



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Διπλωματική Εργασία

Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα
με χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας

Γεώργιος Χουρδάκης

Επιβλέπουσα καθηγήτρια: Δημητρούλα Λαμπροπούλου

Πάτρα, Ιούνιος 2023

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία του φοιτητή Γεωργίου Χουρδάκη που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης ο συγγραφέας/δημιουργός εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του συγγραφέα/δημιουργού. Ο συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα με
χρήση υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας

Γεώργιος Χουρδάκης

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια:

Δημητρούλα Λαμπροπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια στο τμήμα
Χημείας του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου
Θεσσαλονίκης

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

Αναστάσιος Καμπόλης

Μέλος ΣΕΠ στο Ελληνικό Ανοικτό
Πανεπιστήμιο

Πάτρα, Ιούνιος 2023

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση» του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου. Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης, αρκετοί άνθρωποι συνέβαλλαν στην πραγματοποίησή της και τους οποίους ευχαριστώ από καρδιάς.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου, αναπληρώτρια καθηγήτρια του τμήματος Χημείας στο Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, κυρία Δήμητρα Λαμπροπούλου για την επιστημονική καθοδήγησή της, την υποστήριξή της και την εκτίμηση που μου έδειξε.

Επίσης, ευχαριστώ τον συν-επιβλέπων καθηγητή μου, μέλος ΣΕΠ του Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου, κύριο Αναστάσιο Καμπόλη για τις χρήσιμες συμβουλές, διορθώσεις και παρατηρήσεις του.

Κλείνοντας, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς την οικογένειά μου για την κατανόηση, την υπομονή και την αμέριστη στήριξη της καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

Περίληψη

Η παρουσία υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων, που χρησιμοποιούνται ευρέως στις αγροτικές καλλιέργειες, σε βρώσιμα προϊόντα όπως είναι τα φρούτα εμπεριέχει δυνητικούς κινδύνους για την υγεία των καταναλωτών καθώς εμφανίζουν υψηλή τοξικότητα όταν οι συγκεντρώσεις τους υπερβαίνουν τα ασφαλή όρια που έχουν τεθεί από την αρμόδια Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Για το λόγο αυτό η ακριβής και αξιόπιστη ανάλυση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα είναι αναγκαία και έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη διαφόρων αναλυτικών τεχνικών με στόχο την ανίχνευση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό τους. Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας μελετάται η εφαρμογή των τεχνικών ανάλυσης πολλαπλών υπολειμμάτων που βασίζονται στη σύζευξη υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας στον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων στα φρούτα, οι οποίες έχουν αναγνωριστεί ως εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές για τον σκοπό αυτό. Ειδικότερα, η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας τριπλού τετράπολου ή με φασματογράφους μάζας υψηλής ανάλυσης όπως είναι οι Q-TOF και οι Q-TRAP παρέχει υψηλό βαθμό ευαισθησίας και μεγάλη εκλεκτικότητα και είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών-στόχων σε δείγματα φρούτων. Για την προετοιμασία των δειγμάτων, η εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα, επιτυγχάνοντας υψηλές ανακτήσεις των αναλυτών.

Λέξεις – Κλειδιά: Υπολείμματα φυτοφαρμάκων, υγρή χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας, εκχύλιση

Determination of pesticide residues in fruits using Liquid Chromatography- Mass Spectrometry

Georgios Chourdakis

Abstract

The presence of pesticide residues, widely used in agricultural crops and in edible products such as fruits, poses potential risks to consumer health as they are highly toxic when their concentrations exceed the safe limits set by the European Commission. For this reason, accurate and reliable analysis of pesticide residues in fruit is necessary and has led to the development of various analytical techniques aimed at the detection of pesticide residues and their accurate quantification. In the context of the present thesis, the application of multi-residue analysis techniques based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry in the determination of pesticide residues in fruits, is studied. In particular, high-performance liquid chromatography coupled with triple quadrupole mass spectrometry or high-resolution mass spectrometers such as Q-TOF and Q-TRAP provide a high degree of sensitivity and high selectivity and are suitable for the quantification of target analytes in fruit samples. For sample preparation, QuEChERS extraction is the most commonly used technique for the analysis of pesticide residues in fruit, achieving high recoveries of analytes.

Keywords: Pesticide residues, liquid chromatography, mass spectrometry, extraction

Περιεχόμενα

Περίληψη	v
Abstract	vi
Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων	ix
Κατάλογος Πινάκων	xi
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο : ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	4
1.1 Ορισμός, ιδιότητες και σύντομη ιστορική αναδρομή	4
1.2 Κατηγορίες Φυτοπροστατευτικών Ενώσεων	5
1.2.1 Οργανοχλωριωμένα	7
1.2.2 Οργανοφωσφορικά	7
1.2.3 Καρβαμικά	7
1.2.4 Πυρεθρινοειδή	8
1.2.5 Τριαζίνες	9
1.3 Προϊόντα μετασχηματισμού των φυτοφαρμάκων και υπολειμματική δράση	9
1.4 Νομοθετικό πλαίσιο για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο : ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	13
2.1 Εισαγωγή	13
2.2 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE)	14
2.3 Διασπορά Στερεάς Φάσης Υποστρώματος (MSPD)	16
2.4 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)	17
2.5 Καθαρισμός με την τεχνική dSPE	22
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο : Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ - ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ	23
3.1 Εισαγωγή	24
3.2 Υγρή Χρωματογραφία	25
3.2.1 Αναλυτικές στήλες	26
3.2.2 Ανιχνευτές	27
3.2.3 HPLC και UHPLC	28
3.3 Φασματομετρία Μάζας	29
3.3.1 Γενική Περιγραφή του Οργάνου	30

3.3.2 Τεχνικές ιοντισμού.....	31
3.3.3 Αναλυτές μαζών.....	34
3.3.4 Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας	40
3.4 Σύζευξη υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας σειρά (LC-MS/MS) ..	41
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο : ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC- MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΦΡΟΥΤΑ	44
4.1 Εισαγωγή.....	44
4.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με UHPLC-QTOF --MS/MS	51
4.2.1 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική LLE σε συνδυασμό με UHPLC-QTOF -MS/MS	51
4.2.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική εκχύλισης QuEChERS σε συνδυασμό με UHPLC-QTOF -MS/MS.....	54
4.3 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με UHPLC- QTRAP- MS/MS.....	58
4.4 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με UHPLC- MS/MS τριπλού τετράπολου (TQD UHPLC-MS/MS)	64
4.4.1 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική εκχύλισης MSPD σε συνδυασμό με TQD UHPLC -MS/MS.....	64
4.4.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική εκχύλισης QuPPE σε συνδυασμό με TQD HPLC -MS/MS	67
4.4.3 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική εκχύλισης QuEChERS σε συνδυασμό με TQD UHPLC -MS/MS	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	87
BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ	90

Κατάλογος Εικόνων / Σχημάτων

Εικόνα 1.1 Χημικοί τύποι ευρέως χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων	6
Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης υγρού – υγρού	16
Εικόνα 2.2 Απεικόνιση της εκχύλισης MSPD	17
Εικόνα 2.3 Απεικόνιση της μεθόδου QuEChERS	22
Εικόνα 2.4 Απεικόνιση της μεθόδου dSPE.....	23
Εικόνα 3.1 Σχηματική απεικόνιση της HPLC.....	28
Εικόνα 3.2 Σχηματική απεικόνιση της πηγής ιονισμού με ηλεκτροψεκασμο ESI	34
Εικόνα 3.3 Διαχωριστική ικανότητα φασματομέτρου μαζών.....	36
Εικόνα 3.4 Σχηματική απεικόνιση του τριπλού τετράπολου.....	37
Εικόνα 3.5 Σχηματικό διάγραμμα αναλυτή Q-TOF.....	39
Εικόνα 3.6 Απεικόνιση αναλυτή μάζας Orbitrap.....	40
Εικόνα 3.7 Σχηματική απεικόνιση της αναλυτικής πορείας με την συζευγμένη τεχνική LC-MS	43
Εικόνα 4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός φυτοφαρμάκων σε μάνγκο με την τεχνική UHPLC-Q-TOF/MS	53
Εικόνα 4.2 Χρωματογραφήματα των 10 φυτοφαρμάκων σε μήλα με την τεχνική UHPLC-Q-TOF/MS	55
Εικόνα 4.3 Χρωματογράφημα ολικού ιόντος εκχυλίσματος starfruit εμβολιασμένου με τα 50 υπό μελέτη φυτοφάρμακα (50–100 ng/mL).....	57
Εικόνα 4.4 LC-MS/MS χρωματογραφήματα της πυρακλοστροβίνης σε φράουλες	60
Εικόνα 4.5 Χρωματογραφήματα LC–MS/MS του nitenpyram σε ακτινίδια	62
Εικόνα 4.6 Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου εκχύλισης BiT-MSPD για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα.....	65
Εικόνα 4.7 Χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος που αντιστοιχεί σε μήτρα αχλαδιού στα 20 µg L ⁻¹ και σύγκριση μεταξύ του σήματος για τη θειαβενδαζόλη ενός πρότυπου διαλύματος (20 µg L ⁻¹ , πράσινη γραμμή) και ενός δείγματος αχλαδιού (150 µg kg ⁻¹ , κόκκινη γραμμή)	66
Εικόνα 4.8 Ανάκτηση (%) των 6 πολικών φυτοφαρμάκων στα ρόδια για επίπεδα εμβολιασμού στα 10 και τα 50 µg/kg.....	68
Εικόνα 4.9 Χρωματογραφικές κορυφές (MRM) τριών επιλεγμένων φυτοφαρμάκων (Fenprovidine, Clomazone, Pyraclostrobin).....	70
Εικόνα 4.10 Χρωματογραφήματα των 8 υπό μελέτη φυτοφαρμάκων σε γκότζι μπερί.....	72
Εικόνα 4.11 Σύγκριση του ποσοστού ανάκτησης διαφόρων φυτοφαρμάκων με εκχύλιση με ακετονιτρίλιο ή οξικό αιθυλεστέρα	73

