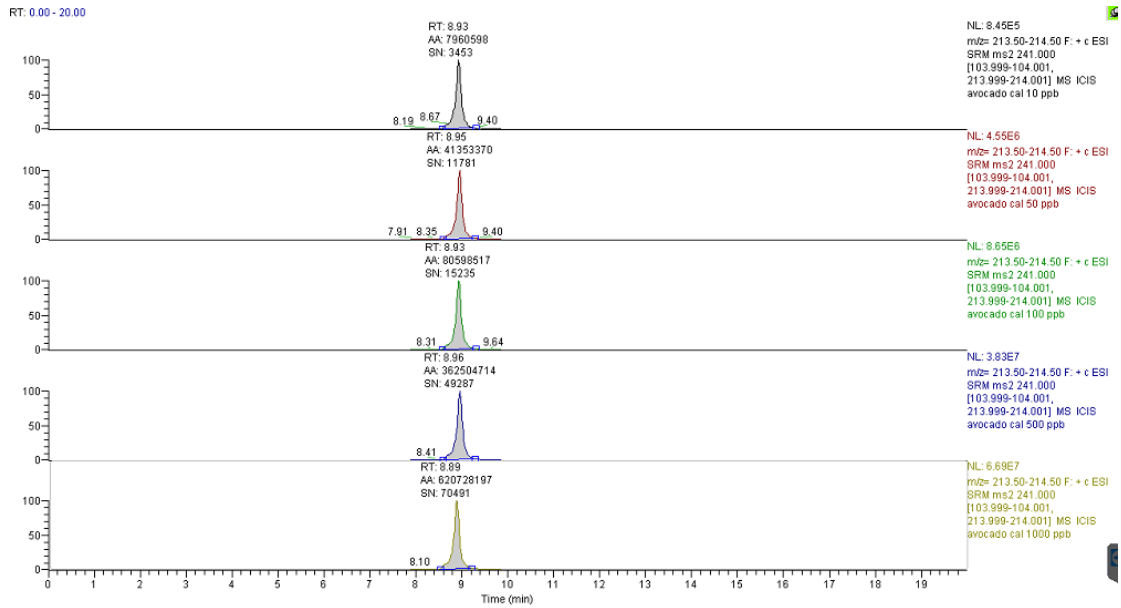


Σχήμα 13. Χρωματογραφήματα των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς του Cyromazine

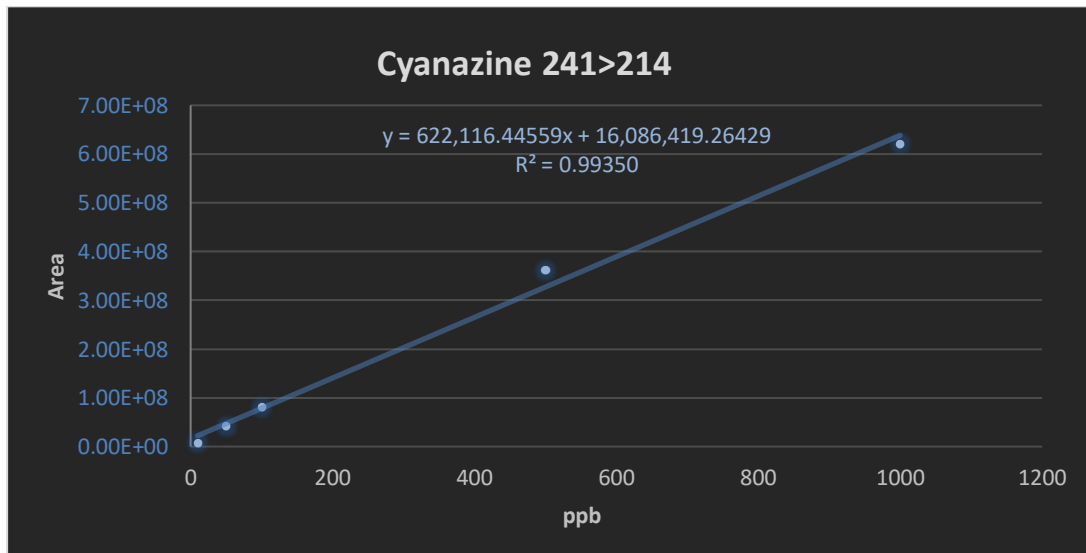


Σχήμα 14. Γραμμή αναφοράς Cyromazine

# Cyanazine

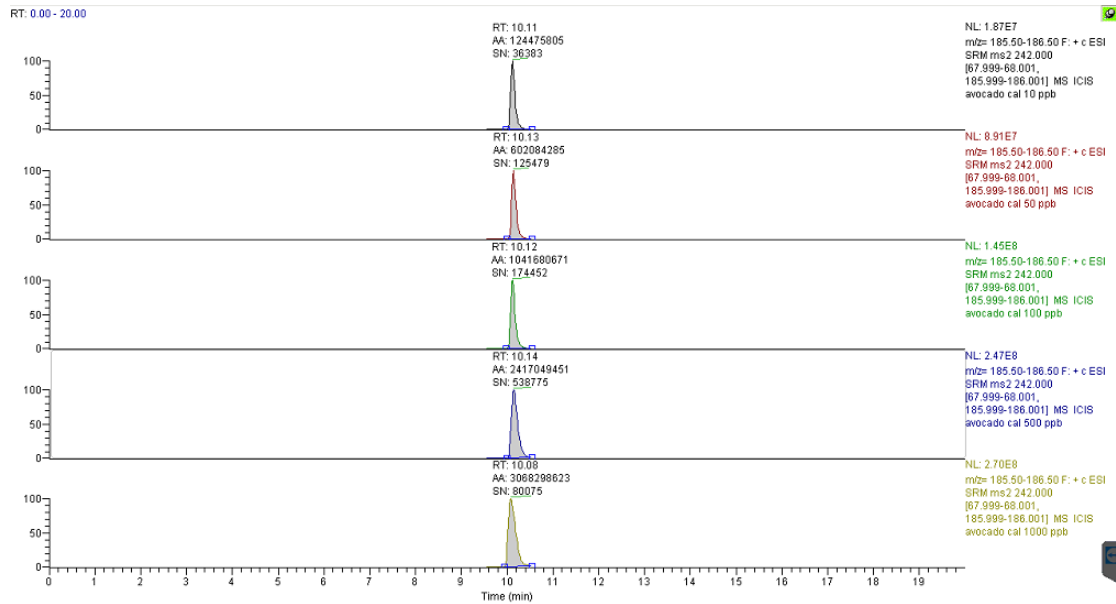


Σχήμα 15. Χρωματογραφήματα των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς του Cyanazine

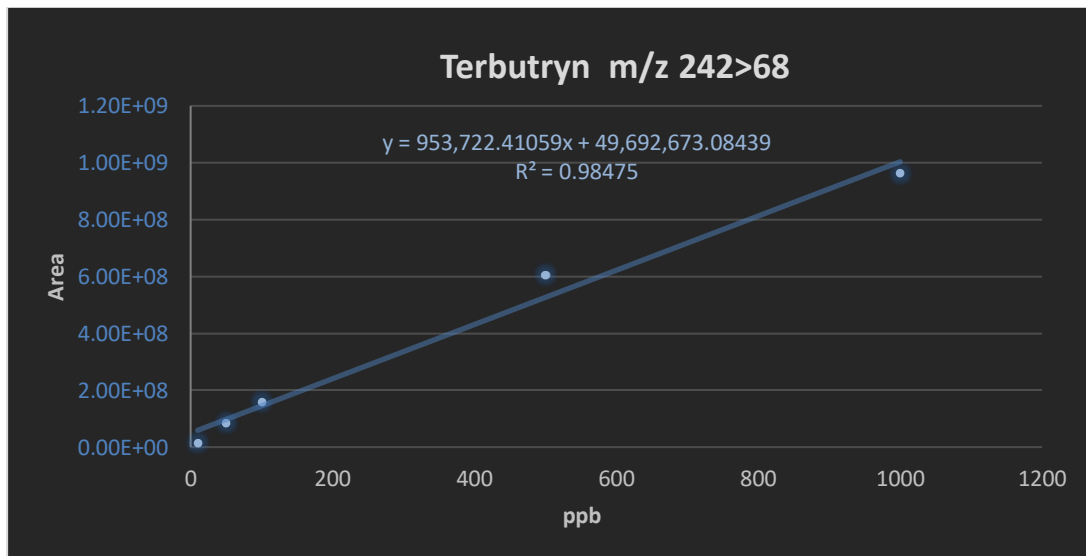


Σχήμα 16. Γραμμή αναφοράς Cyanazine

# Terbutryn



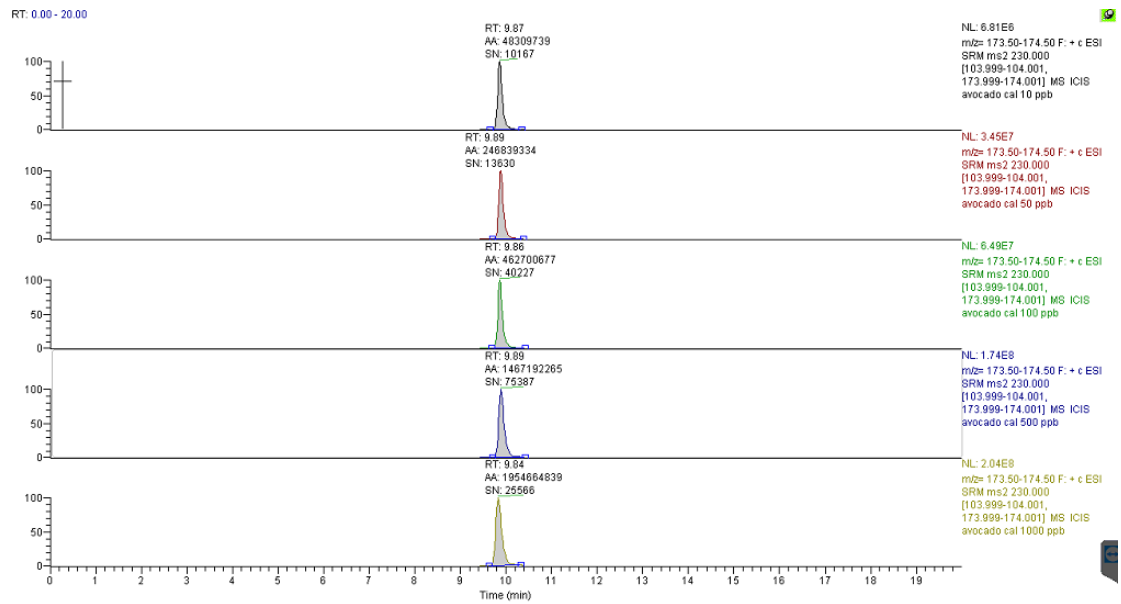
Σχήμα 17. Χρωματογραφήματα των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς του Terbutryn



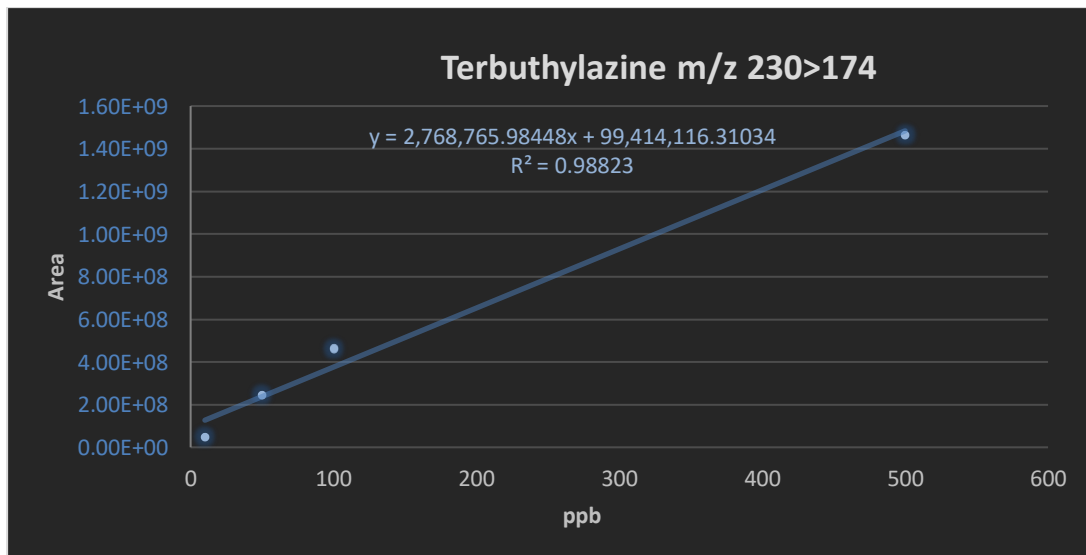
Σχήμα 18. Γραμμή αναφοράς Terbutryn

\* Το terbutryn λόγω υψηλού σήματος του ιόντος μεγαλύτερης έντασης ( $m/z$  242>186) έδωσε αποκρίσεις οι οποίες δεν ήταν αναλογικές των συγκεντρώσεων λόγω overload του αναλυτικού οργάνου. Έτσι χρησιμοποιήθηκε το δεύτερο σε ένταση θυγατρικό ιόν ( $m/z$  242>68) ως θραύσμα ποσοτικοποίησης.

# Terbutylazine



Σχήμα 19. Χρωματογραφήματα των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς του Terbutylazine

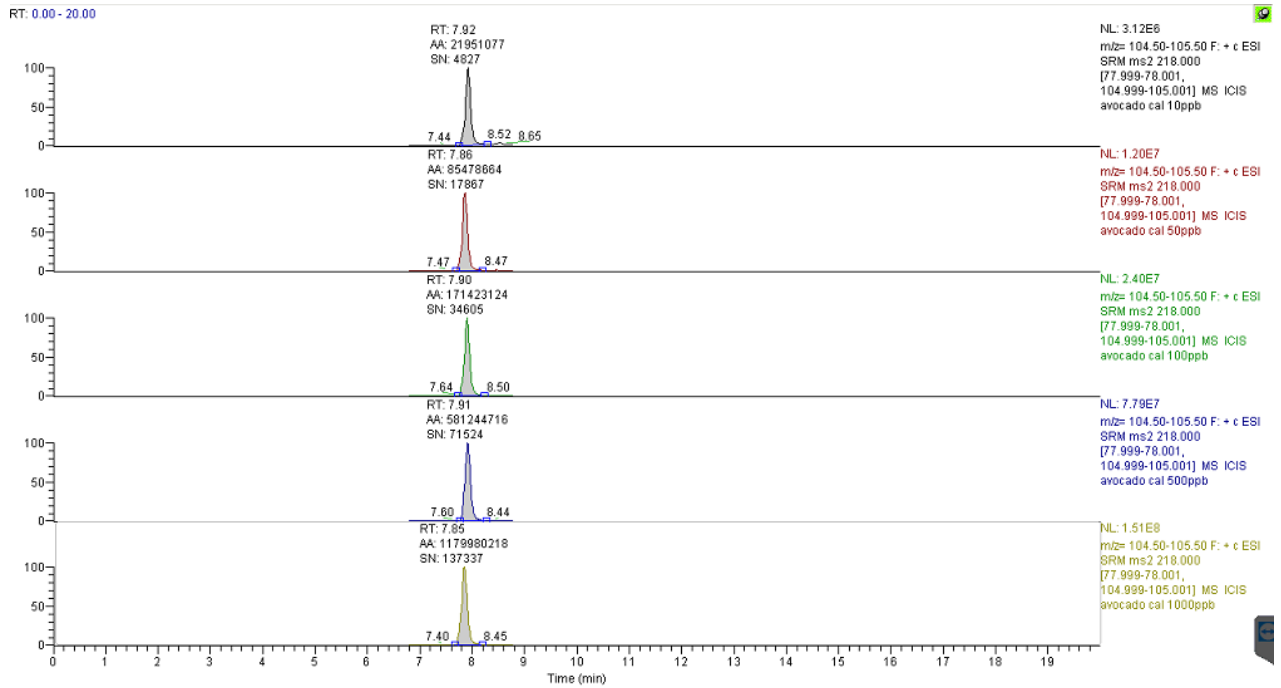


Σχήμα 20. Γραμμή αναφοράς Terbutylazine

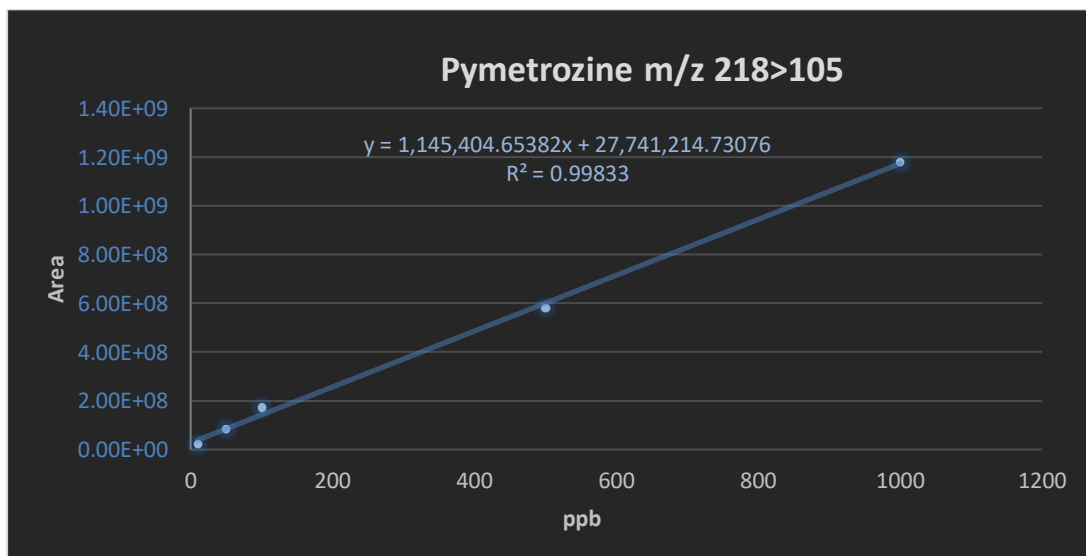
\* Λόγω ότι το σήμα έκανε overload στα 1000 ppb, δεν συμπεριλήφθηκε στην καμπύλη αναφοράς.