Εικόνα 4.12 Χρωματογραφήματα ολικού ιόντος (TIC) για τα 31 υπό μελέτη φυτοφάρμακα	74
Εικόνα 4.13 Προσδιορισμός 165 φυτοφαρμάκων σε εσπεριδοειδή με LC-MS/MS.....	79
Εικόνα 4.14 Χρωματογραφήμα εκχυλισμένων ιόντων του μικτού πρότυπου διαλύματος που λαμβάνεται με UPLC-MS/MS σε συγκέντρωση 0,1 mg/kg	81
Εικόνα 4.15 (a) Φάσματα μάζας των 287 φυτοφαρμάκων σε εσπεριδοειδή (b) Χρωματογράφημα του matrix matched προτύπου συγκέντρωσης 0.5mg/ml (c) Χρωματογράφημα LOQ. (d) Χρωματογράφημα του τυφλού διαλύματος (e) Καμπύλη βαθμονόμησης matrix-matched . (f) Φάσμα μάζας του mefenacet σε δείγμα μανταρινιού	83
Εικόνα 4.16 Χρωματογράφημα ολικών ιόντων LC-MS/MS για τα 74 φυτοφάρμακα-στόχους σε ρόδια	84

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 4.1 Περίληψη των διαδικασιών εκχύλισης και ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα κατά το χρονικό διάστημα 2015 -2023, συμπεριλαμβανομένων των ανακτήσεων και των RSD, CV, LODs και LOQs, κατά χρονολογική σειρά.....	46
--	----

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Ο ποιοτικός έλεγχος των τροφίμων αποτελεί μία υψίστης σημασίας διαδικασία ώστε να διασφαλιστεί η ασφάλεια και η υγεία των καταναλωτών. Στις διάφορες ομάδες τροφίμων που χρήζουν ανάλυσης πριν την διάθεση στους καταναλωτές ανήκουν τα φρούτα, τα οποία αποτελούν αναπόσπαστο μέρος της υγιεινής διατροφής, καθώς οι λειτουργικές ενώσεις που περιέχουν, όπως για παράδειγμα οι βιταμίνες, τα καροτενοειδή, τα ιχνοστοιχεία, οι φαινόλες και οι φυτικές ίνες, είναι απαραίτητες για την εύρυθμη λειτουργία του ανθρώπινου οργανισμού (Shashirekha et al., 2015). Ωστόσο, η χρήση φυτοπροστατευτικών ενώσεων κατά τη διαδικασία καλλιέργειας και παραγωγής τους δύναται να οδηγήσει στην παρουσία υπολειμμάτων των ουσιών αυτών, τα οποία είναι τοξικά και επικίνδυνα για την υγεία των καταναλωτών. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των φρούτων τα οποία – ως επί το πλείστον - καταναλώνονται ωμά (Mebdoua et al., 2017).

Είναι γεγονός πως η χρήση φυτοφαρμάκων αποτελεί απαραίτητο εφόδιο στις γεωργικές καλλιέργειες, αυξάνοντας την παραγωγικότητα και προστατεύοντας τις καλλιέργειες από ζιζάνια και παθογόνους μικροοργανισμούς. Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, η ταχεία αστικοποίηση και ο συνεχώς αυξανόμενος πληθυσμός του πλανήτη έχει οδηγήσει σε υπερβολική χρήση των ουσιών αυτών σε παγκόσμιο επίπεδο, η οποία εκτιμάται πως ξεπερνά τα έξι εκατομμύρια τόνους ετησίως, εκ των οποίων το 47% χρησιμοποιείται στις ευρωπαϊκές γεωργικές καλλιέργειες, το 24% στην ασιατική ήπειρο, το 23% στις Η.Π.Α. και το 6% στον υπόλοιπο κόσμο (FAOSTAT, 2019, Sharma et al., 2019). Αναπόφευκτα, τα υπερβολικά επίπεδα χρήσης φυτοφαρμάκων οδηγούν στην παραμονή των υπολειμμάτων των δραστικών συστατικών των ουσιών αυτών καθώς και των προϊόντων διάσπασής τους και των μεταβολιτών τους, στα βρώσιμα προϊόντα και στο περιβάλλον, αποτελώντας απειλή για τη δημόσια υγεία και το οικοσύστημα. Είναι γεγονός πως η χρόνια έκθεση σε υψηλά και μη ασφαλή επίπεδα φυτοπροστατευτικών ουσιών δύναται να προκαλέσει ένα μεγάλο φάσμα ασθενειών και δυσλειτουργιών στον ανθρώπινο οργανισμό, μεταξύ των οποίων οι γενετικές ανωμαλίες, ανοσοτοξικότητα και νευροτοξικότητα, διαταραχές στο ενδοκρινικό σύστημα και καρκινογένεση. Έχει αναφερθεί πως η πρόσληψη τοξικών ουσιών από τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων στα προϊόντα της γεωργίας είναι

σημαντικά μεγαλύτερη από την αντίστοιχη πρόσληψη των ουσιών αυτών από το νερό ή τον ατμοσφαιρικό αέρα και ιδιαίτερα στην περίπτωση των φρούτων τα οποία – ως επί το πλείστον - καταναλώνονται ωμά και δίχως περαιτέρω επεξεργασία, η πρόσληψη αυτών των τοξικών υπολειμμάτων από τον άνθρωπο πραγματοποιείται σε ακόμα μεγαλύτερο βαθμό (Park et al., 2022). Ως εκ τούτου, η εφαρμογή ορθών γεωργικών πρακτικών και η παρακολούθηση και έλεγχος των επιπέδων των φυτοφαρμάκων στα φρούτα είναι υψίστης σημασίας για την διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Η αξιολόγηση του κινδύνου για την υγεία των καταναλωτών πραγματοποιείται μέσω του ελέγχου της μέγιστης επιτρεπόμενης ποσότητας υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ενώσεων που έχουν τεθεί από τους αρμόδιους οργανισμούς διεθνώς (και συνήθως εκφράζονται σε mg/Kg του τροφίμου), καθώς η υπέρβαση των ορίων αυτών στα φρούτα συνιστά κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών (Ssemugabo et al., 2022).

Καθίσταται, λοιπόν, σαφές πως η ολοένα και αυξανόμενη χρήση των φυτοφαρμάκων σε συνδυασμό με την απαίτηση για την διασφάλιση της ασφαλούς κατανάλωσης τροφίμων, έχει οδηγήσει στη χρήση νέων τεχνικών ενόργανης χημικής ανάλυσης καθώς και στην ανάγκη βελτιστοποίησης των μεθόδων αυτών, με σκοπό την αύξηση του αριθμού των φυτοπροστατευτικών ενώσεων που μπορούν να αναλυθούν ταυτόχρονα, καθώς και την αύξηση της ταχύτητας πραγματοποίησης των αναλύσεων αλλά και της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων της ανάλυσης, απαραίτητη προϋπόθεση για την οποία είναι η διαπίστευση της αναλυτικής μεθόδου. Οι τεχνικές ανάλυσης πολλαπλών υπολειμμάτων που βασίζονται στη σύζευξη υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας σε σειρά (LC-MS/MS) πολλαπλών υπολειμμάτων έχουν αναγνωριστεί διεθνώς ως εξαιρετικά ευαίσθητες και ειδικές για τον έλεγχο της ποιότητας των τροφίμων. Η LC-MS/MS, μέσω της υψηλής εκλεκτικότητας που εμφανίζει, παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού ενός μεγάλου αριθμού φυτοφαρμάκων που ανήκουν σε διαφορετικές χημικές κατηγορίες, σε μία μόνο εκτέλεση της αναλυτικής διαδικασίας και για το λόγο αυτό είναι ιδανική για την αξιολόγηση του κινδύνου της ανθρώπινης υγείας από την κατανάλωση των συγκεκριμένων τροφίμων (Stachniuk and Fornal, 2016).

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη της εφαρμογής της τεχνικής LC-MS/MS στον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα μέσω της αναζήτησης πρόσφατων ερευνών στη διεθνή βιβλιογραφία. Πιο συγκεκριμένα, στο πρώτο

κεφάλαιο πραγματοποιείται αναφορά στα είδη και τις κατηγορίες των φυτοπροστατευτικών ενώσεων καθώς και της ισχύουσας νομοθεσίας σχετικά με τα μέγιστα επιτρεπτά όρια της ποσότητας των υπολειμμάτων τους στα τρόφιμα. Στη συνέχεια, στο κεφάλαιο 2, πραγματοποιείται η περιγραφή των κυριότερων μεθόδων προκατεργασίας και εκχύλισης των δειγμάτων, με έμφαση στην τεχνική QuEChERS που χρησιμοποιείται συνηθέστερα. Στο 3^ο κεφάλαιο περιγράφονται οι τεχνικές της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και της φασματομετρίας μάζας (MS) καθώς και η εφαρμογή της συζευγμένης τεχνικής HPLC-MS/MS, με χρήση διαφορετικών ειδών ανιχνευτών MS, στην ανίχνευση φυτοφαρμάκων. Στο κεφάλαιο 4 μελετάται η εφαρμογή της τεχνικής HPLC – MS/MS για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα σε διεθνείς μελέτες που πραγματοποιήθηκαν κυρίως την τελευταία 5-ετία, με την περιγραφή των μεθοδολογιών που χρησιμοποίησαν οι ερευνητές και την καταγραφή των αποτελεσμάτων στα οποία κατέληξαν. Τα συμπεράσματα που προκύπτουν από αυτές τις μελέτες συζητούνται στο τελευταίο κεφάλαιο της παρούσας εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο : ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

1.1 Ορισμός, ιδιότητες και σύντομη ιστορική αναδρομή

Ως φυτοφάρμακα ή φυτοπροστατευτικές ενώσεις ορίζονται οι χημικές ενώσεις οι οποίες προορίζονται για την προστασία των καλλιεργήσιμων φυτών από παθογόνους και επιβλαβείς μικροοργανισμούς και ζιζάνια, μέσω της καταστροφής ή παρεμπόδισής τους, προάγοντας τη βελτιστοποίηση της παραγωγής των φυτικών προϊόντων (ΕΛΙΝΥΑΕ, 2013).

Οι φυτοπροστατευτικοί παράγοντες αποτελούν προϊόντα που έχουν συγκεκριμένη δομή και περιέχουν έναν αριθμό δραστικών ουσιών (μία ή περισσότερες) με σκοπό:

- Την προστασία των καλλιεργειών και των φυτικών προϊόντων από επιβλαβείς οργανισμούς και την πρόληψη της δράσης τους επάνω στα φυτά.
- Την πρόληψη της μη επιθυμητής ανάπτυξης των φυτών και την καταστροφή των ανεπιθύμητων φυτών.
- Τη συμβολή τους στη διαφύλαξη της ποιότητας των παραγόμενων φυτικών προϊόντων.

Τα φυτοφάρμακα εμφανίζουν ένα σύνολο χαρακτηριστικών ιδιοτήτων, ανάμεσα στις οποίες είναι οι εξής (Καρακίτσιου, 2012):

1. Τοξικότητα : Τα φυτοφάρμακα έχουν την ιδιότητα να δρουν με επιβαρυντικό τρόπο όχι μόνο ως προς τον οργανισμό που στοχεύουν αλλά και έναντι άλλων έμβιων οργανισμών, όπως ο άνθρωπος και τα ζώα.
2. Αποτελεσματικότητα : Η ιδιότητα των φυτοφαρμάκων να ασκούν ένα ευρύ φάσμα αρνητικών επιπτώσεων στους οργανισμούς στους οποίους στοχεύουν.
3. Επικινδυνότητα : Η πιθανότητα να εμφανιστεί τοξική δράση μετά από χρήση ενός φυτοφαρμάκου.

4. Συνδυαστικότητα : Η ικανότητα να μπορούν να εφαρμόζονται ταυτόχρονα δύο ή περισσότερες φυτοπροστατευτικές ενώσεις χωρίς η μία να επηρεάζει τη δραστηριότητα της άλλης.
5. Υπολειμματική δράση : Αποτελεί την ικανότητα μίας φυτοπροστατευτικής ένωσης να συνεχίζει τη δράση της, έπειτα από την εφαρμογή της, για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.

Η χρήση χημικών ουσιών για την προστασία των φυτών από επιβλαβείς οργανισμούς είχε ξεκινήσει από την αρχαιότητα και έκτοτε η ιστορία της χρήσης του ουσιών αυτών μπορεί να διακριθεί σε 3 φάσεις. Κατά την πρώτη φάση, η οποία χρονικά τοποθετείται πριν από το 1870, η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων αφορούσε μόνο φυσικές ουσίες για τον έλεγχο των παρασίτων στα φυτά. Κατά τη δεύτερη φάση, η οποία έλαβε χώρα μεταξύ των ετών 1870 και 1945, η χρήση φυτοφαρμάκων περιλάμβανε ανόργανες συνθετικές ουσίες και κατά την τρίτη φάση, η οποία ξεκίνησε το 1945 και συνεχίζεται έως και σήμερα, τα χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα ανήκουν στην κατηγορία των συνθετικών γεωργικών φαρμάκων (Νάννου, 2018).

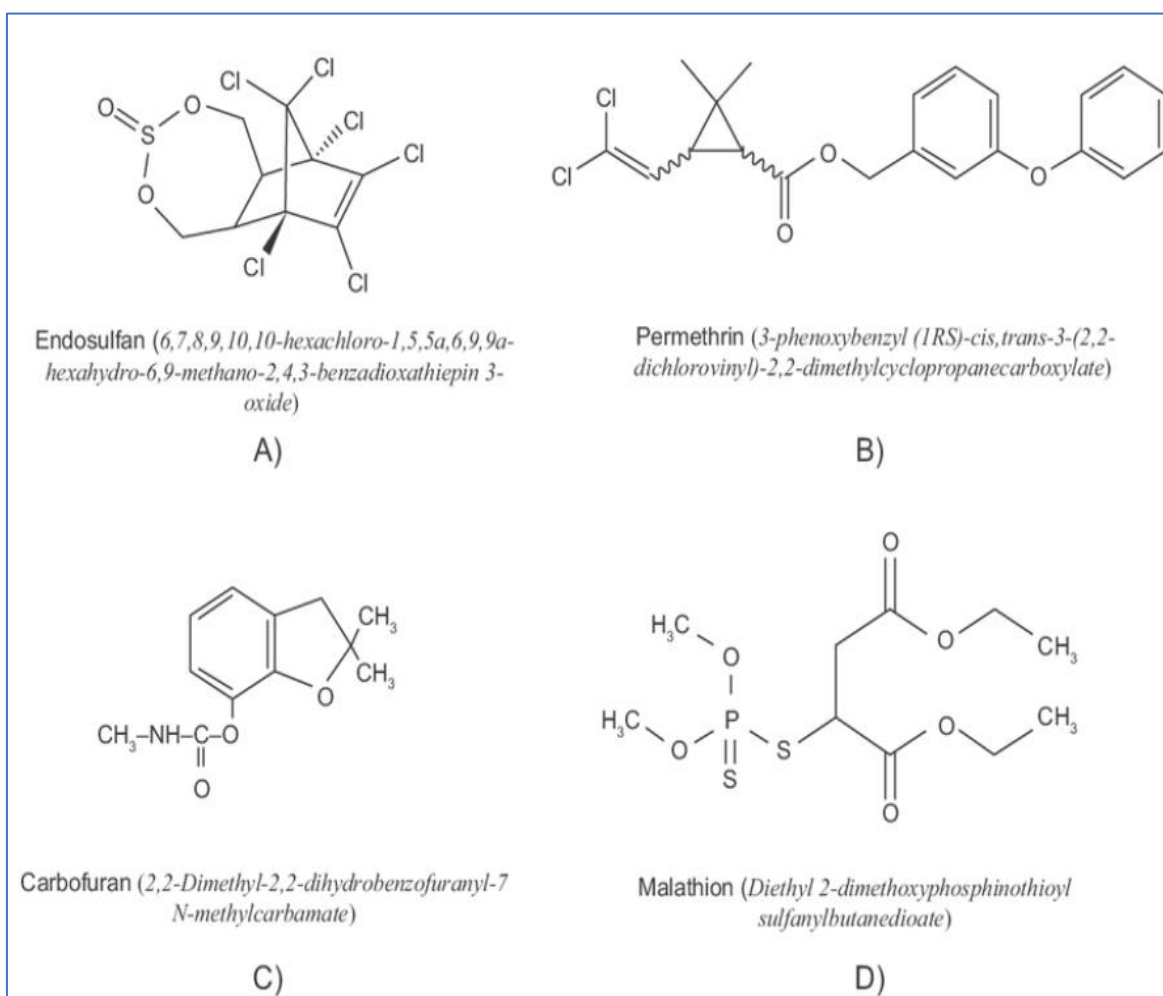
1.2 Κατηγορίες Φυτοπροστατευτικών Ενώσεων