# Pymetrozine

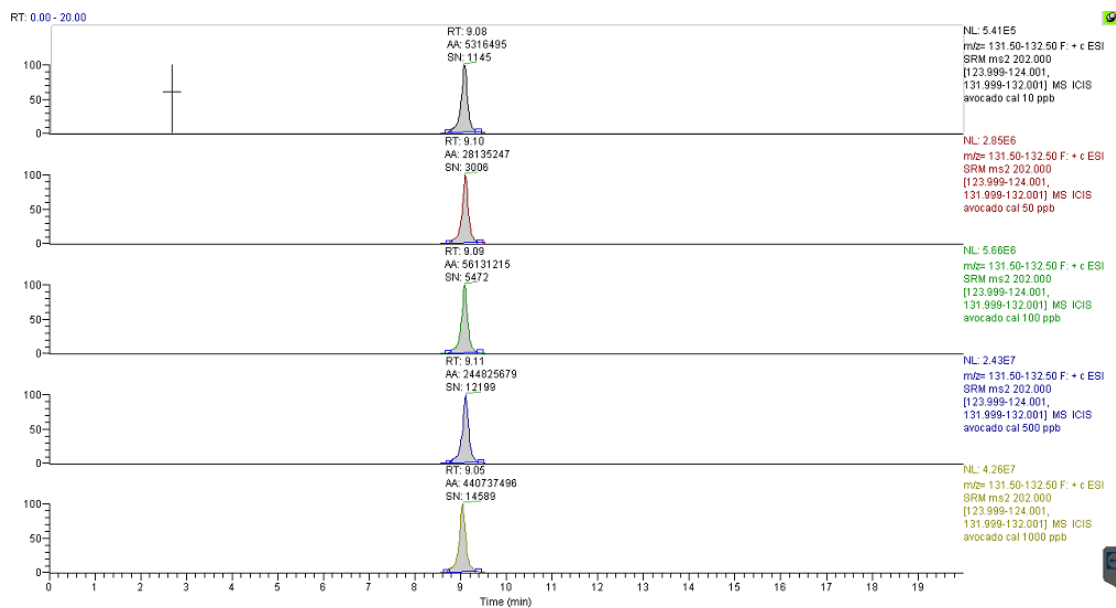


Σχήμα 21. Χρωματογραφήματα των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς του Pymetrozine

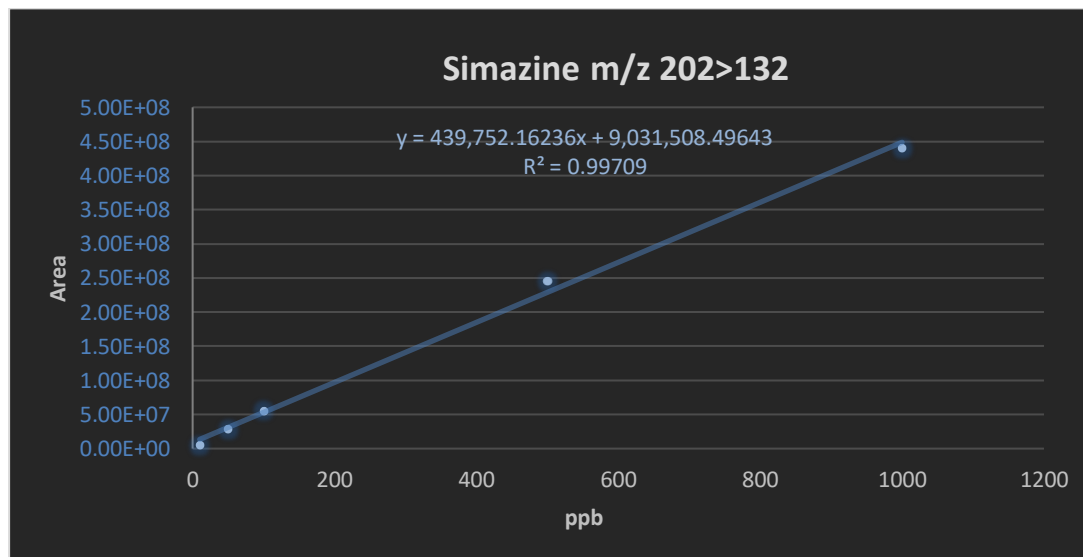


Σχήμα 22. Γραμμή αναφοράς Pymetrozine

# Simazine



Σχήμα 23. Χρωματογραφήματα των συγκεντρώσεων της καμπύλης αναφοράς του Simazine



Σχήμα 24. Γραμμή αναφοράς Simazine

Πίνακας 14. Συγκεντρωτικός πίνακας του εμβαδού κορυφής των πρότυπων ουσιών των τριαζινών.

Concentration (ppb)	Ametryn		Atrazine		Cyromazine		Cyanazine		Terbutryn		Terbutylazine		Pymetrozine		Simazine	
	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area	RT (min)	Area
<b>10</b>	9.82	10759337	9.49	20737916	4.38	3246569	8.93	7960598	10.11	16810753	9.87	48309739	7.92	21951077	9.08	5316495
<b>50</b>	9.83	56211166	9.51	112970459	4.36	18811191	8.95	41353370	10.13	85847602	9.89	246839334	7.86	85478664	9.10	28135247
<b>100</b>	9.82	110612001	9.49	222290109	4.34	36509182	8.93	80598517	10.11	159863668	9.86	462700677	7.90	171423124	9.09	56131215
<b>500</b>	9.83	437243089	9.51	935371701	4.28	150550176	8.96	362504714	10.14	605720291	9.89	1467192265	7.91	581244716	9.11	244825679
<b>1000</b>	9.78	709052925	9.44	1496236389	4.25	283768269	8.89	620728197	10.08	963350253	-	-	7.85	1179980218	9.05	440737496

Πίνακας 15. Εξισώσεις παλινδρόμησης της ευθείας της πρότυπης καμπύλης σε εκχύλισμα αβοκάντο και ο συντελεστής συσχέτισης

Φυτοφάρμακο	Εξίσωση παλινδρόμησης $y=ax+b$	Συντελεστής συσχέτισης
Ametryn	$y = 705.748 x + 30.467.103$	0.98734
Atrazine	$y = 1.499.018 x + 59.847.131$	0.98560
Cyromazine	$y = 268.873 x + 5.737.740$	0,99739
Cyanazine	$y = 622.116 x + 16.086.419$	0,99350
Terbutryn	$y = 953.722 x + 49.692.673$	0,98475
Terbutylazine	$y = 2.768.765 x + 99.414.116$	0,98823
Pymetrozine	$y = 1.145.404 x + 27.741.214$	0,99833
Simazine	$y = 439.752 x + 9.031.508$	0,99709

#### 4.4.6 Ακρίβεια

Η ακρίβεια είναι ένα μέτρο του βαθμού σύγκλισης μεταξύ των ανεξάρτητων αποτελεσμάτων μίας δοκιμής που έγινε σε προκαθορισμένες συνθήκες και εκφράζεται ως συνάρτηση της τυπικής απόκλισης η οποία περιγράφει την κατανομή των αποτελεσμάτων. Η ακρίβεια προσδιορίζεται μετά από δέκα επαναλαμβανόμενες αναλύσεις σε δείγμα επιφορτισμένο με 10 ppb συγκέντρωση αναλύτη που παράγεται από πρότυπη ουσία (70).

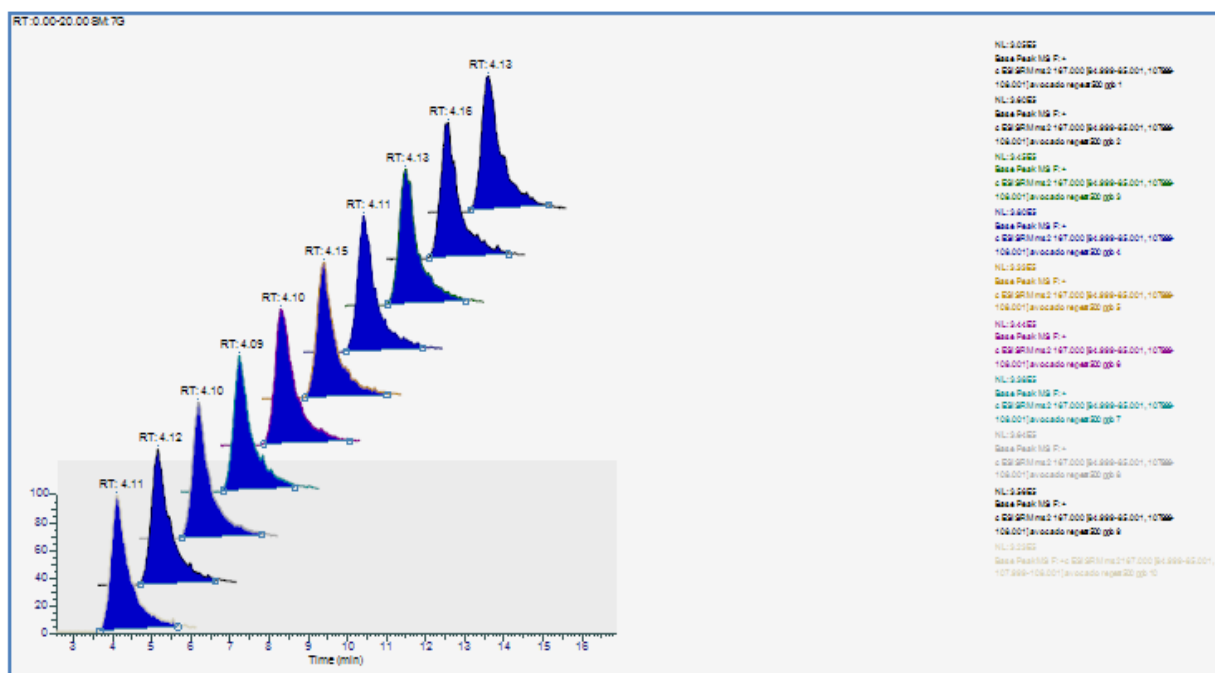
Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγικότητα αποτελούν τις δύο συνιστώσες της ακρίβειας.

#### 4.4.6.1. Επαναληψιμότητα

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου χρησιμοποιείται έτσι ώστε να ελεγχθεί η δυνατότητα της μεθόδου να δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα όταν εφαρμόζεται από τον ίδιο αναλυτή (χειριστή), στις ίδιες συνθήκες και πραγματοποιείται σε μικρό χρονικό διάστημα. Το εύρος του μέσου όρου των ανακτήσεων (%) πρέπει να είναι μεταξύ 70-120 % και η σχετική τυπική απόκλιση να είναι  $\leq 20\%$  σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANTE/12682/2019. Τα επίπεδα φόρτισης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας ήταν τα 10 και 500 ppb. Για την δημιουργία των ανακτήσεων συγκεντρώσεως 10 ppb πάρθηκαν 50 ml από διάλυμα συγκεντρώσεως 1  $\mu\text{g/ml}$ . Ενώ για την δημιουργία ανακτήσεων συγκεντρώσεως 500 ppb πάρθηκαν 250 ml από διάλυμα συγκεντρώσεως 10  $\mu\text{g/ml}$  και ακολουθήθηκε η μέθοδος Quechers στο αβοκάντο. Πραγματοποιήθηκαν δέκα εγχύσεις στο κάθε επίπεδο σε χρονικό διάστημα μίας ημέρας. Παρακάτω παρατίθενται τα χρωματογραφήματα των δέκα επαναλήψεων του θραύσματος ποσοτικοποίησης της κάθε τριαζίνης ξεχωριστά. Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας στα δύο επίπεδα δίνονται στους παρακάτω πίνακες.

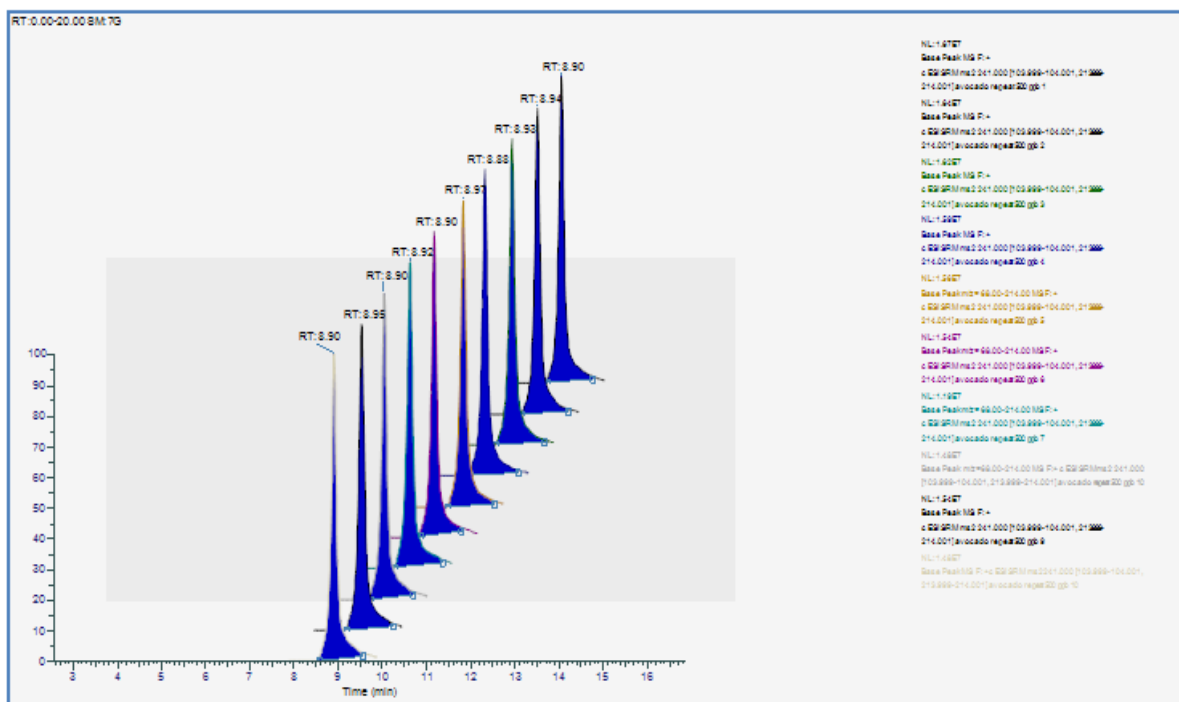


## Cyromazine



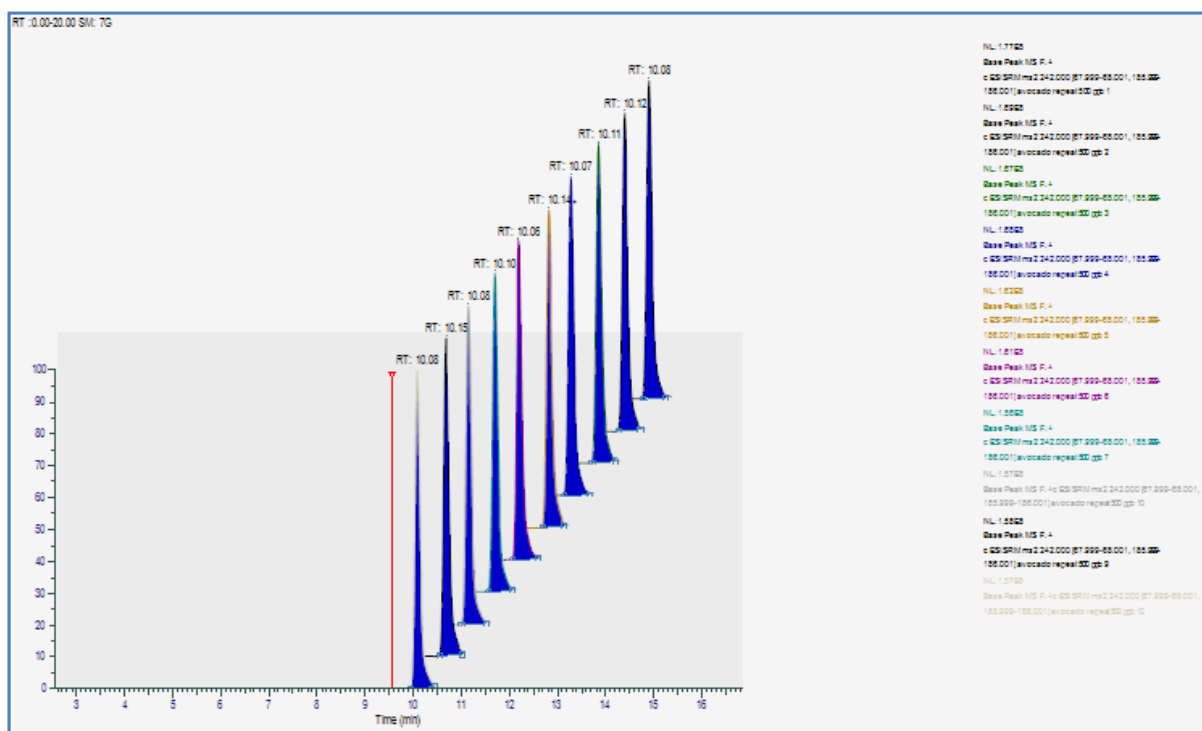
Σχήμα 27. Χρωματογράφημα της επαναληψιμότητας του Cyromazine για n=10 σε επίπεδο φόρτισης 500ppb