Η ταξινόμηση των φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε κατηγορίες μπορεί να διαφοροποιηθεί ανάλογα με το προαπαιτούμενο κριτήριο που τίθεται. Για παράδειγμα, τα φυτοφάρμακα μπορούν να διακριθούν ανάλογα με τη φυσική κατάσταση στην οποία βρίσκονται σε υγρά, στερεά και αέρια, ενώ μία ακόμα διάκριση μπορεί να γίνει με βάση την προέλευσή τους σε φυτικά, συνθετικά και βιολογικά φυτοφάρμακα. Ωστόσο, η πιο συνηθισμένη κατηγοριοποίηση των φυτοφαρμάκων πραγματοποιείται είτε με βάση τον τρόπο με τον οποίο δρουν, είτε με βάση τη χημική σύνθεσή τους. Με βάση τη δράση τους, τα φυτοφάρμακα κατηγοριοποιούνται σε (Εμμανουήλ κ.α., 2019):

- Εντομοκτόνα, τα οποία δρουν απέναντι στα έντομα

- Ζιζανιοκτόνα, τα οποία προάγουν την παρεμπόδιση της ανάπτυξης μη επιθυμητών φυτών
- Μυκητοκτόνα, τα οποία καταπολεμούν τους μύκητες
- Ακαρεοκτόνα, τα οποία χρησιμοποιούνται για την εξουδετέρωση των ακάρεων
- Τρωκτικοκτόνα, τα οποία εξουδετερώνουν τα τρωκτικά.

Με βάση την χημική τους σύνθεση, τα πλέον χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα διακρίνονται σε οργανοχλωριωμένα, πυρεθρινοειδή, οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά, καθώς και τριαζινικά προϊόντα (Γεωργόπουλος κ.α., 2013), τα οποία αναλύονται στη συνέχεια.



Εικόνα 1.1 Χημικοί τύποι ευρέως χρησιμοποιούμενων φυτοφαρμάκων (Ortiz-Hernandez et al., 2013)

1.2.1 Οργανοχλωριωμένα

Από τις πιο παλιές οργανικές ενώσεις εντομοκτόνων είναι τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα και πρωτοπόρο σκεύασμα ήταν το DDT από τότε που άρχισε αυτή η κατηγορία να αναπτύσσεται. Όλα τα εντομοκτόνα αυτής της κατηγορίας είναι παράγωγα οργανοχλωριωμένων υδρογονανθράκων των οποίων δεν είναι γνωστός ο μηχανισμός δράσης αλλά από μελέτες που έχουν γίνει φαίνεται να δρουν στο νευρικό σύστημα των θηλαστικών και των εντόμων, προκαλώντας διατάραξη του νευρικού συστήματος με αποτέλεσμα τα ζώα να εμφανίζουν υπερκινητικότητα, παράλυση και στο τέλος θάνατο. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο φυτοφάρμακο αυτής της κατηγορίας είναι το Endosulfan (Chung and Chen, 2011).

1.2.2 Οργανοφωσφορικά

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα είναι οργανικές σύνθετες ουσίες, προερχόμενες από το φωσφορικό και θειοφωσφορικό οξύ με μεγάλο φάσμα δράσης εναντίον των εντόμων και στην κατηγορία αυτή περιέχονται πολλές ουσίες όπως για παράδειγμα τα Diazinon, HETP, Malathion, Parathion-methyl κ.α. (Storm, Rozman & Doull, 2000). Οι ουσίες αυτές σκοτώνουν το έντομο καταστρέφοντας το ένζυμο χολινεστεράση το οποίο καταλύει την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη που είναι απαραίτητος για το νευρικό τους σύστημα. Γενικά αυτές οι ουσίες έχουν μεγάλη δραστηριότητα σε έντομα και ακάρεα, ευρύ φάσμα δράσης, μικρή υπολειμματική διάρκεια και αποδομούνται γενικά γρήγορα σε μεταβολικά μη τοξικά προϊόντα για ζώα και ανθρώπους (Kamanyire & Karailiedde, 2004).

1.2.3 Καρβαμιδικά

Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα (carbamates) είναι παράγωγα της φυσοστιγμίνης ή εσερίνης που αποτελούν αλκαλοειδή που προερχόμενα από το κύαμο του Calabar (*Physostigma*

venenosum) το οποίο έχει ισχυρή αντιχολινεστερασική δράση. Αποτελούν εστέρες του καρβαμιδικού οξέος και οι κυριότερες ουσίες που ανήκουν σε αυτήν την κατηγορία είναι τα Carbofuran, Pirimicarb, Carbaril και Methomyl. Σε σχέση με τα οργανοφωσφορικά που προαναφέρθηκαν, οι καρβαμιδικές ενώσεις είναι νεότερης γενιάς εντομοκτόνα και παράγωγα του καρβαμιδικού οξέος (NH_2COOH) και έχουν γενικό χημικό τύπο RO-CO-NR_2 όπου R είναι φαινυλική ή ετεροκυκλική ομάδα ή παράγωγο οξίμης. Τα καρβαμιδικά έχουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης με τα οργανοφωσφορικά, αλλά έχουν πιο αποτελεσματική δράση εξαιτίας της διαφορετικής μεταβολικής οδού που ακολουθούν στον οργανισμό των εντόμων. Εμφανίζουν άμεση δράση στο νευρικό σύστημα των εντόμων και εμφανίζουν μεγάλη τοξικότητα σε ψάρια, πτηνά και θηλαστικά. Έτσι, σε περιπτώσεις που τα έντομα παρουσιάζουν αντίσταση στα οργανοφωσφορικά χρησιμοποιούνται τα καρβαμιδικά και το αντίθετο (Firdoz et al., 2010).

1.2.4 Πυρεθρινοειδή

Τα πυρεθρινοειδή χωρίζονται στα φυσικά πυρεθρινοειδή και τις συνθετικές πυρεθρίνες. Είναι τέταρτης γενιάς συνθετικά οργανικά εντομοκτόνα και είναι παράγωγα της φυσικής πυρεθρίνης που προέρχεται από τα άνθη του είδους *Tanacetum cinerariaefolium*. Τα φυσικά πυρεθρινοειδή προέρχονται από τα χρυσάνθεμα (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) και προκαλούν αναισθησία στα έντομα ενώ είναι λιγότερο τοξικά στα θερμόαιμα ζώα. Στον άνθρωπο προκαλούν ερεθισμό στα μάτια και το δέρμα. Όμως είναι αρκετά φωτοευαίσθητες ενώσεις και διασπώνται εύκολα στον αέρα με αποτέλεσμα να παρουσιάζουν μικρή υπολειμματική δράση και αυτό το χαρακτηριστικό κάνει δύσκολη την εφαρμογή τους στη γεωργία. Τα συνθετικά είναι σταθερά στο φως και τον αέρα αλλά έχουν μεγαλύτερη τοξικότητα στα έντομα, μεγαλύτερη υπολειμματική διάρκεια άρα χρειάζονται και λιγότερες εφαρμογές για το επιθυμητό αποτέλεσμα. Τα πυρεθρινοειδή διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: τα πυρεθρινοειδή τύπου I που δεν έχουν κυανομάδα στο μόριό τους, όπως για παράδειγμα τα permethrin, tetramethrin και allethrin και τα πυρεθρινοειδή τύπου II που περιέχουν κυανομάδα, όπως είναι τα fenvalerate, deltamethrin και cypermethrin. Στον άνθρωπο είναι ακίνδυνα γιατί διασπώνται γρήγορα προς μη τοξικά μεταβολικά παράγωγα. Άλλη σημαντική ιδιότητά τους είναι ότι δεν

διαλύονται στο νερό αλλά είναι λιποδιαλυτά, χαρακτηριστικό ομοιάζουν με τους οργανοχλωριωμένους υδρογονάνθρακες, αλλά χωρίς να παρουσιάζουν τη βιοσυσσώρευση των οργανοχλωριωμένων. Αν και έχουν πολλά πλεονεκτήματα, είναι ισχυρά τοξικά σε ψάρια, μέλισσες και άλλα ωφέλιμα έντομα (Tadeo, 2008).