## Cyanazine



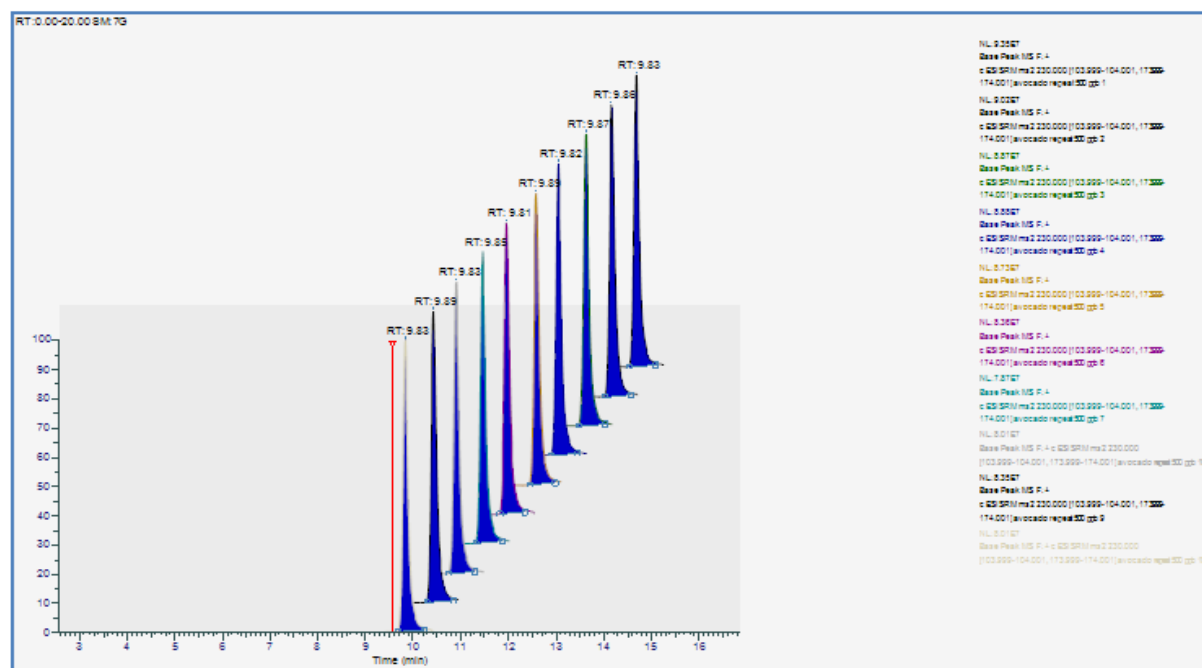
Σχήμα 28. Χρωματογράφημα της επαναληψιμότητας του Cyanazine για n=10 σε επίπεδο φόρτισης 500ppb

## Terbutryn



Σχήμα 29. Χρωματογράφημα της επαναληψιμότητας του Terbutryn για n=10 σε επίπεδο φόρτισης 500ppb

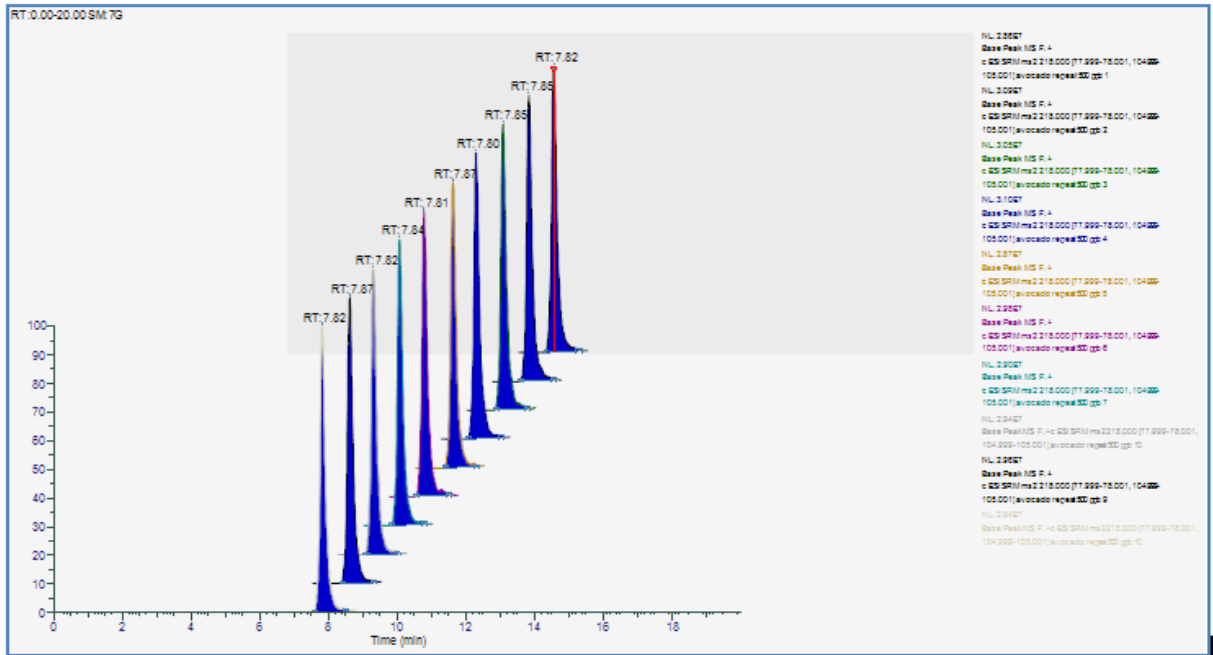
## Terbutylazine



Σχήμα 30. Χρωματογράφημα της επαναληψιμότητας του Terbutylazine για n=10 σε επίπεδο φόρτισης 500ppb

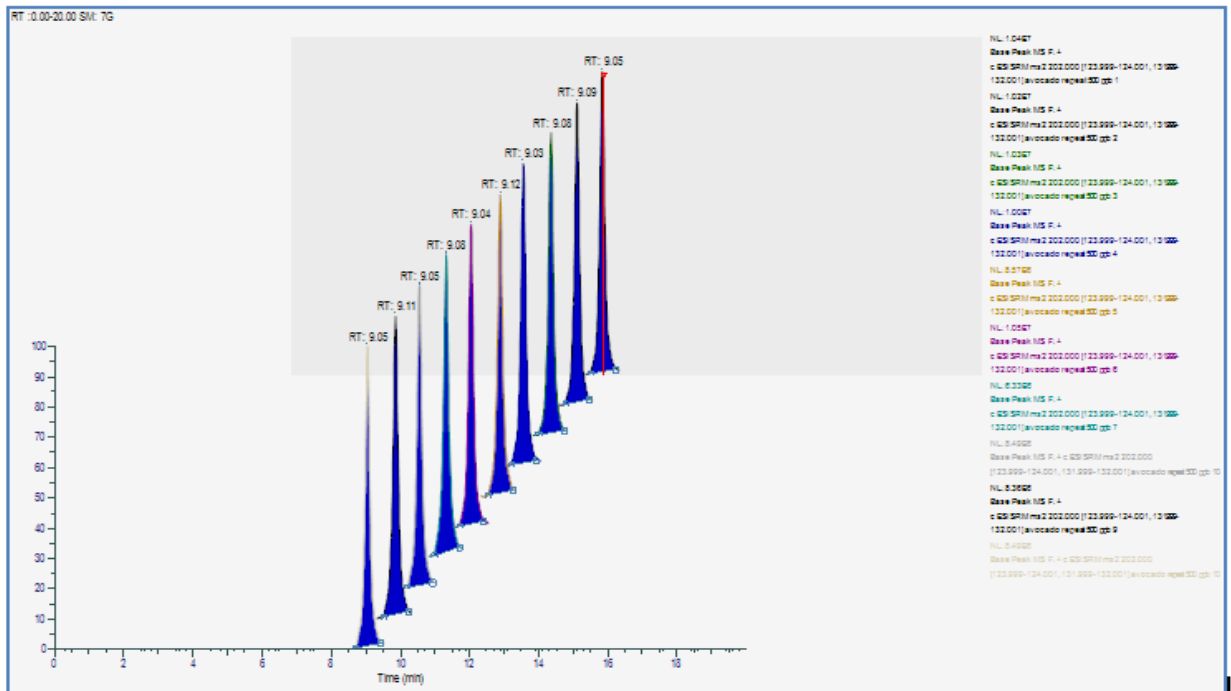


## Pymetrozine



Σχήμα 31. Χρωματογράφημα της επαναληψιμότητας του Pymetrozine για n=10 σε επίπεδο φόρτισης 500ppb

## Simazine



Σχήμα 32. Χρωματογράφημα της επαναληψιμότητας του Simazine για n=10 σε επίπεδο φόρτισης 500ppb

Πίνακας 16. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 10 ppb

Επίπεδο φόρτισης (ppb)	Φυτοφάρμακο	Μέσος όρος ανακτήσεων % (n=10)	RSD (n=10)	Μέτρηση 1 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 2 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 3 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 4 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 5 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 6 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 7 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 8 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 9 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 10 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %
10	Ametryn	78	3,36	9676304	78	10061592	81	10044224	81	9362620	75	9467142	76	9602806	77	9551704	77	9908450	80	10384566	83	9509792	76
10	Atrazine	70	3,85	16636012	68	17395570	71	17337674	72	16630842	68	16654104	68	16388546	67	16536756	68	17477898	72	18517722	76	17136224	70
10	Cyromazine	123	27,45	1605118	143	1492600	133	1305922	116	1569460	140	1414684	126	1536642	137	1279770	114	1772254	158	1425162	127	383868	34
10	Cyanazine	92	6,09	8284182	91	7817412	85	8178320	90	7767014	85	8076828	88	8844560	97	8923500	98	8274746	90	9341660	102	8704158	95

\*Εφαρμόστηκε πολλαπλασιασμός του εμβαδού των κορυφών επί δύο λόγω της μισής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε κατά την ζύγιση των δειγμάτων για την μελέτη της ανάκτησης (69).

Επίπεδο φόρτισης (ppb)	Φυτοφάρμακο	Μέσος όρος ανακτήσεων % (n=10)	RSD (n=10)	Μέτρηση 1 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 2 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 3 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 4 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 5 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 6 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 7 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 8 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 9 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 10 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %
10	Terbutryn	64	4,88	11651334	64	11881272	66	12543484	69	11313698	63	11924296	66	10661174	59	11050074	61	11507200	64	12072026	67	11940702	66
10	Terbutylazine	74	3,25	41125288	72	42313502	74	42760054	75	41085178	72	41478428	73	39724426	70	41154450	72	41914410	74	44892504	79	42166520	74
10	Pymetrozine	58	14,00	13924700	52	13960158	61	12458514	62	13355878	65	12512662	58	13356728	61	12256072	61	12357770	61	13460532	61	13116712	37
10	Simazine	102	4,66	6878810	97	6999258	99	7727534	109	7151694	101	7246208	102	7088414	100	6644198	94	7478890	106	7634956	108	7267424	102

\* Εφαρμόστηκε πολλαπλασιασμός του εμβαδού των κορυφών επί δύο λόγω της μισής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε κατά την ζύγιση των δειγμάτων για την μελέτη της ανάκτησης (69).

Ο μέσος όρος των ανακτήσεων % και η σχετική τυπική απόκλιση για όλα τα φάρμακα των τριαζινών είναι εντός των ορίων του κανονισμού της SANTE/12682/2019, εκτός της pymetrozine και του terbutryn στα οποία ο Μ.Ο% είναι εκτός ορίων αλλά λόγω χαμηλού RSD μπορεί να γίνει διόρθωση επί του αποτελέσματος (SANTE/12682/2019). Η cyromazine είναι το μοναδικό φάρμακο το οποίο δεν πληροί τις προϋποθέσεις της SANTE/12682/2019.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα επαναληψιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 500 ppb

Επίπεδο φόρτισης (ppb)	Φυτοφάρμακο	Μέσος όρος ανακτήσεων % (n=10)	RSD (n=10)	Μέτρηση 1 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 2 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 3 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 4 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 5 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 6 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 7 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 8 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 9 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %	Μέτρηση 10 (peak area)	Μ.Ο. ανάκτησης %
500	Ametryn	105	5,38	430429314	114	416730862	110	421323592	112	409664204	109	397170604	105	394218326	104	370592708	98	388172994	103	378806222	100	369673160	98
500	Atrazine	86	5,68	829059210	92	812940036	90	812356388	90	802418198	89	775785768	86	786567582	87	686104726	76	756061500	84	754674140	84	729419178	81
500	Cyromazine	11	6,65	87141566	10	22046764	10	25190600	12	24669930	11	25604640	12	21991144	10	24688578	11	22966888	11	23164908	11	23111982	11
500	Cyanazine	84	9,47	315880160	90	322905576	92	329726886	94	302149608	86	307879336	87	293542138	83	235144206	67	271479142	77	303657180	86	279416106	79

\*Εφαρμόστηκε πολλαπλασιασμός του εμβαδού των κορυφών επί δύο λόγω της μισής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε κατά την ζύγιση των δειγμάτων για την μελέτη της ανάκτησης (69).

Επίπεδο φόρτισης (ppb)	Φυτοφάρμακο	Μέσος όρος ανακτήσεων % (n=10)	RSD (n=10)	Μέτρηση 1 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 2 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 3 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 4 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 5 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 6 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 7 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 8 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 9 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 10 (peak area)	M.O. ανάκτησης %
500	Terbutryn	90	7,11	519974588	103	476104622	94	463296622	92	470736554	93	448690402	89	449480292	89	411541544	82	439395102	87	431759584	86	414274181	82
500	Terbuthylazine	102	5,32	1578700222	111	1501400504	106	1487662784	105	1493881368	106	1453216226	103	1414785970	100	1312197636	93	1432398272	101	1400170644	99	1361448748	96
500	Pymetrozine	98	4,51	637272276	94	699523676	104	688975274	102	695180880	103	636141874	94	657278764	97	642285066	95	606094092	90	660235530	98	654082606	97
500	Simazine	72	12,89	227622610	80	223876084	79	231158376	81	223559620	78	192354262	67	225011152	97	150542774	53	183062256	64	193175712	68	190899680	67

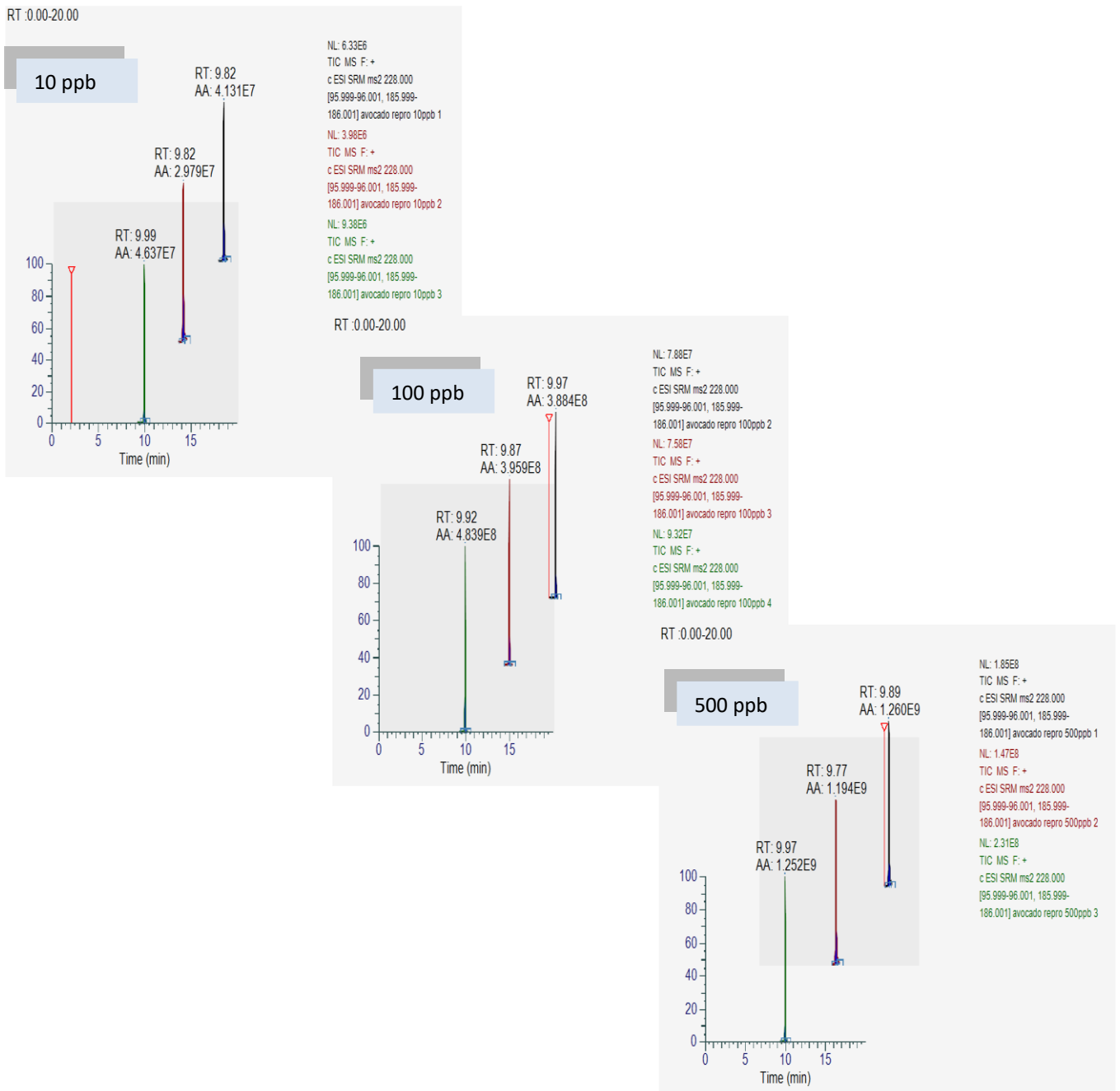
\*Εφαρμόστηκε πολλαπλασιασμός του εμβαδού των κορυφών επί δύο λόγω της μισής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκε κατά την ζύγιση των δειγμάτων για την μελέτη της ανάκτησης (69).

Ο μέσος όρος των ανακτήσεων % και η σχετική τυπική απόκλιση για όλα τα φάρμακα των τριαζινών είναι εντός των ορίων του κανονισμού της SANTE/12682/2019 εκτός της cyromazine η οποία έχει αποδεκτό RSD αλλά με πολύ χαμηλές ανακτήσεις επομένως είναι μη αποδεκτή σύμφωνα με τις προϋποθέσεις της SANTE/12682/2019.