1.2.5 Τριαζίνες

Οι τριαζίνες (triazines) εμφανίστηκαν το '50 περίπου στα ζιζανιοκτόνα στην γεωργία και γενικά χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση πλατύφυλλων και αγρωστωδών φυτών. Όταν οι τριαζίνες εναλλάσσονται με άτομα άνθρακα έχουμε τις συμμετρικές τριαζίνες και όταν δεν εναλλάσσονται έχουμε τις ασύμμετρες τριαζίνες. Στα φυτοφάρμακα αυτής της κατηγορίας ανήκουν τα Afrazine και Simazine, τα οποία είναι ουσιαστικά αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις του αζώτου. Γενικά είναι ασταθείς ενώσεις και αναστέλλουν τη φωτοσύνθεση και παρουσιάζουν εκλεκτικότητα λόγω της ικανότητας των καλλιεργούμενων φυτών να μεταβολίζουν τα εντομοκτόνα είτε λόγω της ύπαρξης της βενζοξαζινόνης (DIMBOA ή MBOA), είτε λόγω των συμπλόκων του ζιζανιοκτόνου με γλουταθείο μαζί με το ένζυμο τρανσφεράση της γλουταθειόνης (GST) (Ohki et al., 1999).

1.3 Προϊόντα μετασχηματισμού των φυτοφαρμάκων και υπολειμματική δράση

Με την απελευθέρωση ενός φυτοφαρμάκου στο περιβάλλον, ακολουθεί μια σειρά από αλληλοεξαρτώμενες διαδικασίες, οι οποίες καθορίζονται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φυτοφαρμάκου καθώς και τις διάφορες περιβαλλοντικές παραμέτρους όπως είναι η θερμοκρασία, η υγρασία, το pH, η ένταση του φωτός κ.α. Μετά την εφαρμογή, τα φυτοφάρμακα μπορούν να αποικοδομηθούν μέσω διαφόρων βιοτικών ή/και αβιοτικών διεργασιών σε ενώσεις που έχουν μικρότερο μοριακό βάρος από την αρχική ένωση, έχουν διαφορετική τοξικότητα και συμπεριφέρονται διαφορετικά στο περιβάλλον. Οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα μπορεί να οφείλονται τόσο σε μεταβολικές αντιδράσεις όσο και σε

χημικές διεργασίες. Στην πρώτη περίπτωση παράγονται οι λεγόμενοι μεταβολίτες, ενώ στη δεύτερη περίπτωση παράγονται αποικοδομήσεις ή μετασχηματισμοί (Μπότη, 2009).

Ο όρος μεταβολίτης χρησιμοποιείται για να περιγράψει ένα αποικοδομημένο παράγωγο της αρχικής χημικής ένωσης, το οποίο σχηματίζεται αμέσως μετά τη χρήση της. Οι μεταβολίτες θεωρούνται περιβαλλοντικά σημαντικοί εάν υπάρχουν επαρκείς ενδείξεις ότι οι άνθρωποι, όταν εκτεθούν στα μέγιστα επίπεδά τους, μπορεί να έχουν δυσμενείς επιπτώσεις στον εαυτό τους ή στις μελλοντικές γενιές ή να θέσουν σε κίνδυνο την επιβίωση ή την ανάπτυξη ειδών του ζωικού βασιλείου. Τα προϊόντα αποικοδόμησης και μετασχηματισμού των φυτοφαρμάκων είναι συνήθως λιγότερο τοξικά από την αρχική ένωση από την οποία προέρχονται, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί να είναι περισσότερο τοξικά. Σε αυτές τις περιπτώσεις, ο κίνδυνος για το περιβάλλον είναι μεγαλύτερος από τον κίνδυνο από την αρχική ένωση. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα προϊόντα αποικοδόμησης των φυτοφαρμάκων έχουν μεγαλύτερη υπολειμματική δραστηριότητα και κινητικότητα σε σύγκριση με την αρχική ένωση και μπορεί τελικά να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον (Νάννου, 2018, Kolpin et al., 2002), καθώς :

- Οι δραστικές ομάδες της μητρικής ένωσης μπορεί να παραμείνουν στο προϊόν μετατροπής και να παρουσιάσουν τους ίδιους τοξικολογικούς μηχανισμούς με τη μητρική ένωση.
- Ο παράγοντας βιοσυσώρευσης του προϊόντος αποικοδόμησης μπορεί να είναι υψηλότερος από εκείνον της μητρικής ένωσης.
- Το προϊόν μετατροπής δύναται να είναι το δραστικό συστατικό ενός προφαρμάκου που έχει σχεδιαστεί έτσι ώστε να επιτρέπει την απορρόφηση της εφαρμοζόμενης ένωσης και τον επακόλουθο μεταβολισμό της σε δραστική ένωση που παράγει το επιθυμητό αποτέλεσμα.
- Η μετατροπή αποδίδει προϊόν με διαφορετικό και ισχυρότερο μηχανισμό δράσης από τη μητρική ένωση (Boxall et al., 2004).

Η υπολειμματική δράση είναι η περίοδος κατά την οποία το φυτοπροστατευτικό προϊόν παραμένει ενεργό στο φυτικό προϊόν και εξαρτάται από την αρχική δόση και το ρυθμό απομάκρυνσης από αυτό. Η διαφορά μεταξύ της υπολειμματικής διάρκειας και της υπολειμματικής δραστηριότητας είναι ότι η τελευταία αναφέρεται στο χρόνο παραμονής

του φυτοπροστατευτικού προϊόντος στο φυτό σε αποτελεσματικές συγκεντρώσεις έναντι του επιβλαβούς οργανισμού-στόχου. Αυτή η υπολειμματική δράση σχετίζεται με διάφορους παράγοντες που επηρεάζουν την υπολειμματική δράση των φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της ευκολίας αποικοδόμησής τους, της μεθόδου εφαρμογής, της χημικής σύνθεσης, του τύπου του σκευάσματος και των εδαφικών και κλιματικών συνθηκών κατά τη συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Η υψηλή υπολειμματική δραστηριότητα σημαίνει ότι οι οργανισμοί-στόχοι μπορούν να αντιμετωπιστούν πιο αποτελεσματικά, αποφεύγοντας έτσι την υπερβολική παρέμβαση. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, η υψηλή υπολειμματική δραστηριότητα ενός φυτοφαρμάκου μπορεί να αποτελεί κίνδυνο για το περιβάλλον και τη δημόσια υγεία (Harris and Gaston, 2004).

1.4 Νομοθετικό πλαίσιο για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ), υπάρχει ένας αριθμός νόμων που ρυθμίζουν την παρουσία υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα, συμπεριλαμβανομένων των φρούτων και των λαχανικών. Ο σημαντικότερος από αυτούς είναι ο κανονισμός ΕΚ/396/2005, ο οποίος τέθηκε σε ισχύ τον Σεπτέμβριο του 2008 και ορίζει πλήρως εναρμονισμένους κανόνες για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε όλες τις χώρες της ΕΕ (Stachniuk, 2016).

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή καθορίζει τα μέγιστα ανεκτά επίπεδα υπολειμμάτων (MRL) φυτοφαρμάκων για να διασφαλίσει ότι τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών. Μέχρι τις 5 Ιανουαρίου 2018, 120 τροποποιήσεις είχαν προστεθεί στον κανονισμό (η πρώτη τροποποίηση έγινε στις 22 Φεβρουαρίου 2006 και η τελευταία τροποποίηση έγινε στις 4 Ιανουαρίου του έτους 2018), ενώ ο κατάλογος των MRL για όλα τα διαφορετικά προϊόντα είναι εύκολα προσβάσιμος στη βάση δεδομένων της ΕΕ για τα φυτοφάρμακα (Stachniuk, 2016, pesticides database).

Τον Φεβρουάριο του 2023, η EFSA δημοσίευσε αναθεωρημένες κατευθυντήριες γραμμές για την εκτίμηση του κινδύνου φυτοφαρμάκων για τα πτηνά και τα θηλαστικά, οι οποίες δημοσιεύθηκαν για πρώτη φορά το 2009. Η καθοδήγηση αυτή περιγράφει ένα κλιμακωτό σύστημα αξιολόγησης κινδύνου που καλύπτει την έκθεση μέσω της διατροφής, την

έκθεση μέσω δευτερογενούς δηλητηρίασης και την έκθεση μέσω κατάποσης μολυσμένου νερού. Σύμφωνα με τις αρχές της υφιστάμενης καθοδήγησης, η μεθοδολογία εκτίμησης κινδύνου αποσαφηνίζεται, επικαιροποιείται και συμπληρώνεται όπου είναι απαραίτητο. Για λόγους εναρμόνισης και διαφάνειας, έχει αναπτυχθεί ένα διαδικτυακό εργαλείο αξιολόγησης για την υποστήριξη της εκτίμησης κινδύνου με την εκτέλεση υπολογισμών (www.efsa.europa.eu, n.d.).

Ένα επίσης πολύ σημαντικό κομμάτι της ευρωπαϊκής νομοθεσίας που περιέχεται στην απόφαση 2002/657/EK της Ευρωπαϊκής Επιτροπής αφορά στην απόδοση των αναλυτικών μεθόδων και τη συμμόρφωση των εργαστηρίων που αναλύουν τρόφιμα με την τεχνική της LC-MS/MS. Η νομοθεσία αυτή περιλαμβάνει λεπτομερείς απαιτήσεις και περιγραφές των μεθόδων για την ανίχνευση και ταυτοποίηση των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα και εγγυάται την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται. Η Διεύθυνση Υγείας και Ασφάλειας Τροφίμων της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (European Commission's Directorate for Health and Food Safety - DG SANTE) παρέχει τα απαραίτητα έγγραφα καθοδήγησης σχετικά με τον αναλυτικό ποιοτικό έλεγχο (SANCO, 2013) που διενεργείται από τα εργαστήρια καθώς και για την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων που αναπτύσσονται από το κάθε εργαστήριο και ορίζει το όριο ποσοτικοποίησης LOQ ως την ελάχιστη συγκέντρωση που πληροί συγκεκριμένα κριτήρια, όπως είναι η μέση ανάκτηση των αναλυτών να βρίσκεται εντός του εύρους 70-120% και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) να είναι μικρότερη του 20% (European Commission, 2015, Mol et al., 2015). Τα κανονιστικά αυτά πλαίσια απαιτούν από κάθε χημικό αναλυτή που ασχολείται με την ανάλυση φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα να γνωρίζει άριστα την ισχύουσα νομοθεσία και να την εφαρμόζει κατά τη διενέργεια αναλύσεων με LC-MS/MS, ειδικά κατά την ανάπτυξη νέων μεθόδων ανίχνευσης (Stachniuk, 2016).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο : ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Η αναλυτική διαδικασία τυπικά περιλαμβάνει πέντε στάδια, δηλαδή δειγματοληψία και ομογενοποίηση, προκατεργασία του δείγματος, σωστό διαχωρισμό των ενώσεων, ανίχνευση και ποσοτικοποίηση τους και ανάλυση των δεδομένων. Όλα αυτά τα βήματα είναι ζωτικής σημασίας για τη διασφάλιση ακριβών αποτελεσμάτων, αλλά η δειγματοληψία και η προκατεργασία των δειγμάτων είναι ιδιαίτερα ζωτικής σημασίας στάδια. Αυτά τα στάδια είναι απαραίτητα για τη λήψη αντιπροσωπευτικού δείγματος και την κατάλληλη προετοιμασία του για ανάλυση (Köck-Schulmeyer et al., 2013).

Η τεχνική που χρησιμοποιείται για την προετοιμασία ενός δείγματος για ανάλυση εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο τύπος και η πολυπλοκότητα του δείγματος, οι ιδιότητές του και η αναμενόμενη συγκέντρωση της προς μελέτη ένωσης. Αυτό το στάδιο είναι συχνά επίπονο και απαιτεί προσεκτική προσοχή. Οι συνήθεις διαδικασίες που εμπλέκονται στην προκατεργασία του δείγματος περιλαμβάνουν την απομόνωση των αναγνωρισμένων ενώσεων μέσω εκχύλισης, την απομάκρυνση τυχόν ακαθαρσιών μέσω καθαρισμού και πιθανή αύξηση της συγκέντρωσης μέσω συμπύκνωσης. Τα στάδια που αναφέρονται παραπάνω είναι αλληλένδετα και πρέπει να ολοκληρωθούν με συγκεκριμένη σειρά. Εάν κάποιο από τα στάδια δεν ολοκληρωθεί με ακρίβεια, τα λάθη θα μεταφερθούν στο επόμενο στάδιο, οδηγώντας σε λανθασμένα αποτελέσματα (Grimalt and Dehouck, 2016).

Τα τελευταία χρόνια, έχει σημειωθεί σημαντική ανάπτυξη στις τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων, λόγω της ανάγκης να δημιουργηθούν ταχύτερες, πιο αποτελεσματικές και οικονομικά αποδοτικές μέθοδοι που παράγουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Έχουν προκύψει σύγχρονες τεχνικές, που σε πολλές περιπτώσεις αντικαθιστούν τις παραδοσιακές μεθόδους εκχύλισης. Οι σημαντικότερες από τις τεχνικές εκχύλισης αφορούν τις εξής: Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction -SPE), Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction-SPME), Διασπορά στερεάς φάσης υποστρώματος (Matrix Solid phase dispersion –

MSPD), Κατανεμημένη Εκχύλιση στερεάς φάσης (dSPE), Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (Liquid-Liquid Extraction - LLE), QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe), Εκχύλιση με Υπερήχους (USE), Επιταχυνόμενη Εκχύλιση Διαλυτών (ASE), και Εκχύλιση με Υποβοήθηση Μικροκυμάτων (MAE). Ο στόχος αυτών των τεχνικών είναι να βελτιώσουν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά όπως η ευαισθησία, η ακρίβεια, η αναπαραγωγιμότητα και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, ενώ παράλληλα είναι φιλικές προς το περιβάλλον και οικονομικές (Μπότη, 2009).

Για την προκατεργασία των φρούτων που αναλύονται για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων χρησιμοποιούνται εκτενέστερα οι τεχνικές της εκχύλισης υγρού – υγρού (LLE), η διασπορά στερεάς φάσης υποστρώματος (MSPD) και η μέθοδος QuEChERS, ενώ πολύ συχνά ακολουθεί ο καθαρισμός του εκχυλίσματος με την τεχνική dSPE (Stachniuk, 2016).

2.2 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE)

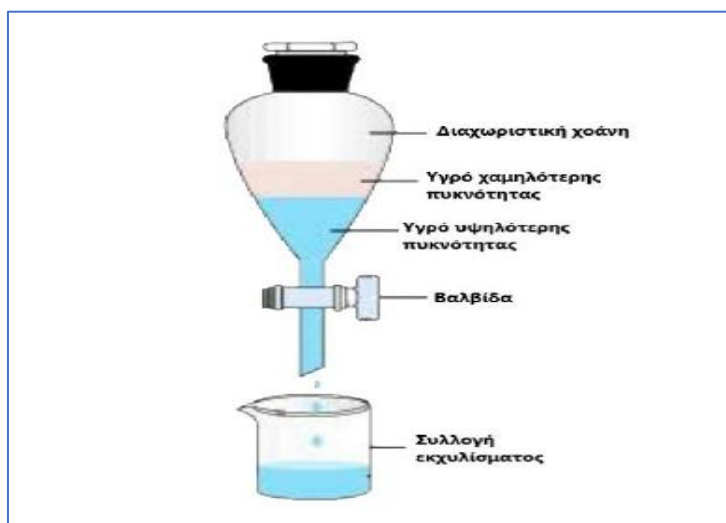
Η εκχύλιση υγρού-υγρού έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην προετοιμασία δειγμάτων για μια σημαντική περίοδο. Αυτή η τεχνική μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως η μοναδική μέθοδος εκχύλισης ή μπορεί να επιτευχθεί με ακολουθούμενα στάδια καθαρισμού με τεχνικές όπως η SPE και η dSPE. Η αποτελεσματικότητα της ανάκτησης των αναλυτών από το δείγμα εξαρτάται από την κατανομή ισορροπίας δύο φάσεων, του δότη και του δέκτη, η οποία διευκολύνεται μέσω της συμβατότητας μεταξύ της πολικότητας των διαλυτών και των αναλυτών σύμφωνα με την αρχή της ομοιότητας. Οι πολικές οργανικές ουσίες και τα ανόργανα άλατα κατανέμονται στην υδατική φάση, ενώ οι μη πολικές οργανικές ουσίες κατανέμονται στην οργανική φάση. Η επιτυχία της μεθόδου εκχύλισης υγρού-υγρού βασίζεται σε μερικά θεμελιώδη χαρακτηριστικά που πρέπει να διαθέτει ο διαλύτης (Hakme et al., 2018). Αρχικά, ο οργανικός διαλύτης δεν πρέπει να αναμιγνύεται με την υδατική φάση και δεν πρέπει να δημιουργεί σταθερά γαλακτώματα με αυτόν. Επιπλέον, ο διαλύτης πρέπει να έχει πυκνότητα που να διαφέρει από την υδατική φάση, επιτρέποντάς του να διαχωρίζεται

εύκολα από το νερό. Για τονεντοπισμό των καλύτερων διαλυτών για αυτή τη διαδικασία, πιο κάτω παρουσιάζεται η συμβατότητα συγκεκριμένων διαλυτών στην εκχύλιση υγρού-υγρού (Zhang, 2012).