#### 4.4.6.2 Αναπαραγωγιμότητα

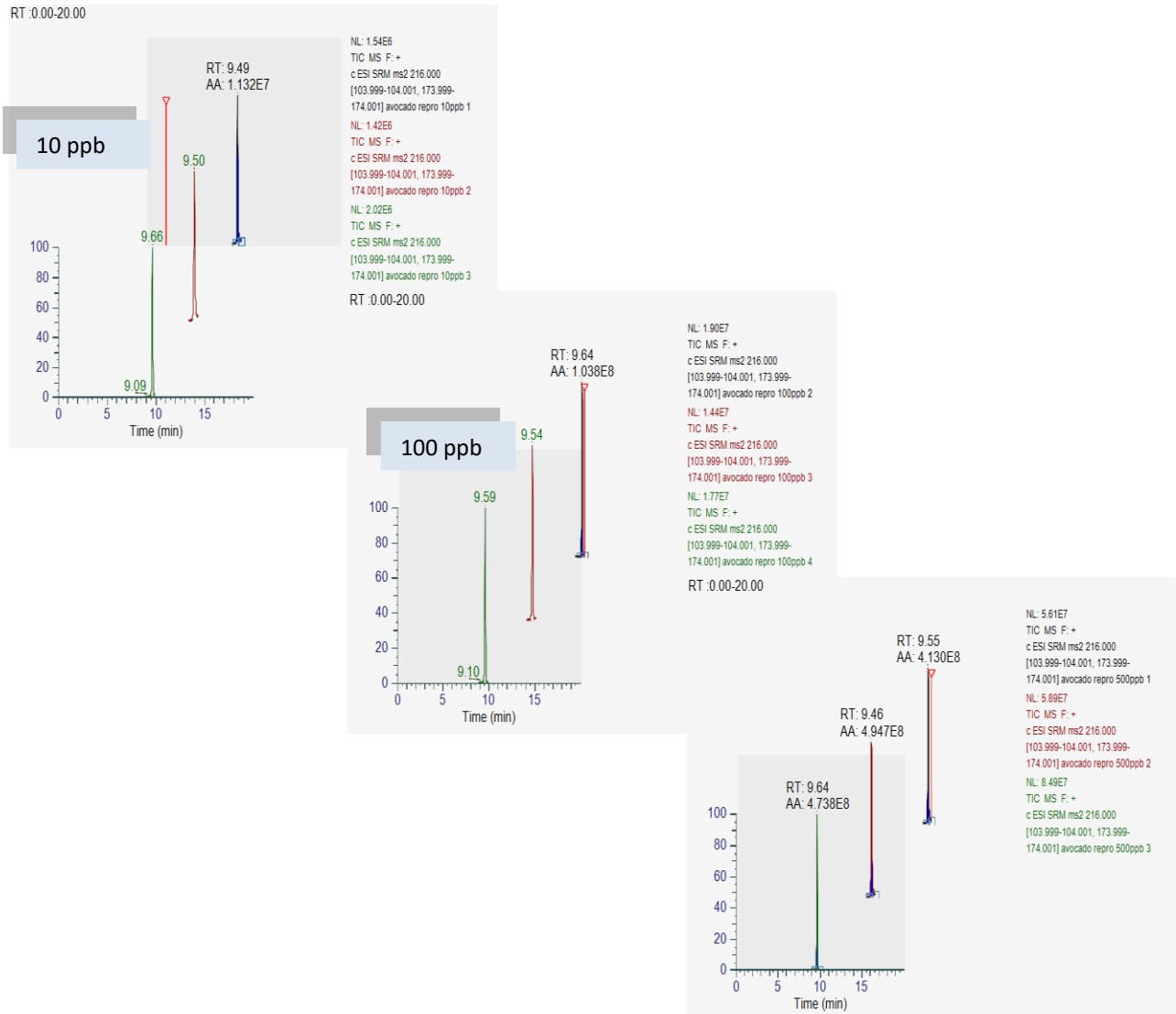
Η αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου χρησιμοποιείται έτσι ώστε να ελεγχθεί η δυνατότητα της μεθόδου να δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα όταν εφαρμόζεται από δύο τουλάχιστον διαφορετικούς αναλυτές (χειριστές), και πραγματοποιείται σε διαφορετικές ημέρες. Το εύρος του μέσου όρου των ανακτήσεων (%) πρέπει να είναι 70-120 % και η σχετική τυπική απόκλιση να είναι  $\leq 20\%$  σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANTE/12682/2019. Τα επίπεδα φόρτισης τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο της αναπαραγωγιμότητας ήταν τα 10, 100 και 500 ppb (στο χαμηλό σημείο, στο ενδιάμεσο, και στο μέγιστο σημείο της γραμμικότητας) . Για την δημιουργία των ανακτήσεων συγκεντρώσεως 10ppb πάρθηκαν 50 μl από διάλυμα συγκεντρώσεως 1 μg/ml και έγινε επιμόλυνση του ιστού του μάρτυρα .Για την δημιουργία ανακτήσεων συγκεντρώσεως 100 ppb πάρθηκαν 50 μl από διάλυμα συγκεντρώσεως 10 μg/ml και έγινε επιμόλυνση του ιστού του μάρτυρα .Τέλος για την δημιουργία ανακτήσεων συγκεντρώσεως 500 ppb πάρθηκαν 250 μl από διάλυμα συγκεντρώσεως 10 μg/ml και έγινε επιμόλυνση του ιστού του μάρτυρα. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η μέθοδος προκατεργασίας για την δημιουργία της ανάκτησης. Πραγματοποιήθηκαν τρεις εγχύσεις στο κάθε επίπεδο. Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε σε επίπεδο φόρτισης 10 ppb ήταν 14 ημέρες, στα 100 ppb ήταν 20 ημέρες και για το επίπεδο φόρτισης 500 ppb ήταν 15 ημέρες. Τα αποτελέσματα της αναπαραγωγιμότητας δίνονται στον παρακάτω πίνακα για τα τρία επίπεδα φορτίσεων.

# Ametryn



Σχήμα 33. Χρωματογραφήματα της αναπαραγωγιμότητας του ametryn για n=3 σε επίπεδα φόρτισης 10, 100 και 500 ppb

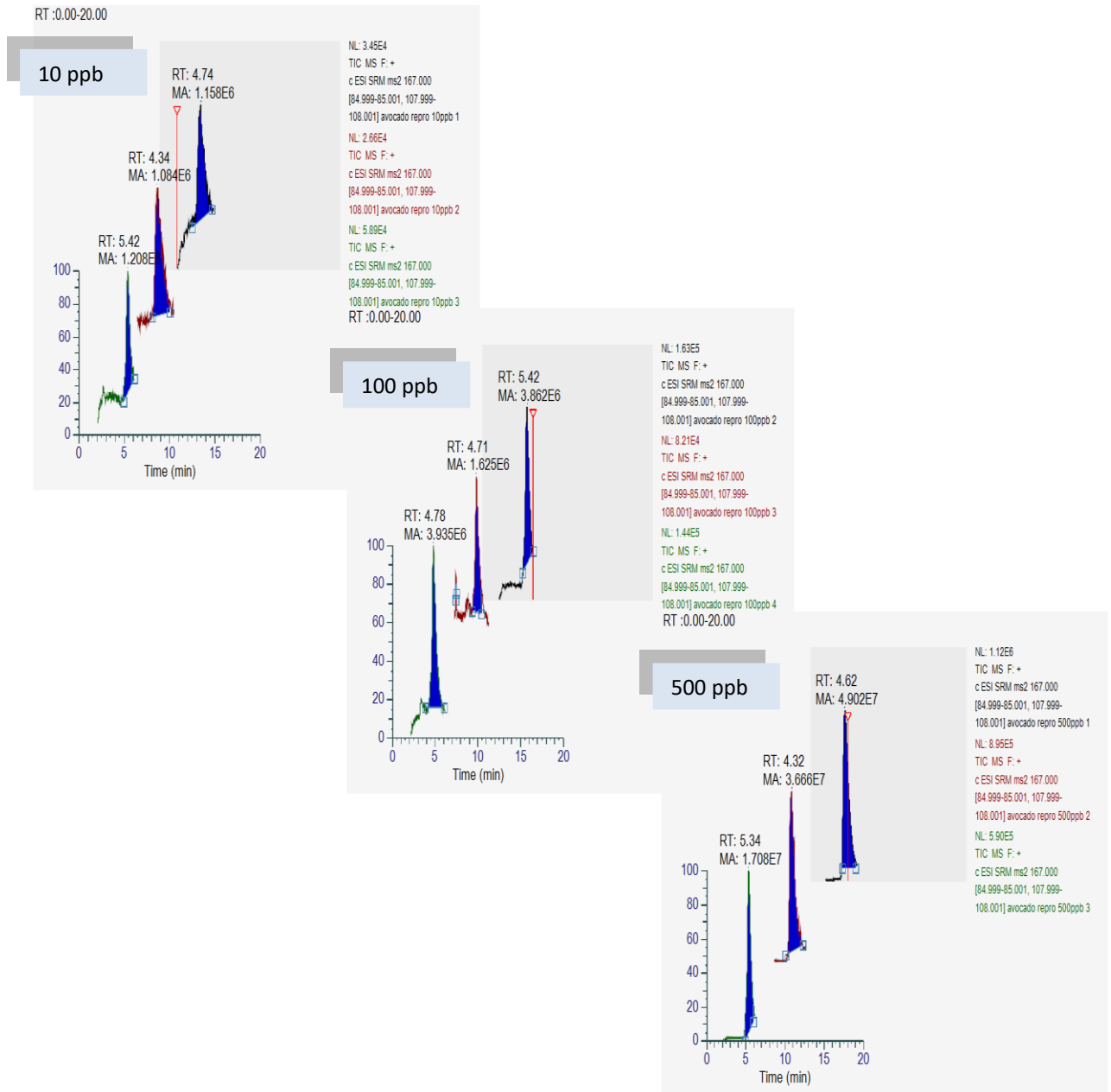
# Atrazine



Σχήμα 34. Χρωματογραφήματα της αναπαραγωγιμότητας του atrazine για n=3 σε επίπεδα φόρτισης 10, 100 και 500 ppb

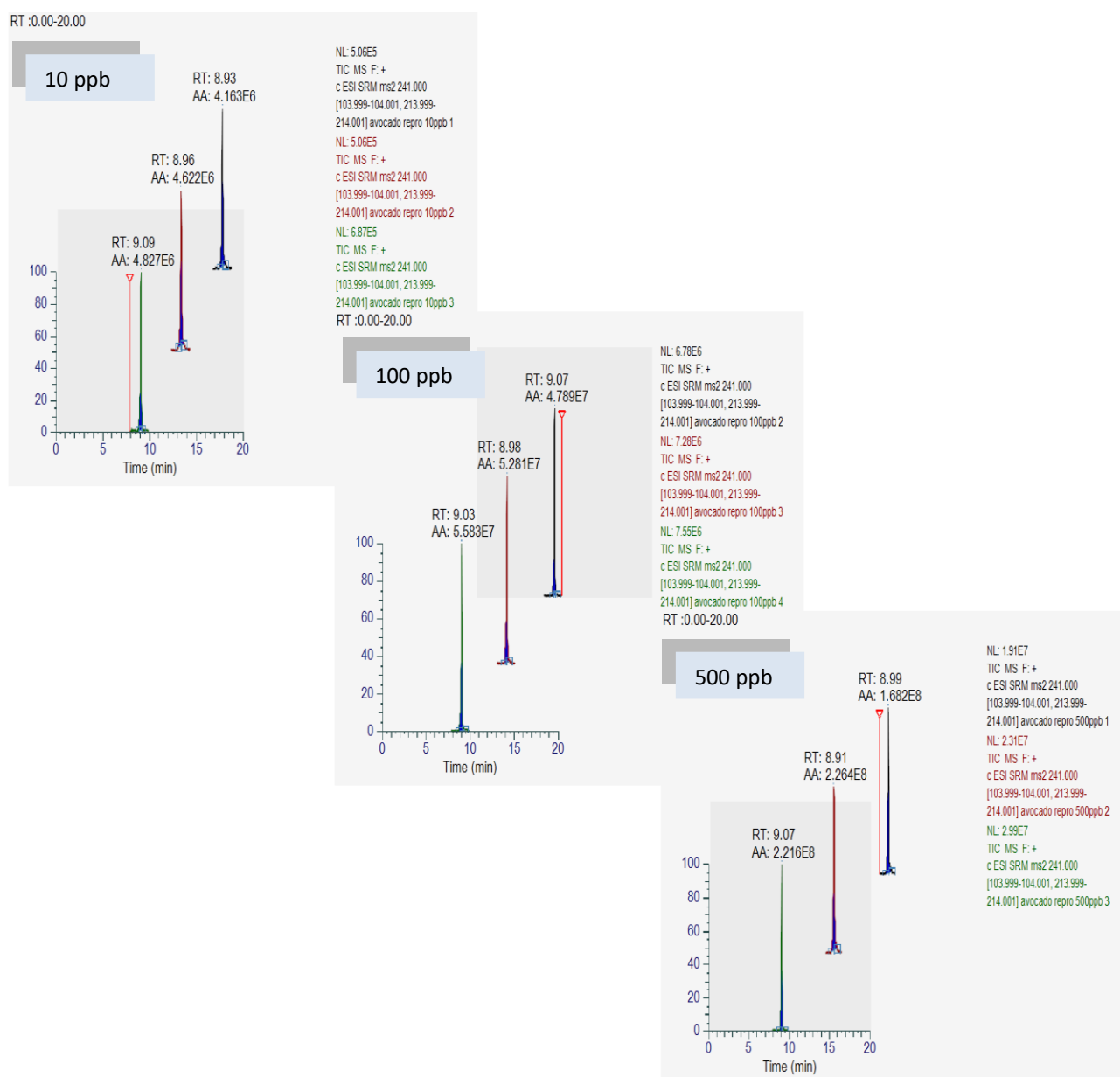


# Cyromazine



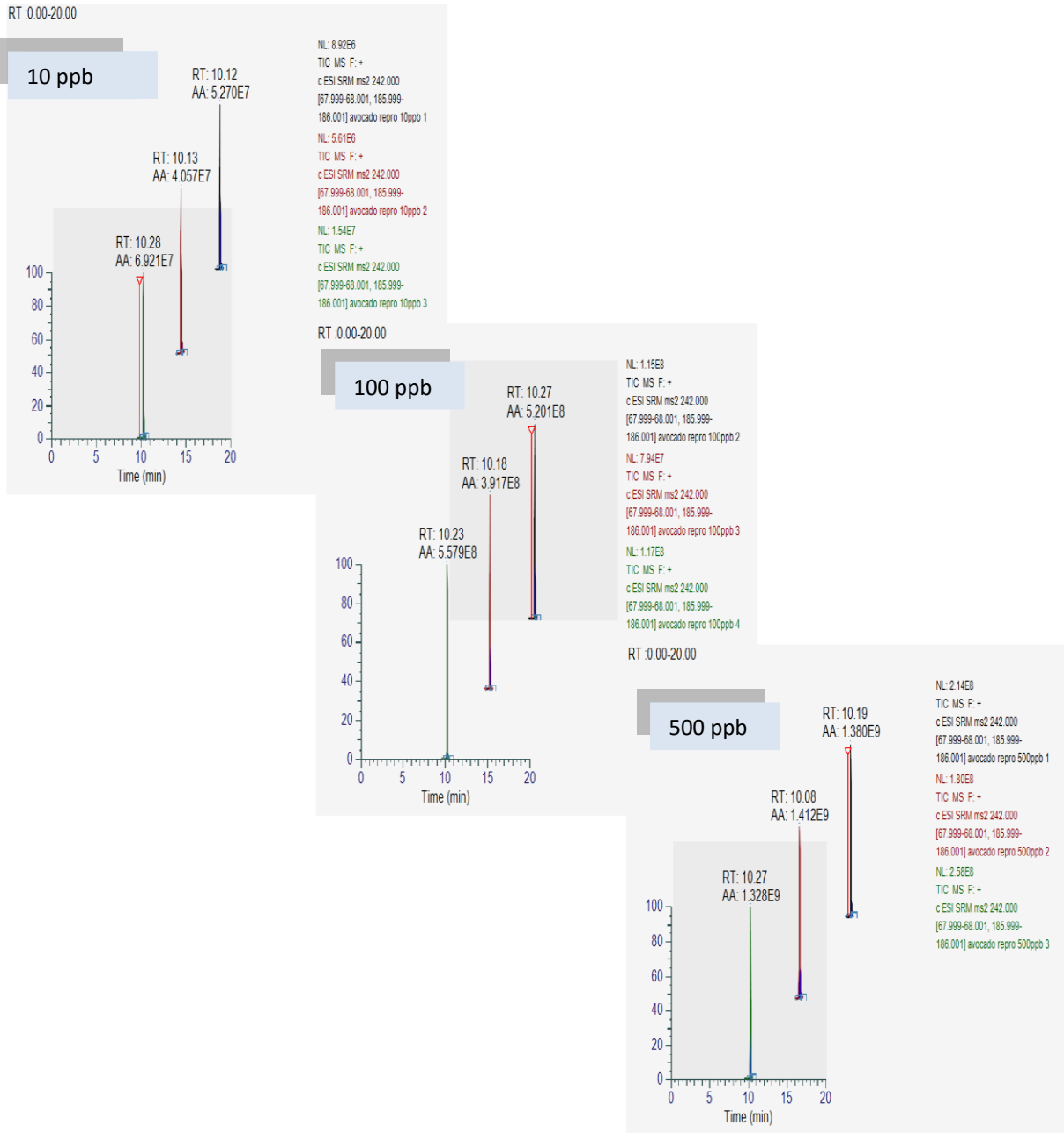
Σχήμα 35. Χρωματογραφήματα της αναπαραγωγιμότητας του cyromazine για n=3 σε επίπεδα φόρτισης 10, 100 και 500 ppb