- Το ακετονιτρίλιο, γνωστό και ως MeCN, έχει τη μοναδική ιδιότητα να μπορεί να αναμιγνύεται με νερό, αλλά μπορεί επίσης να διαχωριστεί εύκολα από την υδατική φάση. Αυτό το καθιστά έναν εξαιρετικά αποτελεσματικό διαλύτη για την εξαγωγή υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, τόσο αυτών που είναι πολικής όσο και μη πολικής φύσης.
- Ο οξικός αιθυλεστέρας, κοινώς γνωστός ως EtAc, είναι ένας διαλύτης με μέτρια πολικότητα. Βρίσκει τη χρησιμότητά του σε διαδικασίες εκχύλισης υγρού-υγρού όπου χρησιμοποιείται για τη μείωση της πολικότητας των πολικών διαλυτών ή για την ενίσχυση της πολικότητας των μη πολικών διαλυτών.
- Το χλωροφόρμιο, το οποίο έχει τον χημικό τύπο CHCl_3 , είναι ένας διαλύτης που έχει μέτριο επίπεδο πολικότητας. Χρησιμοποιείται συνήθως στη διαδικασία διαχωρισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων μέσω εκχύλισης υγρού-υγρού.
- Η ακετόνη (CH_3COCH_3), η οποία είναι ένας διαλύτης με μέτρια πολικότητα, δεν είναι βιώσιμη επιλογή για εκχύλιση υγρού-υγρού λόγω των προκλήσεων που σχετίζονται με τον διαχωρισμό της από την υδατική φάση.
- Ο διαιθυλαιθέρας, επίσης γνωστός ως EtOEt, δεν χρησιμοποιείται συνήθως στη διαδικασία εκχύλισης υγρού-υγρού με σκοπό την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι έχει χαμηλό σημείο ανάφλεξης και μπορεί εύκολα να σχηματίσει επικίνδυνα υπεροξείδια που έχουν τη δυνατότητα να εκραγούν.

Η διαδικασία εκχύλισης υγρού-υγρού περιλαμβάνει την επανειλημμένη εκχύλιση ενός αναμεμειγμένου δείγματος με οργανικό διαλύτη που δεν αναμιγνύεται με νερό και στη συνέχεια διαχωρισμό του μείγματος μέσω φυγοκέντρωσης, συμπύκνωσης και/ή καθαρισμού πριν από την ανάλυση του για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων. Αυτή η μέθοδος είναι πλεονεκτική λόγω της απλότητάς της, της ικανότητας εξαγωγής διαφορετικών τύπων φυτοφαρμάκων και της αποτελεσματικότητάς της. Ωστόσο, έχει επίσης μειονεκτήματα όπως η απαίτηση σημαντικού χρόνου και προσπάθειας, η

χρήση μεγάλης ποσότητας διαλυτών και η παραγωγή εναιωρημάτων. Στην εκχύλιση υγρού-υγρού, δεν είναι δυνατή η χρήση πολικών διαλυτών που διαλύονται στο νερό. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αυτοί οι διαλύτες μπορεί να είναι επιβλαβείς τόσο για τον άνθρωπο όσο και για το περιβάλλον και είναι συχνά δαπανηρή η απόκτησή τους. Επιπλέον, η παρουσία παρεμβαλλόμενων ουσιών στη μήτρα του δείγματος μπορεί να οδηγήσει στη συνεκχύλιση ανεπιθύμητων ενώσεων μαζί με την επιθυμητή αναλυόμενη ουσία. Τέλος, οι πολικές και ιοντικές ενώσεις μπορεί να είναι ιδιαίτερα δύσκολο να διαχωριστούν από την υδατική φάση χρησιμοποιώντας αυτή την τεχνική. Υπό το φως των προαναφερθέντων μειονεκτημάτων, δημιουργήθηκε ως λύση η τεχνική Micro-Liquid-Liquid Extraction (MLLE). Αυτή η μέθοδος επιτρέπει την άμεση ανάλυση στο χρωματογράφο και απαιτεί σημαντικά λιγότερη ποσότητα οργανικού διαλύτη (στην περιοχή των μL ή mL) και δείγματος (μεταξύ 1,5-10 mL) (Hakme, 2018).

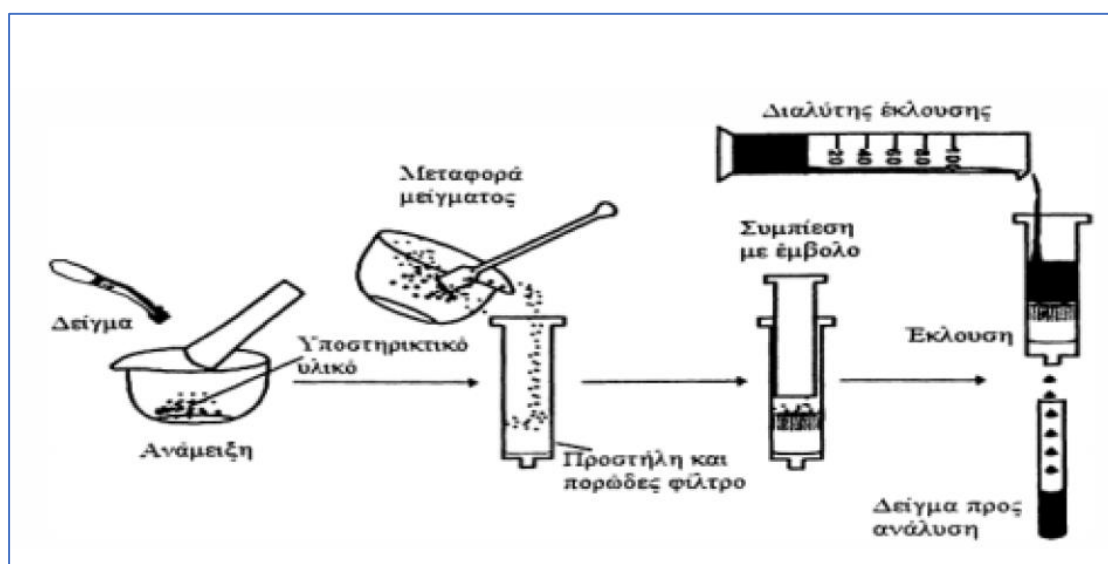


Εικόνα 2.1 Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης υγρού – υγρού (Λαίμου-Γεράνιου, 2019)

2.3 Διασπορά Στερεάς Φάσης Υποστρώματος (MSPD)

Η MSPD αποτελεί μία τεχνική εκχύλισης, η οποία εφαρμόζεται για την προκατεργασία δειγμάτων σε στερεή, ημιστερεή ή υγρή μορφή που έχουν υψηλό

ιξώδες και επιτυγχάνει την εκλεκτική απομόνωση των ενώσεων – στόχων. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, οι ουσίες που πρόκειται να αναλυθούν αναμιγνύονται με το κατάλληλο προσροφητικό υλικό, όπως είναι για παράδειγμα το αμινοπροπύλιο (NH₂), το δεκαοκτύλιο (C18), το οκτύλιο (C8) και το διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂) και στη συνέχεια το μείγμα ομογενοποιείται, ούτως ώστε οι επιθυμητές ουσίες να απορροφηθούν από το προσροφητικό υλικό και να απομακρυνθούν. Εν συνεχεία, το ομογενοποιημένο μείγμα μεταφέρεται σε μια μικροστήλη και οι ενώσεις – στόχοι εκλύονται με τη χρήση ενός κατάλληλου διαλύτη. Το εκχύλισμα μπορεί να αναλυθεί απευθείας ή να υποβληθεί σε περαιτέρω καθαρισμό πριν την ανάλυση, εάν αυτό κριθεί απαραίτητο (Νάννου, 2018).