# Cyanazine



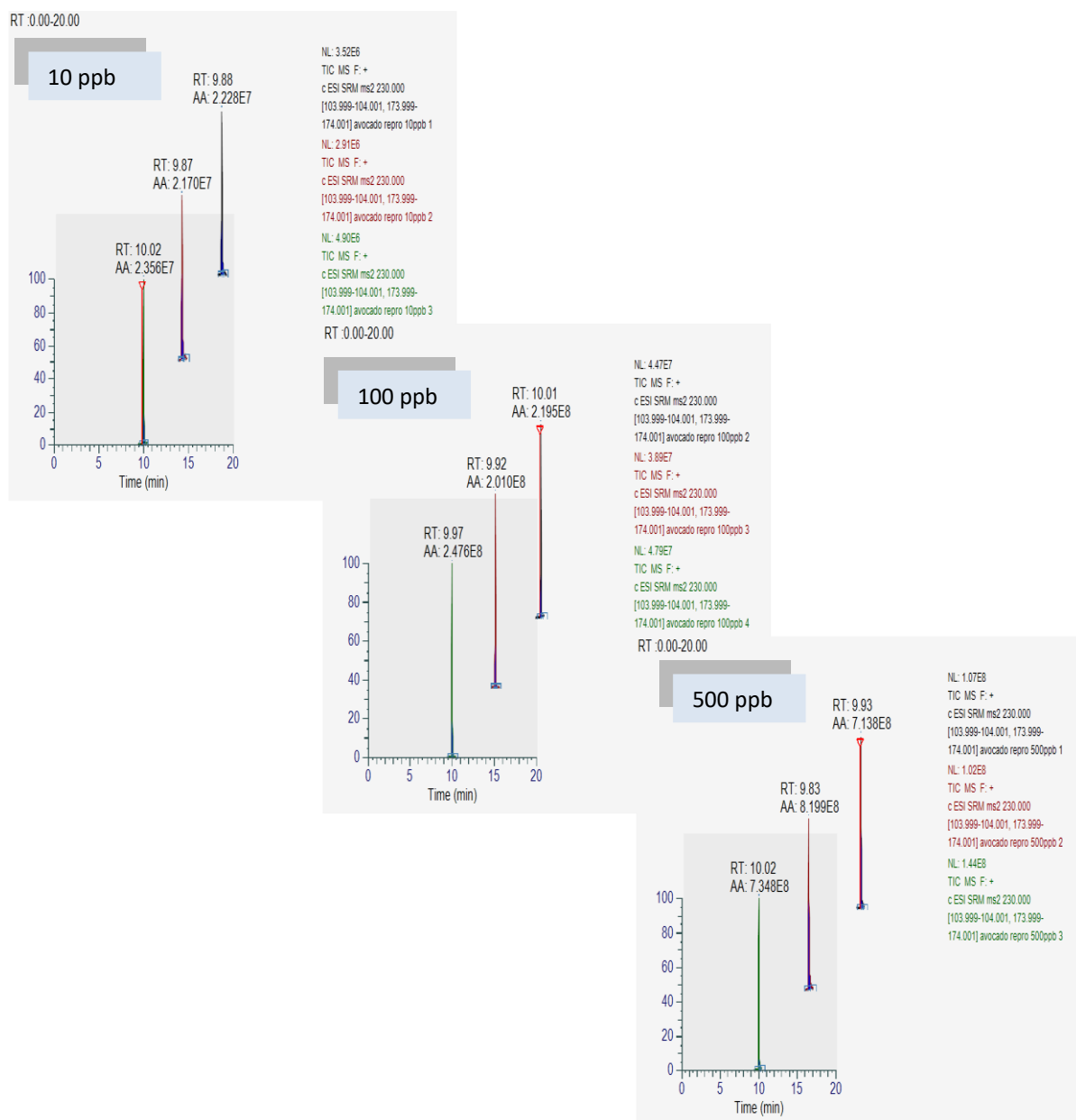
Σχήμα 36. Χρωματογραφήματα της αναπαραγωγιμότητας του cyanazine για n=3 σε επίπεδα φόρτισης 10, 100 και 500 ppb

# Terbutryn



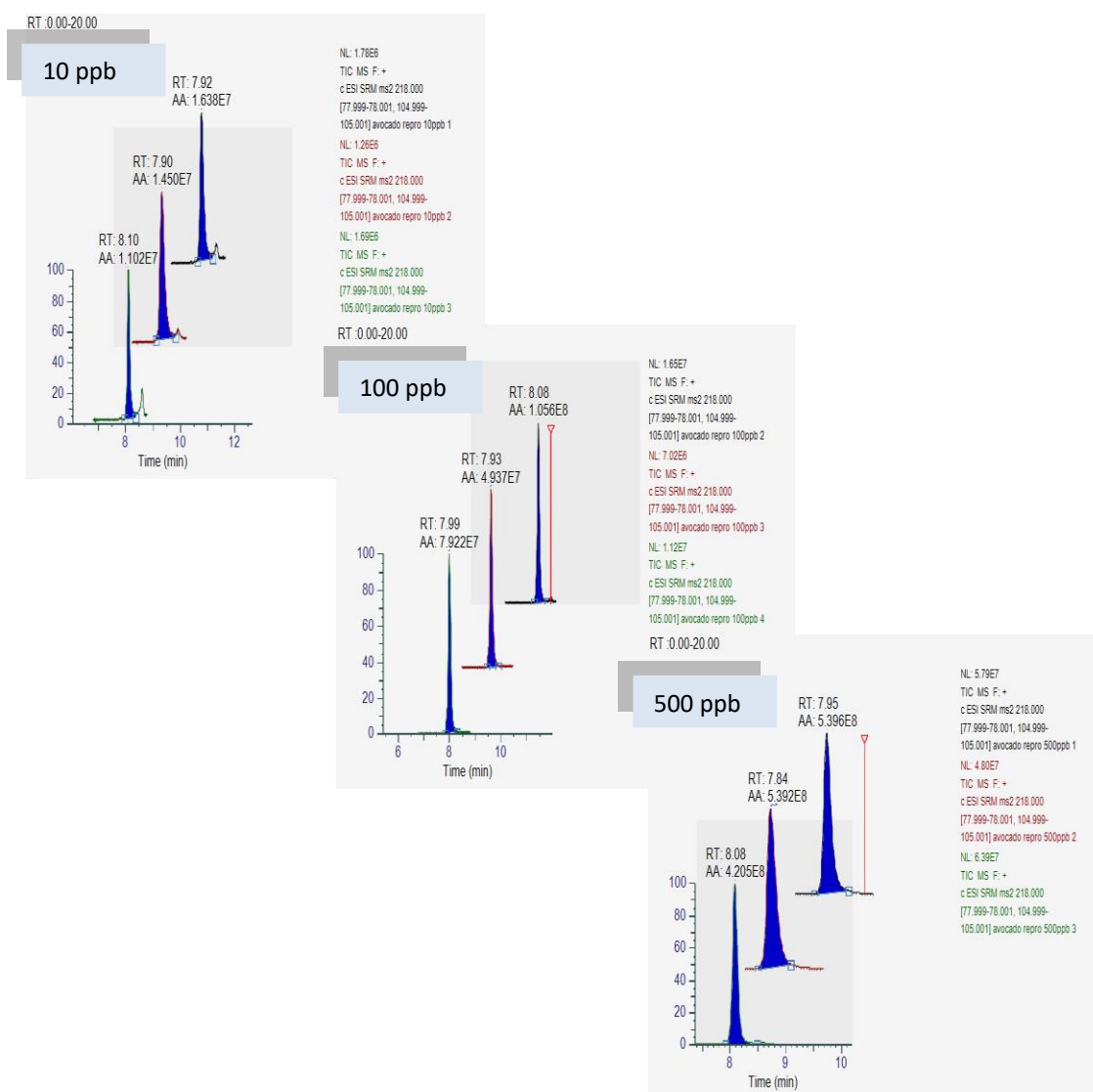
Σχήμα 37. Χρωματογραφήματα της αναπαραγωγιμότητας του terbutryn για n=3 σε επίπεδα φόρτισης 10, 100 και 500 ppb

# Terbutylazine



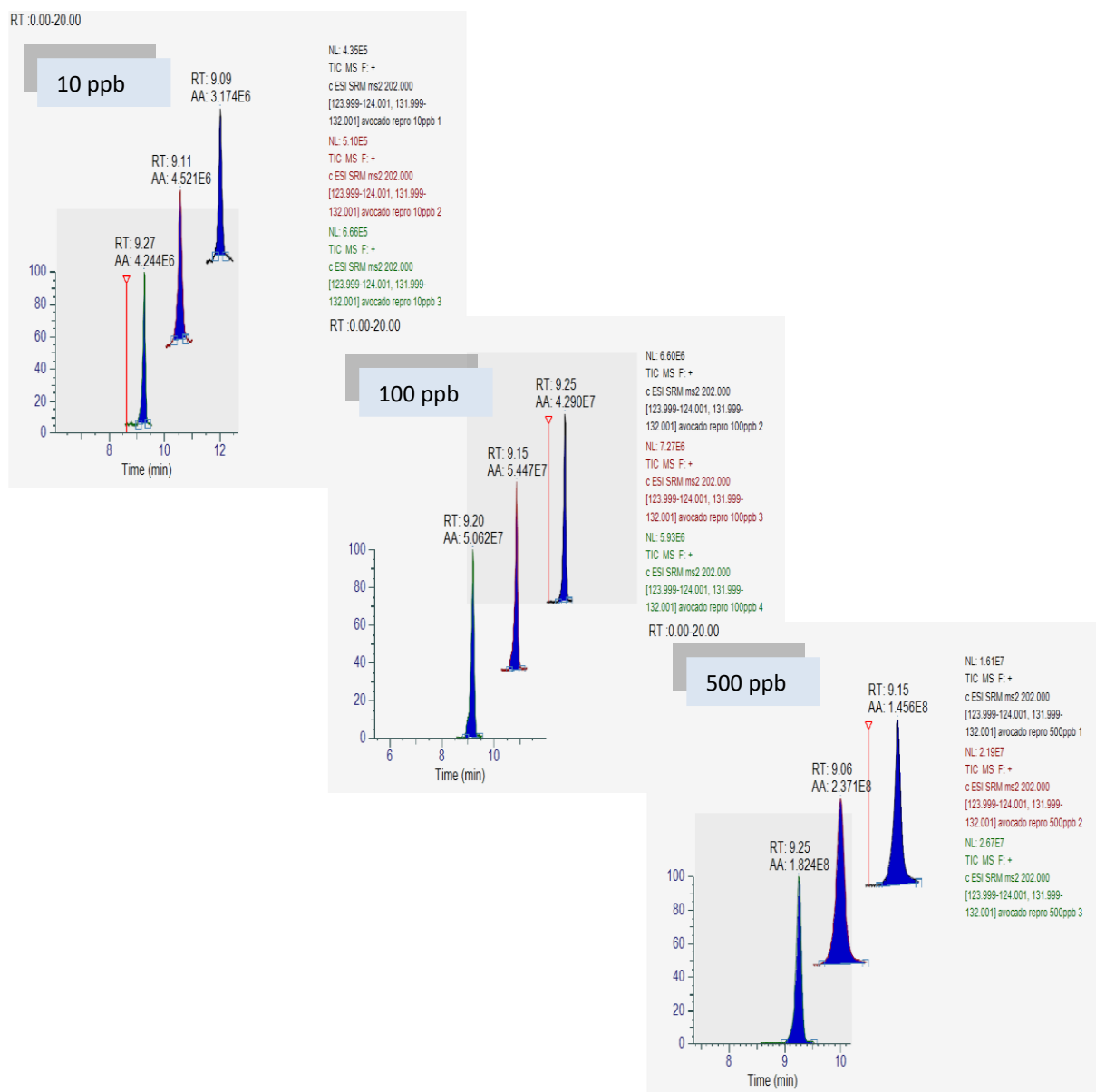
Σχήμα 38. Χρωματογραφήματα της αναπαραγωγιμότητας του terbutylazine για n=3 σε επίπεδα φόρτισης 10, 100 και 500 ppb

# Pymetrozine



Σχήμα 39. Χρωματογραφήματα της αναπαραγωγιμότητας του pymetrozine για  $n=3$  σε επίπεδα φόρτισης 10, 100 και 500 ppb

# Simazine



Σχήμα 40. Χρωματογραφήματα της αναπαραγωγιμότητας του simazine για n=3 σε επίπεδα φόρτισης 10, 100 και 500 ppb

Πίνακας 18.Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε Επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 10 ppb

Επίπεδο φόρτισης ppb	Φυτοφάρμακο	Μέσος όρος ανακτήσεων % (n=3)	RSD (n=3)	Μέτρηση 1 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 2 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 3 (peak area)	M.O. ανάκτησης %
10	Ametryn	<b>80</b>	<b>5,69</b>	9977418	84	7071534	75	10224344	79
10	Atrazine	<b>75</b>	<b>6,98</b>	19312578	80	19349144	70	19072244	74
10	Cyromazine	<b>73</b>	<b>56,54</b>	1954456	48	2086244	50	2168276	121
10	Cyanazine	<b>89</b>	<b>11,45</b>	7805776	99	8739814	79	8809420	87
10	Terbutryn	<b>80</b>	<b>5,79</b>	12386068	66	9605978	76	16543386	83
10	Terbuthylazine	<b>78</b>	<b>5,96</b>	41269686	74	42614856	77	43562920	83
10	Pymetrozine	<b>72</b>	<b>19,58</b>	29217002	88	29245400	65	23509694	63
10	Simazine	<b>81</b>	<b>10,72</b>	3975610	78	5605834	75	4985164	91

*\*Εφαρμόστηκε πολλαπλασιασμός του εμβαδού των κορυφών επί δύο λόγω της μισής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ζύγιση των δειγμάτων για την μελέτη της ανάκτησης (69).*

Ο μέσος όρος των ανακτήσεων % (70-120%) και η σχετική τυπική απόκλιση ( $\leq 20\%$ ) για όλα τα φάρμακα των τριαζινών είναι εντός των ορίων του κανονισμού της, SANTE/12682/2019 εκτός της cyromazine η οποία έχει μη αποδεκτό RSD σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANTE/12682/2019.

Πίνακας 19. Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 100 ppb

Επίπεδο φόρτισης ppb	Φυτοφάρμακο	Μέσος όρος ανακτήσεων % (n=3)	RSD (n=3)	Μέτρηση 1 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 2 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 3 (peak area)	M.O. ανάκτησης %
100	Ametryn	<b>84</b>	<b>4,51</b>	94495028	88	90497324	80	98350608	83
100	Atrazine	<b>78</b>	<b>6,84</b>	169160430	77	181621460	73	195355218	84
100	Cyromazine	<b>67</b>	<b>95,51</b>	6529579	138	3869789	48	1376312	15
100	Cyanazine	<b>87</b>	<b>9,12</b>	64102182	79	86354562	87	94742840	95
100	Terbutryn	<b>86</b>	<b>13,55</b>	116570220	78	134748752	80	159788528	99
100	Terbutylazine	<b>82</b>	<b>1,69</b>	380584482	82	401167544	83	368029850	81
100	Pymetrozine	<b>68</b>	<b>14,61</b>	160806492	79	187218616	63	167645258	60
100	Simazine	<b>96</b>	<b>16,20</b>	62194644	99	47100020	80	59224094	111

*\*Εφαρμόστηκε πολλαπλασιασμός του εμβαδού των κορυφών επί δύο λόγω της μισής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ζύγιση των δειγμάτων για την μελέτη της ανάκτησης (69).*

Ο μέσος όρος των ανακτήσεων % (70-120%) και η σχετική τυπική απόκλιση ( $\leq 20\%$ ) για όλα τα φάρμακα των τριαζινών είναι εντός των ορίων του κανονισμού της SANTE/12682/2019, εκτός της cyromazine η οποία έχει μη αποδεκτό RSD και M.O.% σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANTE/12682/2019 και η pymetrozine η οποία έχει χαμηλή ανάκτηση αλλά λόγω αποδεκτού RSD μπορεί να γίνει διόρθωση επί του αποτελέσματος.



Πίνακας 20. Αποτελέσματα αναπαραγωγιμότητας των επιλεγμένων γεωργικών φαρμάκων σε επιφορτισμένα δείγματα αβοκάντο για επίπεδο φόρτισης 500 ρρb

Επίπεδο φόρτισης ρρb	Φυτοφάρμακο	Μέσος όρος ανακτήσεων % (n=3)	RSD (n=3)	Μέτρηση 1 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 2 (peak area)	M.O. ανάκτησης %	Μέτρηση 3 (peak area)	M.O. ανάκτησης %
500	Ametryn	<b>94</b>	<b>14,34</b>	338090778	79	303319612	99	361144824	105
500	Atrazine	<b>77</b>	<b>3,53</b>	701900444	74	841684156	80	822795408	78
500	Cyromazine	<b>88</b>	<b>76,45</b>	80934660	36	68843604	164	26590424	63
500	Cyanazine	<b>82</b>	<b>4,21</b>	299800660	82	431739690	86	397075112	79
500	Terbutryn	<b>104</b>	<b>8,72</b>	408603252	65	373232008	98	548562998	90
500	Terbutylazine	<b>93</b>	<b>10,00</b>	1297488186	85	1493305766	103	1329553920	92
500	Pymetrozine	<b>98</b>	<b>15,15</b>	930657360	89	930018680	116	724709576	90
500	Simazine	<b>70</b>	<b>12,87</b>	155584026	70	254118962	79	196292230	61

*\*Εφαρμόστηκε πολλαπλασιασμός του εμβαδού των κορυφών επί δύο λόγω της μισής ποσότητας που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ζύγιση των δειγμάτων για την μελέτη της ανάκτησης (69).*

Ο μέσος όρος των ανακτήσεων % (70-120%) και η σχετική τυπική απόκλιση ( $\leq 20\%$ ) για όλα τα φάρμακα των τριαζινών είναι εντός των ορίων του κανονισμού της SANTE/12682/2019, εκτός της cyromazine η οποία έχει μη αποδεκτό RSD σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANTE/12682/2019.

#### 4.4.7 Αβεβαιότητα

Η αβεβαιότητα δηλώνει την περιοχή μέσα στην οποία αναμένεται με βεβαιότητα 95% να κυμαίνεται η πραγματική τιμή του αποτελέσματος. Ανάλογα με τον τρόπο εκτίμησης της αβεβαιότητας, η αβεβαιότητα χωρίζεται σε αβεβαιότητα τύπου A και αβεβαιότητα τύπου B. Η αβεβαιότητα τύπου A προκύπτει μέσω στατιστικής ανάλυσης και βασίζεται στα αποτελέσματα των πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου (ενδοεργαστηριακή αβεβαιότητα) αλλά και των αποτελεσμάτων των πειραμάτων των καμπυλών αναφοράς. Η αβεβαιότητα τύπου B είναι η αβεβαιότητα που δίνεται μέσα από τα πιστοποιητικά των κατασκευαστών και των διακριβώσεων του εξοπλισμού που χρησιμοποιείται για την ανάλυση. Τέλος υπολογίζεται η διευρυμένη αβεβαιότητα, η οποία δεν πρέπει να υπερβαίνει το 50% στην περίπτωση των φυτοφαρμάκων σύμφωνα με τις προϋποθέσεις τις SANTE/12682/2019.

#### ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΤΥΠΟΥ Α

➤ **Σχετική τυπική αβεβαιότητα των καμπυλών αναφοράς**

Για την εύρεση της σχετικής αβεβαιότητας των καμπυλών αναφοράς χρησιμοποιήθηκαν οι παρακάτω εξισώσεις (72) :

$$\frac{U_c}{c} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(y_o - \bar{y})^2}{b^2 \sum_i (X_o - \bar{X})^2}}$$

Όπου:

U<sub>c</sub>: Σχετική τυπική αβεβαιότητα της καμπύλης αναφοράς

b: Η κλίση της καμπύλης αναφοράς

n: Ο αριθμός των πρότυπων διαλυμάτων που χρησιμοποιήθηκαν για την καμπύλη

m: Ο αριθμός επαναλήψεων για τον προσδιορισμό του αγνώστου δείγματος

$y_0$ : Συγκέντρωση του προς μέτρηση δείγματος

$\bar{y}$ : Μέση τιμή των συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων

$x_0$ : Η συγκέντρωση κάθε πρότυπου διαλύματος

$\bar{x}$ : Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων των πρότυπων διαλυμάτων

$c$  : Η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση

$S_{y/x}$ : Η τυπική απόκλιση των τιμών  $y$  που προκύπτει από τη γραμμική συσχέτιση και δίνεται

$$S_{y/x} = \left\{ \frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n-2} \right\}^{1/2}$$

από τη σχέση όπου  $y$  είναι η προτεινόμενη τιμή  $y$  από την εξίσωση παλινδρόμησης της καμπύλης αναφοράς με  $x$  τις συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων.

Σύμφωνα με τις παραπάνω εξισώσεις προέκυψε η σχετική τυπική αβεβαιότητα της κάθε καμπύλης βαθμονόμησης ξεχωριστά.

Ο υπολογισμός της αβεβαιότητας μέτρησης συγκέντρωσης από καμπύλη βαθμονόμησης έχει τυποποιηθεί σε ηλεκτρονική μορφή και παράγεται αυτόματα με την εισαγωγή των τιμών των συγκεντρώσεων.

Πίνακας 21. Σχετική τυπική αβεβαιότητα καμπυλών αναφοράς των τριαζινών

Φυτοφάρμακο	Ametryn	Atrazine	Cyanazine	Terbutryn	Terbuthylazine	Pymetrozine	Simazine
Σχετική τυπική αβεβαιότητα καμπύλης	0,07	0,0711	0,0471	0,0799	0,0591	0,0314	0,0334

➤ **Σχετική τυπική αβεβαιότητα των πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας**

Μέσω των πειραμάτων αναπαραγωγιμότητας εκτιμήθηκε η σχετική τυπική αβεβαιότητα της αναπαραγωγιμότητας όπως δίνεται στον πίνακα μέσω του

τύπου : 
$$RSD_r = \frac{S_{\bar{x}}}{\bar{X}}$$

$\bar{x}$  : Ο μέσος όρος των συγκεντρώσεων των μετρήσεων της αναπαραγωγιμότητας

$S_{\bar{x}}$  : Η τυπική απόκλιση της κάθε συγκέντρωσης των τριών μετρήσεων της αναπαραγωγιμότητας

Πίνακας 22. Σχετική τυπική αβεβαιότητα λόγω αναπαραγωγιμότητας

Φυτοφάρμακο	Σχετική τυπική αβεβαιότητα λόγω αναπαραγωγιμότητας (Τύπου A)		
	$RSD_r$ 10ppb %	$RSD_r$ 100ppb %	$RSD_r$ 500ppb %
Ametryn	5,69	14,34	4,51
Atrazine	6,98	6,84	3,53
Cyanazine	11,45	9,12	4,21
Terbutryn	5,79	13,55	8,72
Terbuthylazine	5,96	1,69	10,00
Pymetrozine	19,58	14,61	15,55
Simazine	10,72	16,20	12,87

## ΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗ ΤΥΠΙΚΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ

Για τον υπολογισμό της συνδυασμένης αβεβαιότητας (είναι ο συνδυασμός της Σχετικής τυπικής αβεβαιότητας της αναπαραγωγιμότητας, της Σχετικής τυπικής αβεβαιότητας όγκου, της Σχετικής τυπικής αβεβαιότητας μάζας και της Σχετικής τυπικής αβεβαιότητας καμπύλης) θα πρέπει πρώτα να γίνει ο υπολογισμός της αβεβαιότητας τύπου Β (αβεβαιότητα στον όγκο, αβεβαιότητα στην μάζα).

### ➤ Αβεβαιότητα στον όγκο

Η αβεβαιότητα για τις ογκομετρικές φιάλες αναγράφεται πάνω στο πιστοποιητικό διακρίβωσης. Η αβεβαιότητα που δίνεται από το πιστοποιητικό διακρίβωσης εκτιμήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τη συνεισφορά αβεβαιότητας:

- της ένδειξης του ζυγού
- της πυκνότητας των πρότυπων βαρών
- της πυκνότητας του αέρα
- της πυκνότητας του ύδατος
- της θερμοκρασίας του ύδατος
- της απώλειας ύδατος λόγω εξάτμισης
- του συντελεστή κυβικής διαστολής του υλικού
- της τυπικής απόκλισης των τιμών

Για τον υπολογισμό της τυπικής αβεβαιότητας στον όγκο και σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, χρησιμοποιείται ο τύπος :  $U_{X \text{ όγκου}} = \frac{a}{2}$ , όπου α: η αβεβαιότητα του πιστοποιητικού διακρίβωσης.

Στην συνέχεια υπολογίζεται η σχετική τυπική αβεβαιότητα με βάση τον τύπο :

$$U_{(r \text{ όγκου})} = \frac{U_{(x \text{ όγκου})}}{V}$$

Πίνακας 23. Τυπική και σχετική τυπική αβεβαιότητα όγκου διακριβωμένου εξοπλισμού του εργαστηρίου

Γιάλινος Εξοπλισμός	Τυπική αβεβαιότητα στον όγκο	Σχετική τυπική αβεβαιότητα όγκου
Πιπέτα 1-10 ml	0,003 ml	0,0003
Πιπέτα 10-100 μl	0,075 μl	0,00150
Πιπέτα 100-1000 μl	0,2 μl	0,0002
Ογκομετρική Φιάλη 10 ml	0,004 ml	0,0004
Ογκομετρική Φιάλη 25 ml	0,005 ml	0,0002

❖ Συνολική σχετική τυπική αβεβαιότητα όγκου : 0,00260

### Αβεβαιότητα στην μάζα

Η αβεβαιότητα αυτή υπολογίζεται από τα δεδομένα της διακρίβωσης του ζυγού που υπάρχουν στο πιστοποιητικό διακρίβωσης για περιοχή 0-81g . Δίνεται ο παρακάτω τύπος από την εταιρία διακρίβωσης:

$$W=R-E_{appr} (R)\pm(4,5*10^{-5}+1,7*10^{-5}*R)$$

Όπου:

R: η κάθε ένδειξη που λαμβάνεται μετά τη διακρίβωση (g)

$E_{appr}$ : το σφάλμα κατά προσέγγιση

W: το αποτέλεσμα ζύγισης (g)

Ύστερα για τον υπολογισμό της τυπικής αβεβαιότητας στην μάζα και για επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, χρησιμοποιείται ο τύπος:  $U_{X\text{ μάζας}} = \frac{a}{2}$ , όπου a: η αβεβαιότητα του πιστοποιητικού διακρίβωσης.

Στην συνέχεια υπολογίζεται η σχετική τυπική αβεβαιότητα με βάση τον τύπο :

$$U_{(r\text{ μάζας})} = \frac{U_{(x\text{ μάζας})}}{m}$$

Αφού έγιναν οι υπολογισμοί με βάση τους παραπάνω τύπους προέκυψαν τα παρακάτω αποτελέσματα :

Πίνακας 24. Σχετική τυπική αβεβαιότητα μάζας διακριβωμένου εξοπλισμού του εργαστηρίου

	Τυπική αβεβαιότητα στην μάζα	Σχετική τυπική αβεβαιότητα μάζας
Ζυγός (MT XS205DU)	0,00045 gr	0,00001
Ζυγός (KERN EG300-3M)	0,00112 gr	0,00006

❖ Συνολική σχετική τυπική αβεβαιότητα μάζας : 0,00006

Έτσι συλλέγονται όλα τα παραπάνω δεδομένα και γίνεται ο υπολογισμός της συνδυασμένης σχετικής τυπικής αβεβαιότητας με βάση τον παρακάτω τύπο:

$$U_{\sigma} = \sqrt{RSD_r^2 + \left(\frac{U_V}{V}\right)^2 + \left(\frac{U_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{U_c}{c}\right)^2}$$

Όπου:

$U_{\sigma}$ : Συνδυασμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα

$RSD_r$ : Σχετική τυπική αβεβαιότητα της αναπαραγωγιμότητας

$\frac{U_V}{V}$ : Σχετική τυπική αβεβαιότητα όγκου

$\frac{U_m}{m}$ : Σχετική τυπική αβεβαιότητα μάζας

$\frac{U_c}{c}$ : Σχετική τυπική αβεβαιότητα καμπύλης

## ΔΙΕΥΡΗΜΕΝΗ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑ

Και τέλος υπολογίζεται η διευρυμένη αβεβαιότητα, για συντελεστή κάλυψης  $k=2$  (για διάστημα εμπιστοσύνης 95%, SANTE/12682/2019 και δίνεται από την σχέση  $U_{\delta} = k * U_{\sigma}$

Πίνακας 25. Διευρυμένη αβεβαιότητα φυτοφαρμάκων

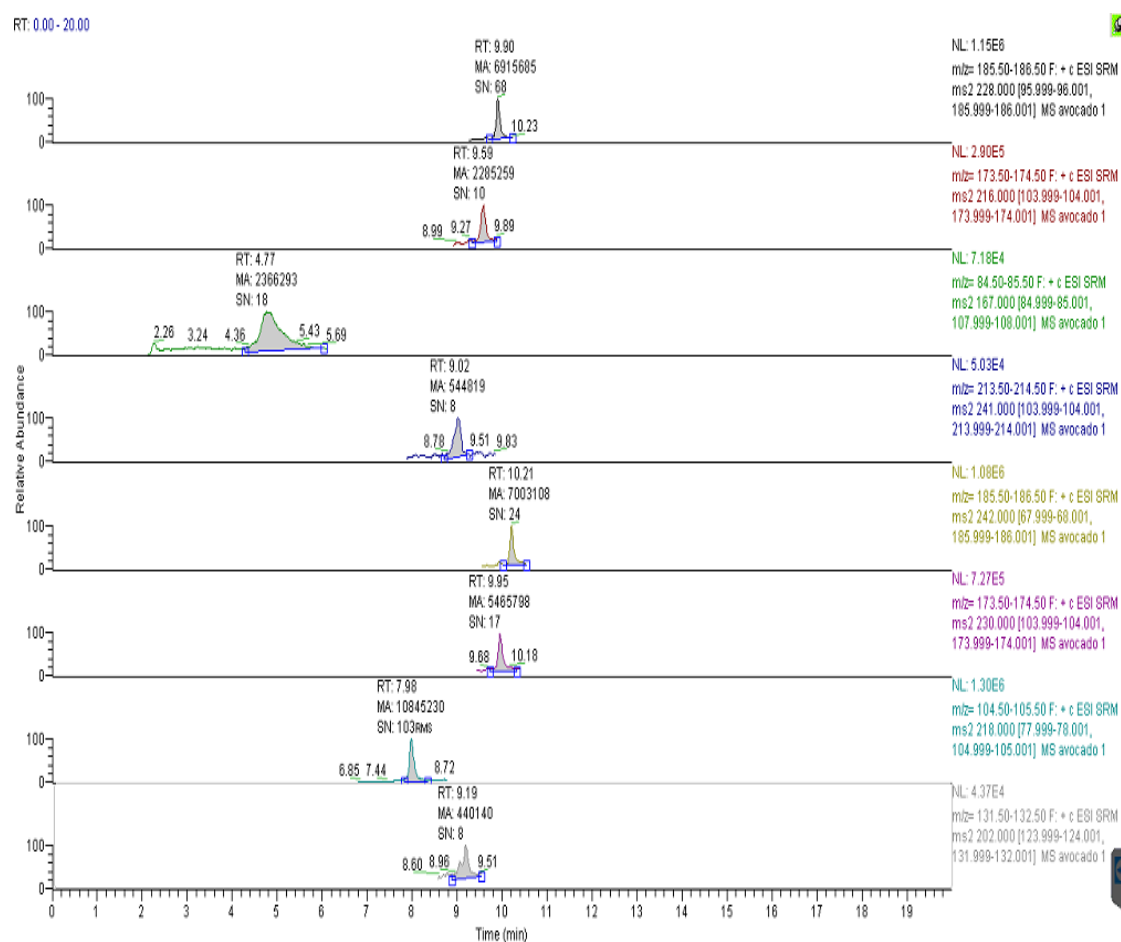
Φυτοφάρμακο	Διευρυμένη Αβεβαιότητα		
	$U_{\delta} (10 \text{ ppb})$ (%)	$U_{\delta} (100 \text{ ppb})$ (%)	$U_{\delta} (500 \text{ ppb})$ (%)
Ametryn	18,1	16,7	31,9
Atrazine	19,9	19,7	15,9
Cyanazine	24,8	20,5	12,6
Terbutryn	19,7	31,5	23,7
Terbuthylazine	16,8	12,3	23,2
Pymetrozine	39,7	29,9	31,7
Simazine	22,5	33,1	26,6

Όπως φαίνεται με τον παραπάνω πίνακα βρισκόμαστε εντός αποδεκτών ορίων  $\leq 50\%$  ( SANTE/12682/2019).

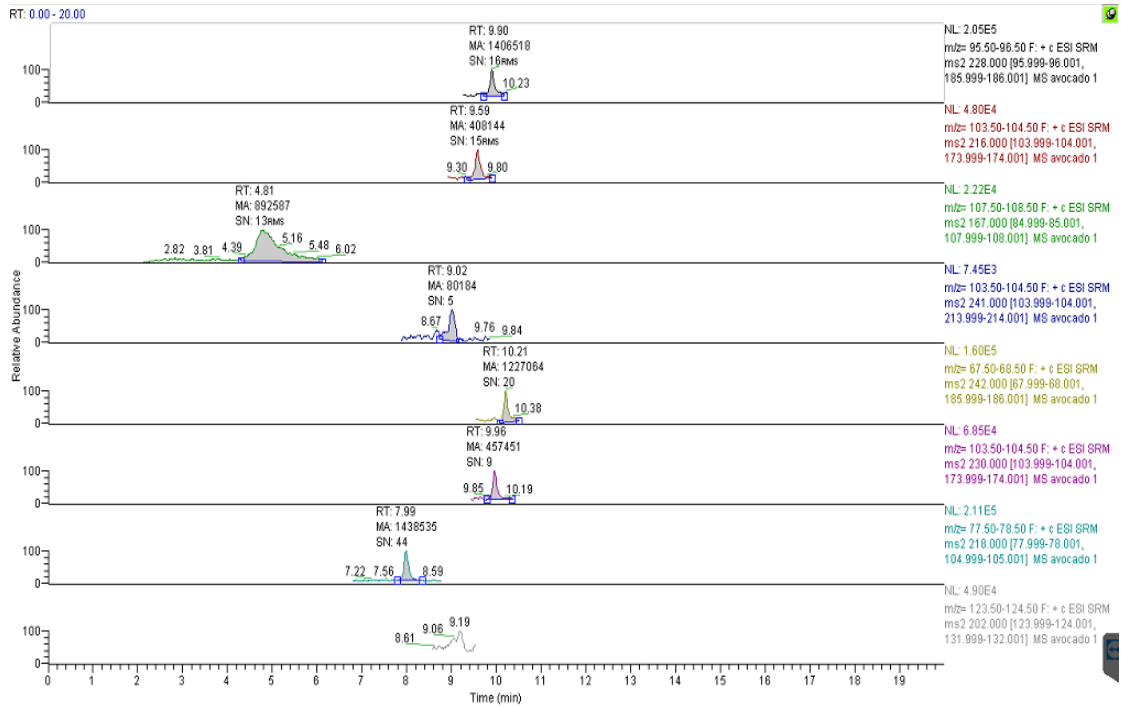


## 4.5 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός άγνωστων δειγμάτων

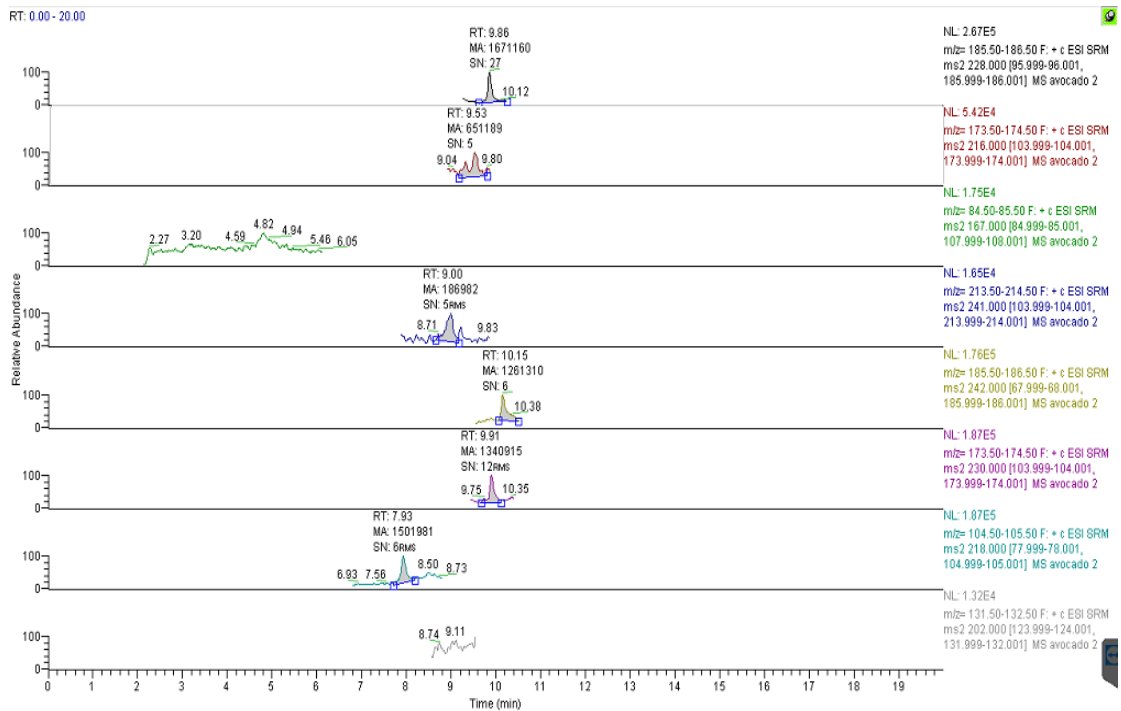
Προμηθευτήκαμε τέσσερα δείγματα αβοκάντο της αγοράς για την τυχόν ανίχνευση υπολειμμάτων τριαζινών. Τα δείγματα είχαν περιοχή προέλευσης το Περού και την Νότιο Αφρική. Όπως φαίνεται και στα παρακάτω χρωματογραφήματα έγινε ανίχνευση τριαζινών αλλά με την ποσοτικοποίηση αυτών φαίνεται ότι βρίσκονται σε συγκεντρώσεις  $\leq$  LOD, οπότε δεν έγινε ποσοτικοποίηση και χαρακτηρισμός αυτών.



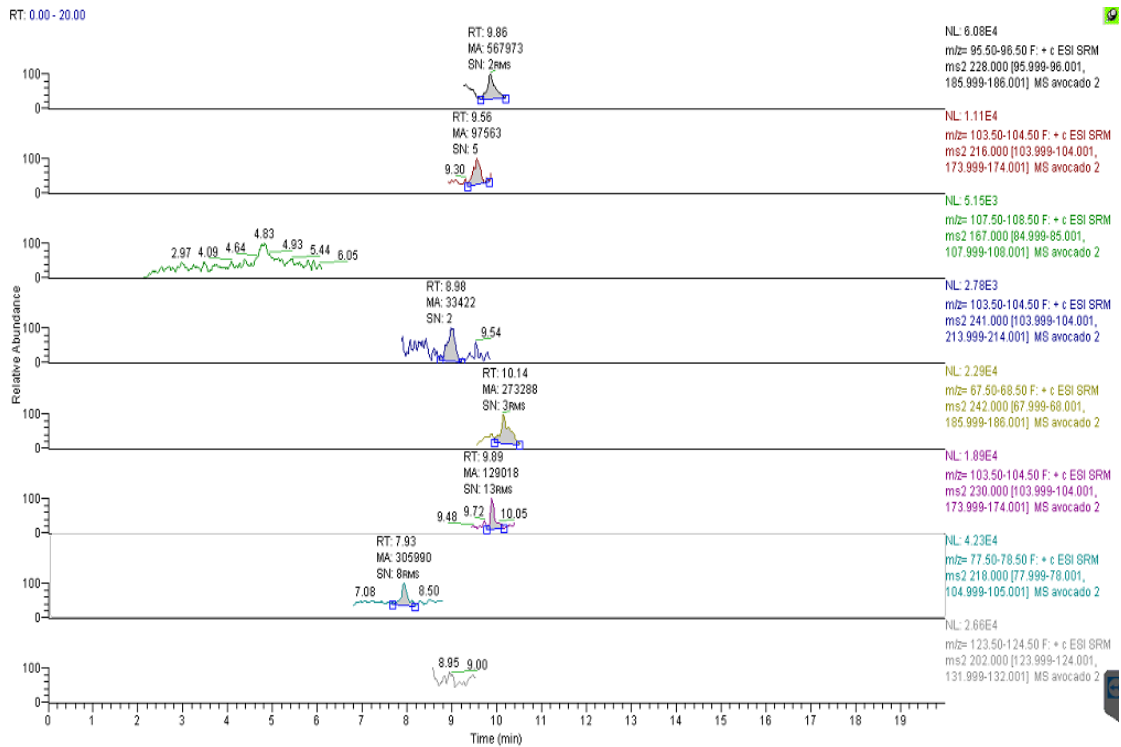
Σχήμα 41. Χρωματογράφημα δείγματος 1 του ιόντος ποσοτικοποίησης (quantifier ion) όπου φαίνεται ότι τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων είναι  $<$ LOD.



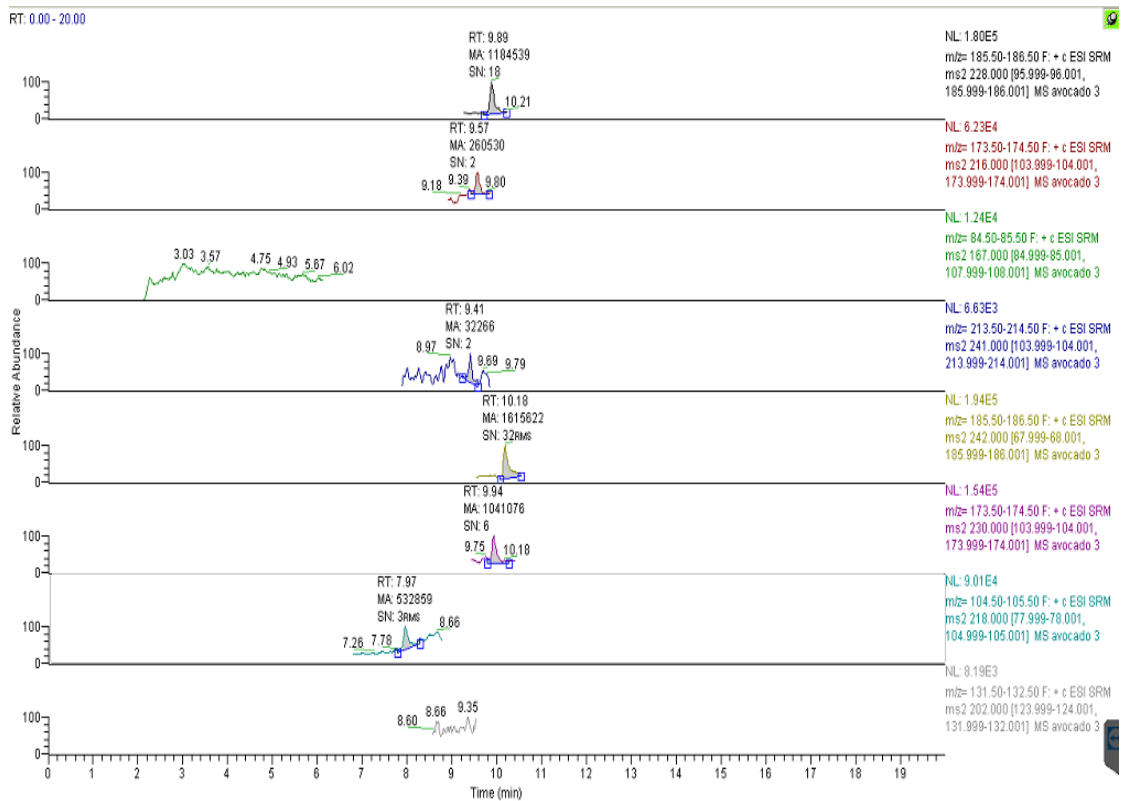
Σχήμα 42. Χρωματογράφημα δείγματος 1, του ιόντος επιβεβαίωσης (qualifier ion)



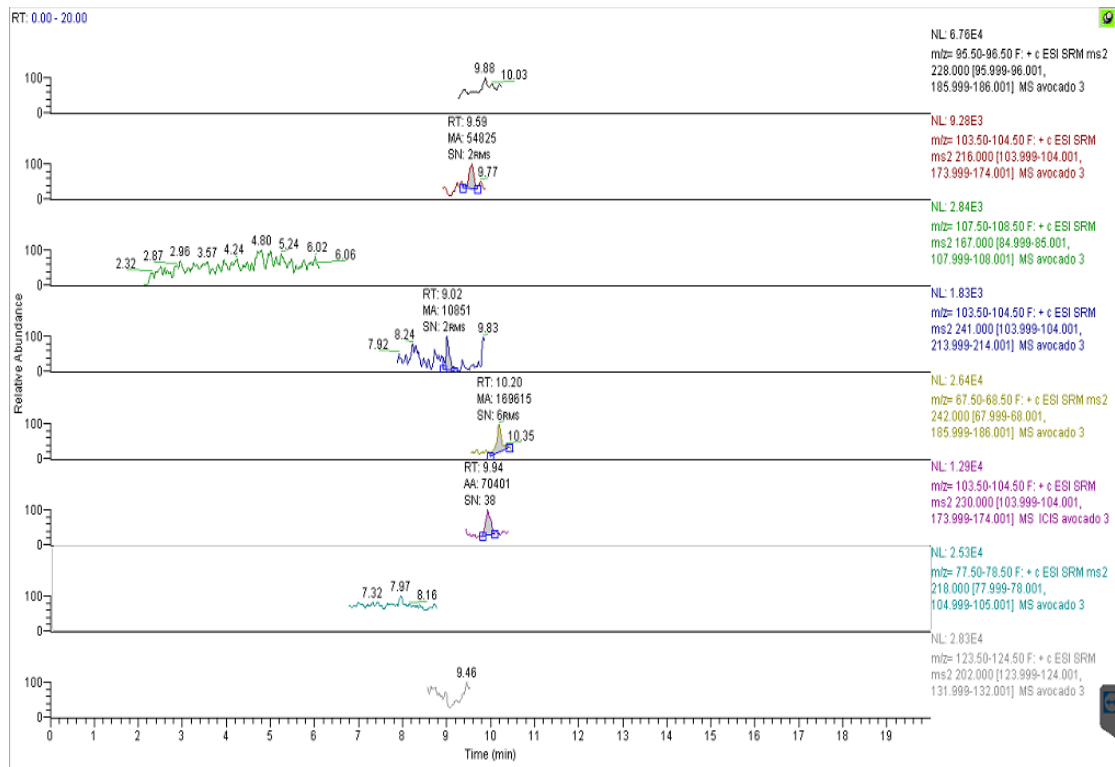
Σχήμα 43. Χρωματογράφημα δείγματος 2 του ιόντος ποσοτικοποίησης (quantifier ion) όπου φαίνεται ότι τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων είναι <LOD.



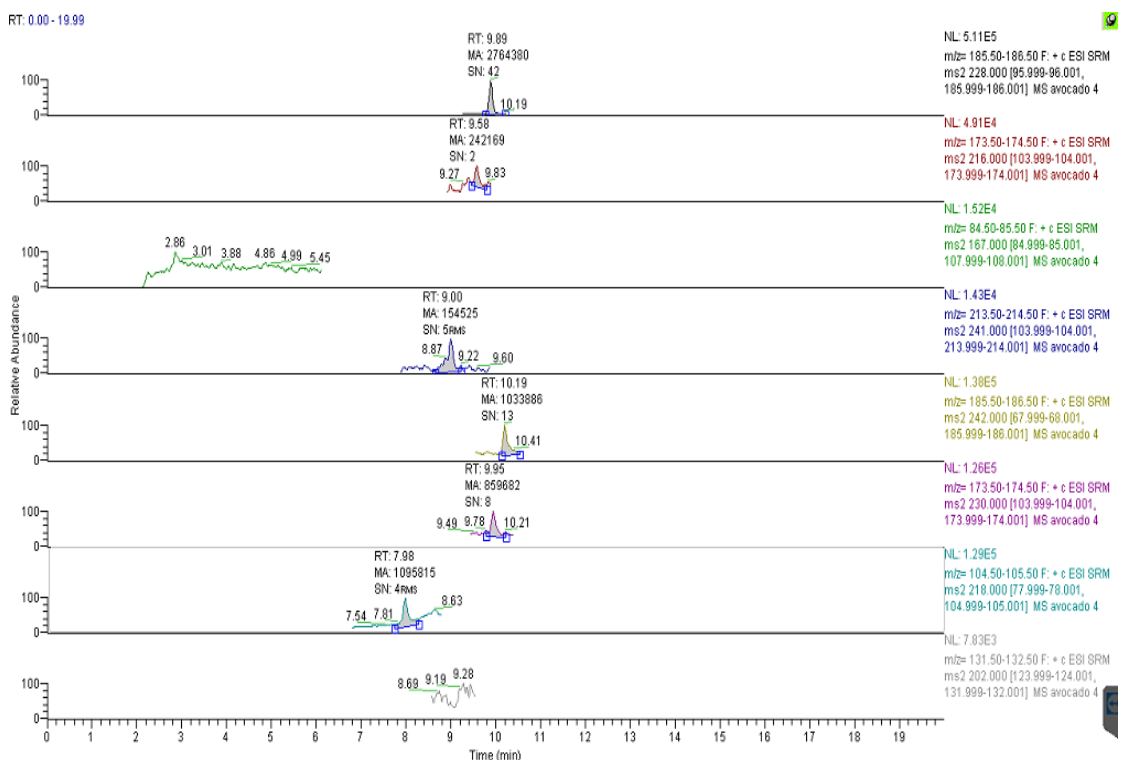
Σχήμα 44. Χρωματογράφημα δείγματος 2 , του ιόντος επιβεβαίωσης (qualifier ion)



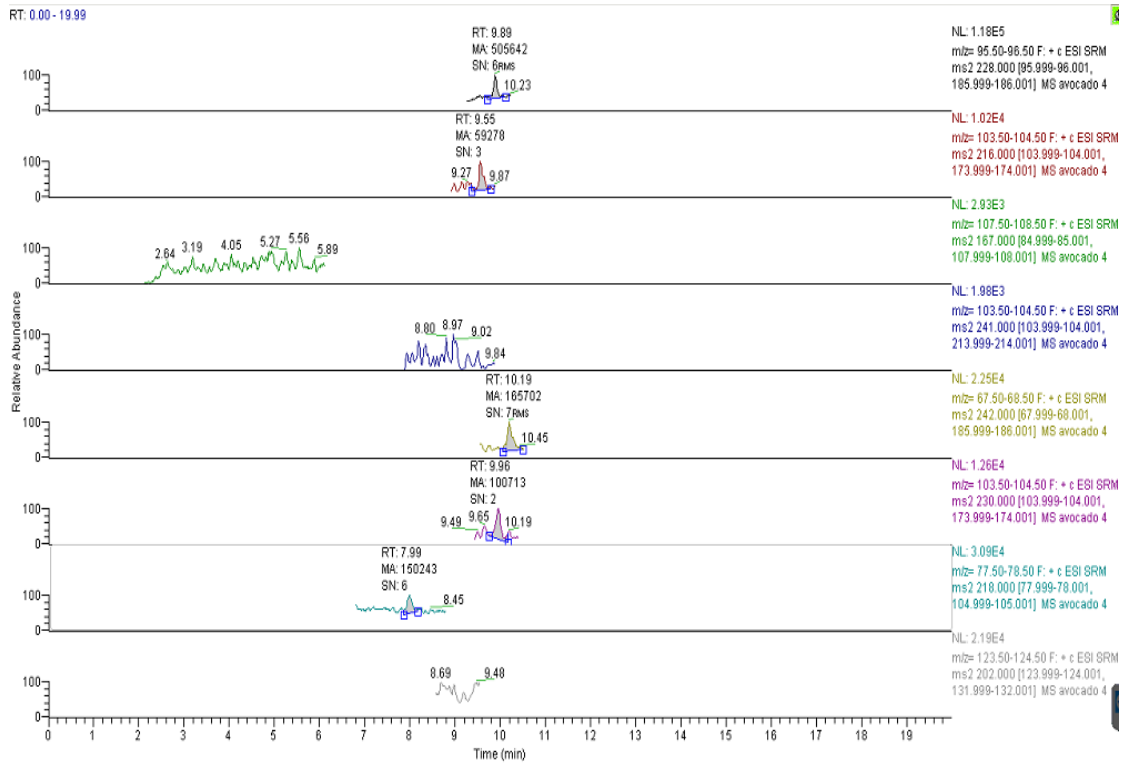
Σχήμα 45. Χρωματογράφημα δείγματος 3 του ιόντος ποσοτικοποίησης (quantifier ion) όπου φαίνεται ότι τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων είναι <LOD.



Σχήμα 46. Χρωματογράφημα δείγματος 3 , του ιόντος επιβεβαίωσης (qualifier ion)



Σχήμα 47. Χρωματογράφημα δείγματος 4 του ιόντος ποσοτικοποίησης (quantifier ion) όπου φαίνεται ότι τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων είναι <LOD.



Σχήμα 48. Χρωματογράφημα δείγματος 4 , του ιόντος επιβεβαίωσης (qualifier ion)

## 5. Συμπεράσματα

Με την τροποποιημένη μέθοδο προκατεργασίας Quechers σε ιστό αβοκάντο κατά την οποία εισήχθει ένα επιπλέον βήμα αυτή της κατάψυξης του δείγματος για 1,5 hr μετά την φυγοκέντρηση με σκοπό την απομάκρυνση των λιπαρών συστατικών του αβοκάντο (69), και με την ανάλυση σε υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας ανιχνεύτηκαν επιτυχώς όλες οι τριαζίνες αλλά επικυρώθηκαν οι επτά από τις οκτώ και πιο συγκεκριμένα η Atrazine, Cyanazine, Terbutryn, Terbuthylazine, Simazine, Pymetrozine, Ametryn. Πιο αναλυτικά:

Με βάση τον ΚΑΝ 396/2005 το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται στα 10 ppb και το οποίο επιτεύχθηκε. Το κατώτερο όριο ανίχνευσης για το ametryn βρέθηκε να είναι 1.53 ppb, atrazine 0.96 ppb, cyromazine 4.44 ppb, cyanazine 2.7 ppb, terbutryn 1.88 ppb, terbuthylazine 1.62 ppb, pymetrozine 1.84 ppb, simazine 2.52 ppb.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης που παρήχθησαν είναι όλες εντός ορίων των προϋποθέσεων της SANTE/12682/2019 με συντελεστές συσχέτισης για το ametryn 0.98734 , atrazine 0.98560, cyromazine 0.99739, cyanazine 0.99350, terbutryn 0.98475, terbuthylazine 0.98823, pymetrozine 0.99833, simazine 0.99709.

Στην συνέχεια ελέγχθηκε η ακρίβεια της μεθόδου μέσω των πειραμάτων της επαναληψιμότητας η οποία έγινε την ίδια ημέρα με 10 μετρήσεις και σε δύο επίπεδα φόρτισης (10/500 ppb), και της αναπαραγωγιμότητας σε βάθος χρόνου  $\approx$  15 ημερών σε τρία επίπεδα φόρτισης (10/100/500 ppb) με τρεις μετρήσεις έκαστο.

Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) της μεθόδου της επαναληψιμότητας για τις δέκα επαναλήψεις (n=10) στα δύο επίπεδα φόρτισης ήταν ακριβής και επαναλήψιμη για το ametryn ,το atrazine, το cyanazine, το terbuthylazine και για το simazine. Η cyromazine έδειξε ότι δεν δίνει ούτε ακριβή ούτε επαναλήψιμα αποτελέσματα με μέσο εύρος ανακτήσεων 123% και RSD% - 27,45% στα 10 ppb και μέσο εύρος

ανακτήσεων 11% και RSD% - 6,65% στα 500 ppb. Στην επαναληψιμότητα των 10 ppb το μέσο εύρος ανακτήσεων του terbutryn είναι 64% αλλά λόγω αποδεκτής ακρίβειας RSD% - 4,88% μπορεί να χρησιμοποιηθεί συντελεστής διόρθωσης του αποτελέσματος στην έκθεση για αυτόν τον αναλύτη (SANTE/12682/2019) . Ομοίως το pymetrozine με μέσο εύρος ανακτήσεων 58% και RSD% - 14,00%. Στην επαναληψιμότητα των 500 ppb το RSD% και το μέσο εύρος των ανακτήσεων είναι εντός ορίων και για τα δύο φυτοφάρμακα.

Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) της μεθόδου της αναπαραγωγιμότητας για τις τρεις επαναλήψεις (n=3) στα τρία επίπεδα φόρτισης ήταν ακριβής και επαναλήψιμη για το ametryn, το atrazine, το cyanazine, το terbutryn, το terbutylazine και το simazine .Η cyromazine συνέχισε να μην δίνει ούτε ακριβή ούτε επαναλήψιμα αποτελέσματα τα οποία δεν πληρούν τις προϋποθέσεις της SANTE/12682/2019. Η pymetrozine μόνο στο επίπεδο φόρτισης των 100ppb είχε μέσο εύρος ανακτήσεων 68% και RSD% - 14,61% στο οποίο μπορεί να γίνει διόρθωση του αποτελέσματος λόγω της ακρίβειας που είναι εντός αποδεκτών ορίων.

Ύστερα από υπολογισμό της αβεβαιότητας της κάθε τριαζίνης ξεχωριστά για τα τρία επίπεδα φόρτισης βρέθηκε η διευρυμένη αβεβαιότητα των τριών επιπέδων είναι εντός του  $\pm 50\%$  που είναι ορισμένο για τα φυτοφάρμακα από την SANTE/12682/2019.

## 6. Μελλοντική έρευνα

Η περαιτέρω ανάπτυξη της μεθόδου με υγρή χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας ή η ανάπτυξη μιας μονουπολειμματικής μεθόδου που να είναι ικανή όχι μόνο να ανιχνεύει το φυτοφάρμακο Cyromazine αλλά να μπορεί να δίνει επαναλήψιμα και αξιόπιστα αποτελέσματα του προσδιορισμού του. Αρχικά το cyromazine έδωσε καλή γραμμικότητα σε επιμολυσμένο εκχύλισμα αβοκάντο στα πέντε σημεία της καμπύλης σε συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 500 και 1000 ppb. Αλλά όμως από την μελέτη της επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας του, έδωσε ασταθείς και χαμηλές ανακτήσεις στην περίπτωση της επαναληψιμότητας, και είτε πολύ χαμηλές είτε πολύ υψηλές ανακτήσεις κατά την μελέτη της αναπαραγωγιμότητας. Προτείνεται η περαιτέρω έρευνα με σκοπό την τροποποίηση των παραμέτρων του MS, και της βελτιστοποίησης της μεθόδου προκατεργασίας ώστε ο προσδιορισμός της cyromazine να είναι εντός των προϋποθέσεων της SANTE/12682/2019. Επιπλέον προτείνεται η συλλογή και ανάλυση εδάφους και νερού από την Νότιο Αμερική στις περιοχές που γίνεται η παραγωγή αβοκάντο και η μελέτη υπολειμματικότητας και σταθερότητας των τριαζινών σε βάθος χρόνου.



## 7. Βιβλιογραφία

1. Toxicology: Agriculture and Environment - Pesticide chemistry, Dileep K. Singh, Bentham Science Publishers,2012,USA pg 50-53, (pg 97-98)
2. Υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στα αγροτικά προϊόντα. Ρυθμίσεις στην Ευρωπαϊκή Ένωση για την προστασία των καταναλωτών και την διευκόλυνση των εμπορικών συναλλαγών. Λέντζα- Ρίζου, Επτάλοφος ΑΒΕΕ, Αθήνα, 1994 (pg 13-14)
3. ΚΑΝ 396/2005 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα η πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου.
4. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 652/2014 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ για τη θέσπιση διατάξεων σχετικά με τη διαχείριση των δαπανών που αφορούν, αφενός, τη διατροφική αλυσίδα, την υγεία των ζώων και την καλή μεταχείριση των ζώων και, αφετέρου, την υγεία των φυτών και το φυτικό αναπαραγωγικό υλικό
5. ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 657/2002 για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων
6. Sittig's Handbook of Pesticides and Agricultural Chemicals, Second Edition Richard P. Pohanish, Published by Elsevier Inc,2005, USA
7. Tomlin C.,The pesticide manual. Fourteenth edition. British Crop Production Council, 2006, United Kingdom
8. Herbicides – Properties, Synthesis and control of weeds, Edited by Mohammed Naguib Abd El-Ghany Hasaneen, Published by InTech,2011 , Croatia, (pg 45-18)
9. Committee for veterinary medicinal products- Cyromazine, Summary report 1999, published by EMEA, UK
10. Food And Agriculture Organization of the United Nations , Specifications and evaluations for agricultural pesticides ,Cyromazine.
11. A History of weed science in the United States, Robert L. Zimdahl, Elsevier Inc, 2010, USA (pg 100)
12. The Triazine Herbicides Homer M. Le Baron, Janis E. McFarland, Orvin C. Burnside ,Published by Elsevier Science, USA,2008 (pg 31-37).
13. Γεωργική Φαρμακολογία. Συγγραφείς και Εκδόσεις Β. Ζιώγας / Α. Μάρκογλου,2007 (pg 536-540).

14. Metabolic pathways of agrochemicals, Part 1 :Herbicides and plant growth regulators, Terry Roberts, Published by The Royal Society of Chemistry, UK , 1998
15. ΥΠ/ΑΠ 5460/53790-25/07/2017 ΘΕΜΑ: Χορήγηση οριστικής έγκρισης στο βιοκτόνο (εντομοκτόνο) ΗΟΚΟΕΧ (Cyromazine), Αθήνα .
16. Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products, Evaluation of active substances, Assessment Report, Cyromazine, February 2016 (pg 9)
17. Medical Toxicology and worker health and safety branches department of pesticide regulation, California environmental protection agency, Risk characterization document, Cyromazine, 1993,(pg 2)
18. Ιστοσελίδα Υπουργείου Αγροτικής ανάπτυξης διαθέσιμο στο [www.minagric.gr/syspest/syspest\\_bycat\\_byactive.aspx](http://www.minagric.gr/syspest/syspest_bycat_byactive.aspx)
19. Effects of pymetrozine, an antifeedant of Hemiptera, on Asian citrus psyllid, *Diaphorina citri*, feeding behavior, survival and transmission of *Candidatus Liberibacter asiaticus*, Dhana Raj Boina, Youngnam Youn, Svetlana Folimonovac and Lukasz L Stelinskia, 2010
20. Chemical Pesticides- Mode of action and toxicology, Jorgen Stenersen, CRC press, 2004, USA (paragraph 7.2.4.4)
21. ΥΠ/ΑΠ 3887/40637-10/10/2014: «Τροποποίηση της με αριθμό 14043 οριστικής άδειας διάθεσης στην αγορά του φυτοπροστατευτικού προϊόντος (εντομοκτόνο) PLENUM 50 WG (δ.ο. pymetrozine ), ως προς το φάσμα δράσης(μικρής σημασίας), το εργοστάσιο παρασκευής του σκευάσματος, το εργοστάσιο συσκευασίας του σκευάσματος την ταξινόμηση και σήμανση και τις πρώτες βοήθειες»
22. Review report for the active substance pymetrozine, European Commission Health & Consumer Protection directorate-general, 2 July 2002
23. Herbicides and plant metabolism, A.D. Dodge, Published by the Press Syndicate of the University of Cambridge,USA,1989
24. Atrazine action on the donor side of photosystem II in triazine-resistant and susceptible weed biotypes ,Marc Purcell, Gilles D. Leroux and Robert Carpentier, 1990
25. Mode of action of photosystem II herbicides studied by thermoluminescence, Magdolna Droppa, Bor Horvath, Imre Vass and Sandor, .1981
26. Principles of weed science , Second Edition , V.S. Rao, Published by Science Publishers ,2000, USA
27. Plant physiology, third edition, Lincoln Taiz, Eduardo Zeiger. Publisher Sinauer associates, Inc ,2002 (pg 124-127)

28. Herbicides and Plant Physiology, Second Edition, Professor Andrew H. Cobb, Dr John P.H. Reade, Published by Wiley-Blackwell, United Kingdom, 2010
29. Phosphodiesterase 4 Inhibitors as Airways Smooth Muscle Relaxant Agents: Synthesis and Biological Activities of Triazine Derivatives , F. Leroux, B. J. van Keulen, J. Daliers, N. Pommery and J. P. HeÂnichart , Bioorganic & Medicinal Chemistry 7 ,1999 (pg 509-516)
30. 2-Chloro-s-Triazine Herbicides Induce Aromatase (CYP19) Activity in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells: A Novel Mechanism for Estrogenicity?, J. Thomas Sanderson, Willem Seinen, John P. Giesy, and Martin van den Berg, J. Thomas Sanderson, Willem Seinen, John P. Giesy, and Martin van den Berg, 1999. Published Society of Toxicology.
31. Effects of Chloro-s-Triazine Herbicides and Metabolites on Aromatase Activity in Various Human Cell Lines and on Vitellogenin Production in Male Carp Hepatocytes, F. Leroux, B. J. van Keulen, J. Daliers, N. Pommery and J. P. HeÂnichart ,2001.
32. Toxic Effects of Atrazine on Reproductive System of Male Rats\*, SONG Yang, JIA Zhen Chao, CHEN Jin Yao, HU Jun Xiang, and Zhang Li Shi, Sichuan- China, Published Biomed Environ Sci, 2014; 27(4): 281-288.
33. USEPA (2006), Cumulative Risk From Triazine Herbicides, (28 March, 2006). (pg 13-22).
34. Reproductive and developmental toxicology, Second Edition, Ramesh c. Gupta, Published by Elsevier Inc. 2011, USA (pg 506,517)
35. Female reproductive disorders: the roles of endocrine disrupting compounds and developmental timing, D. Andrew Crain, Sarah J. Janssen, Thea M. Edwards, Jerrold Heindel, Shuk-mei Ho, Patricia Hunt, Taisen Iguchi, Anders Juul, John A. McLachlan, Jackie Schwartz, Niels Skakkebaek, Ana M. Soto, Shanna Swan, Cheryl Walker, Teresa K. Woodruff, Tracey J. Woodruff, Linda C. Giudice, and Louis J. Guillette, 2008.
36. Bhardwaj JK, Saraf P (2014). Influence of Toxic Chemicals on Female Reproduction: A Review. Cell Biol: Res Ther 3:1.
37. The Triazine Herbicides 50 years Revolutionizing Agriculture, Edited by Homer M. LeBaron, Janis E. McFarland and Orvin C. Burnside, published Elsevier BV, 2008 , USA (pg 275-314,330)
38. Sorption, Transport and Transformation of Atrazine in Soils, Minerals and Composts: A Review, A. Mudhoo and V. K. Garg, Elsevier B.V. and Science Press, 2011
39. Γεωργικά φάρμακα (Χημεία, Φαρμακολογία, Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και συμπεριφορά και τύχη στο περιβάλλον), Ευθυμία Παπαδούλου-Μουρκίδου, Μέθεξις, 2008, ( pg 458)

40. Summary of Significant Results from Studies of Triazine Herbicides and Their Degradation Products in Surface Water, Ground Water, and Precipitation in the Midwestern United States During the 1990s, Elisabeth A. Scribner, E. M. Thurman, Donald A. Goolsby, Michael T. Meyer, William A. Battaglin, and Dana W. Kolpin, published by U.S. Geological Survey, Information Services, 2005, Virginia (pg 13)
41. Ministry of welfare, Health and cultural affairs, Rijswijk, Netherlands, Analytical methods for residues of pesticides in foodstuffs . P.A. Greve ed.,5<sup>th</sup> edition 1988 (part I-3).
42. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce , M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, JAOAC, Int 86(2) 412-31 ,2003
43. Μάθημα : Ασφάλεια Τροφίμων, Διαλέξεις 2020- Κανονισμοί και έλεγχος φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα, Ρήγας Παντελής
44. Chromatography, Principles and Instrumentation, Mark F. Vitha, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey 2017 (pg 1-3)
45. Chromatography Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods, Elsa Lundanes, Léon Reubsaet and Tyge Greibrokk ,Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2014, germany (pg 33,48,54,86,89-92)
46. Gas chromatography and mass spectrometry : a practical guide, / O David Sparkman, Zelda E. Penton, Fulton G. Kitson. – 2nd ed. Elsevier UK 2011 (pg 3,105-108)
47. Negative Chemical Ionization Mass Spectrometry, Andreas Leonardus Cornelius Smit (7-12), 1979
48. Principles and application of gas chromatography in food analysis , Michael H. Gordon, 1990 (pg 65-67,69-72,352-353)
49. Forensic Application of Gas Chromatography , Michelle Groves Carlin and John R. Dean,2013, CRC Press, U.S. (pg 26-28)
50. Mass spectrometry basics, Christopher G. Herbert ,Robert A.W. Johnstone , CRC Press LLC, 2003, USA, (pg 5,201-204,288)
51. Gas Chromatography and Mass Spectrometry ,Fulton G. Kitson, Barbara S. Larsen, Charles N. McEwen., Academic Press, INC.1996, California (pg 13)
52. Chemicool dictionary, Schematic of a quadrapole filter web page : [https://www.chemicool.com/definition/quadrupole\\_mass\\_spectrometry.html](https://www.chemicool.com/definition/quadrupole_mass_spectrometry.html)
53. Basic gas chromatography, Second Edition, Harold M. McNair, James M. Miller, John Wiley & Sons, New Jersey 2009 (pg 163-164)
54. Mass spectrometry, Sam Adam-Day, 2018 web page : <https://alevelnotes.com/notes/chemistry/elements-of-life/mass-spectrometry>

55. Chromatography- The most versatile method of chemical analysis, Edited by Leonardo de Azevedo Calderon, InTech , Croatia,2012 (pg 90)
56. Gas chromatography in plant science , Wine technology, toxicology of some specific applications, Edited by Bekir Salih and Ömür Çelikbıçak, InTech, Croatia 2012 (pg 257)
57. Mass Spectrometry and Hyphenated Instruments in Food Analysis, Tomas Cajka, Jana Hajslova, and Katerina Mastovska, by Taylor & Francis Group, 2014
58. Modern practice of gas chromatography, fourth edition, Robert L. Grob, Eugene F. Barry, John Wiley & Sons, Inc, New Jersey 2004(pg 73)
59. web page : <http://orgchemguide.blogspot.com/2011/04/magnetic-deflection-or-sector-mass.html>, 2011
60. LAB SERIES# 13: MASS SPECTROMETRY INSTRUMENTATION PRINCIPLES,web page: <https://varuncnmicro.blogspot.com/2016/06/lab-series-13-mass-spectrometry.html>
61. Photomultiplier tubes : Basic and applications , third edition Hamamatsu Photonics K.K 2007 (pg 13)
62. Hamamatsu Photonics K.K, web page : [https://www.hamamatsu.com/jp/en/product/optical-sensors/pmt/about\\_pmts/index.html](https://www.hamamatsu.com/jp/en/product/optical-sensors/pmt/about_pmts/index.html)
63. Practical Gas Chromatography, A Comprehensive Reference, Katja Dettmer-Wilde, Werner Engewald, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 2014 (pg 323,332)
64. Food and Environmental Analysis by Capillary Gas Chromatography, Lothar Matter, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2002 (pg 30,32-33)
65. Advances in Gas Chromatography, Xinghua Guo, Published AvE4EvA ,2014 (pg 23)
66. Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications, Mustafa Ali Mohd, InTech, Croatia 2012 (pg 12)
67. Methods in enzymology, John N. Abelson and Melvin I. Simon,United Kingdom, Elsevier Inc,2011 (pg 25)
68. Liquid chromatography- mass spectrometry : An introduction, Robert E.Ardrey , John Wiley & Sons Ltd,2003, UK (pg 53)
69. CRL- Community Reference laboratory for single residue methods, Web page <https://www.quechers.com/pdf/q-avocado.pdf>
70. Μάθημα : Ασφάλεια Τροφίμων, Διαλέξεις 2020- Κριτήρια επίδοσης αναλυτικών μεθόδων- Φυτοφάρμακα, Ρήγας Παντελής
71. SANTE/12682/2019 Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.

72. Υπολογισμός της συνδυασμένης αβεβαιότητας ζύγισης, Amanatidou Elisavet, 2007
73. ΟΔΗΓΙΑ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ 91/414/ΕΟΚ σχετικά με τη διάθεση στην αγορά φυτοπροστατευτικών προϊόντων