Εικόνα 2.2 Απεικόνιση της εκχύλισης MSPD (Βοτάνη, 2019)

2.4 QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

Η μέθοδος QuEChERS έχει κερδίσει σημαντική αναγνώριση τα τελευταία χρόνια για την ευελιξία και την εφαρμογή της σε διάφορους τομείς. Εισήχθη το 2003 από τους Anastassiades et al. (2003) ως τεχνική για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά χρησιμοποιώντας αέρια χρωματογραφία σε

συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Το ακρωνύμιο QuEChERS σημαίνει Γρήγορο, Εύκολο, Φτηνό, Αποτελεσματικό, Ανθεκτικό και Ασφαλές, που υποδηλώνει τα χαρακτηριστικά του να είναι γρήγορο, απλό, προσιτό, αποτελεσματικό, ανθεκτικό και ασφαλές. Με τα χρόνια, η μέθοδος έχει υποστεί αρκετές τροποποιήσεις και βελτιστοποιήσεις, επεκτείνοντας το πεδίο εφαρμογής της για να συμπεριλάβει την ανίχνευση υπολειμματικών ενώσεων σε διαφορετικά υποστρώματα όπως χόμα, ίζημα, λάσπη, ζωικούς ιστούς και αίμα. Πρόσφατα, η μέθοδος QuEChERS έχει γίνει όλο και πιο δημοφιλής στην εξαγωγή φυτοπροστατευτικών ενώσεων από δείγματα φρούτων και λαχανικών (Collimore and Bent, 2020).

Η πειραματική τεχνική QuEChERS περιλαμβάνει δύο βασικά στάδια που είναι σχετικά απλά. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την εκχύλιση των επιθυμητών ενώσεων από το δείγμα και τον διαχωρισμό τους χρησιμοποιώντας έναν συνδυασμό οργανικού διαλύτη και αλάτων. Το δεύτερο στάδιο περιλαμβάνει τον καθαρισμό του εκχυλίσματος. Η διαδικασία ξεκινά με την ομογενοποίηση των δειγμάτων και τη ζύγιση μιας συγκεκριμένης ποσότητας, η οποία στη συνέχεια τοποθετείται σε πλαστικούς σωλήνες φυγοκέντρησης. Μπορεί να προστεθεί νερό εάν είναι απαραίτητο, ακολουθούμενο από την προσθήκη ενός οργανικού διαλύτη όπως το ακετονιτρίλιο. Αυτός ο διαλύτης προστίθεται για την εκχύλιση των στοχευόμενων ενώσεων από το δείγμα. Τέλος, ένα μίγμα αλατιού προστίθεται στο δείγμα, το οποίο ανακινείται έντονα και φυγοκεντρείται. Το μίγμα αλάτων τυπικά αποτελείται από άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) και είτε χλωριούχο νάτριο (NaCl), είτε οξικό νάτριο (NaOAc) ή και τα δύο, μαζί με ένα ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών αλάτων. Το δεύτερο βήμα περιλαμβάνει τη συλλογή ενός τμήματος της υπερκείμενης φάσης, το οποίο στη συνέχεια υποβάλλεται σε καθαρισμό χρησιμοποιώντας μια τεχνική που ονομάζεται εκχύλιση στερεάς φάσης διασποράς (dSPE). Αυτή η διαδικασία περιλαμβάνει τη χρήση ορισμένων ουσιών όπως το θειικό μαγνήσιο καθώς και προσροφητικές ουσίες όπως η πρωτοταγής-δευτερογενής αμίνη (PSA), το πυρίτιο C18 ή η γραφίτοποιημένη αιθάλη (GCB). Εάν απαιτείται, η εξισορρόπηση του pH μπορεί να επιτευχθεί με την προσθήκη μικρής ποσότητας αμμωνίας ή μυρμηκικού οξέος. Το δείγμα στη συνέχεια ανακινείται και φυγοκεντρείται προτού να είναι έτοιμο για έγχυση σε αέριο ή υγρό χρωματογράφο, σε συνδυασμό με φασματομέτρο μάζας.

Εάν χρειάζεται, το τελικό εκχύλισμα μπορεί να συμπυκνωθεί και να διαλυθεί στον επιθυμητό διαλύτη πριν από τη διεξαγωγή της τελικής ανάλυσης του δείγματος (Kim et al., 2019, Νάννου, 2018).

Ο οργανικός διαλύτης εκχύλισης είναι ένα κρίσιμο συστατικό στη μέθοδο QuEChERS, καθώς έχει σημαντικό αντίκτυπο στην ποιότητα των αναλυτών που λαμβάνονται. Ο τύπος του διαλύτη που χρησιμοποιείται καθορίζει το ποσοστό των αναλυτών που θα ανακτηθούν και τα συνολικά χαρακτηριστικά της μεθόδου. Τυπικά, το ακετονιτρίλιο είναι ο προτιμώμενος διαλύτης καθώς μπορεί εύκολα να διαχωριστεί από την υδατική φάση χρησιμοποιώντας ένα μίγμα αλάτων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα υψηλές ανακτήσεις, ακόμη και για πολικές ενώσεις. Επιπλέον, το ακετονιτρίλιο παράγει σχετικά καθαρά εκχυλίσματα με λίγες ενώσεις που θα μπορούσαν ενδεχομένως να αναστείλουν την ανάλυση. Αν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ακετόνη και οξικός αιθυλεστέρας, γενικά αποφεύγονται. Η ακετόνη είναι πολύ αναμίξιμη με το νερό και ο οξικός αιθυλεστέρας, αν και λιγότερο διαλυτός στο νερό, δεν εκχυλίζει ποσοτικά τα πολικά φυτοφάρμακα (Santana-Mayor et al., 2019).

Για τη βελτίωση του διαχωρισμού φάσεων και την επίτευξη υψηλών ανακτήσεων και εκλεκτικότητας για μια ποικιλία αναλυτών, προστίθενται άλατα κατά τη διαδικασία εκχύλισης. Το θεικό μαγνήσιο χρησιμοποιείται για τη μείωση του όγκου της υδατικής φάσης, η οποία προάγει τη μεταφορά πολικών ενώσεων στην οργανική φάση. Το χλωριούχο νάτριο είναι ένα άλλο άλας που μπορεί να ενισχύσει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης επιτρέποντας τον έλεγχο της πολικότητας της μεθόδου μέσω προσαρμογών στην ποσότητά της (Santana-Mayor et al., 2019).

Στη μέθοδο QuEChERS, είναι σημαντικό να διασφαλιστεί ο σωστός καθαρισμός του δείγματος, καθώς ορισμένα υποστρώματα μπορεί να περιέχουν μια ποικιλία άλλων ενώσεων που θα μπορούσαν να εμποδίσουν την ακριβή ανάλυση. Για να επιτευχθεί αυτό, πραγματοποιείται μια δεύτερη διαδικασία εξαγωγής κατά το στάδιο καθαρισμού. Αυτό το βήμα όχι μόνο εξαλείφει την περίσσεια νερού αλλά στοχεύει επίσης στην εξάλειψη τυχόν εμποδίων που υπάρχουν στο υπόστρωμα. Η επιλογή των προσροφητικών υλικών που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας ποικίλλει ανάλογα με το υπόστρωμα που αναλύεται και τις παρεμβαλλόμενες ενώσεις που υπάρχουν. Τα συνήθως χρησιμοποιούμενα

προσροφητικά περιλαμβάνουν μείγματα διαφορετικών υλικών (Kostelac και Anastassiades, 2007, Musarurwa et al., 2019) :

- **MgSO₄**: το θεικό μαγνήσιο απομακρύνει τυχόν επιπλέον υγρασία.
- **PSA**: η πρωτοταγής–δευτεροταγής αμίνη, ως ασθενής ιονανταλλάκτης, ελαττώνει ή πλήρως απομακρύνει παρεμποδίσσεις, όπως σάκχαρα, πολικά οργανικά οξέα και λιπαρά οξέα.
- **C18 (octadecyl silica)**: η πυριτία C18 απομακρύνει τις μη πολικές ενώσεις και τα λιπίδια.
- **GCB**: ο γραφίτοποιημένος άνθρακας απομακρύνει χρωστικές ουσίες, όπως χλωροφύλλη και καροτενοειδή.

Η QuEChERS μπορεί να τροποποιηθεί και να προσαρμοστεί ανάλογα με τις ανάγκες της κάθε ανάλυσης. Υπάρχουν τρεις βασικές «προσεγγίσεις–παραλλαγές» της μεθόδου και συγκεκριμένα (Musarurwa et al., 2019):

➤ **Η «αυθεντική» μέθοδος (‘Original’ QuEChERS)**

Το ακετονιτρίλιο είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος διαλύτης για σκοπούς εκχύλισης. Η σύνθεση QuEChERS, η οποία αναπτύχθηκε αρχικά, περιλαμβάνει την προσθήκη χλωριούχου νατρίου (NaCl) για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης και την ελαχιστοποίηση των παρεμβολών που προκαλούνται από πολικές ενώσεις.

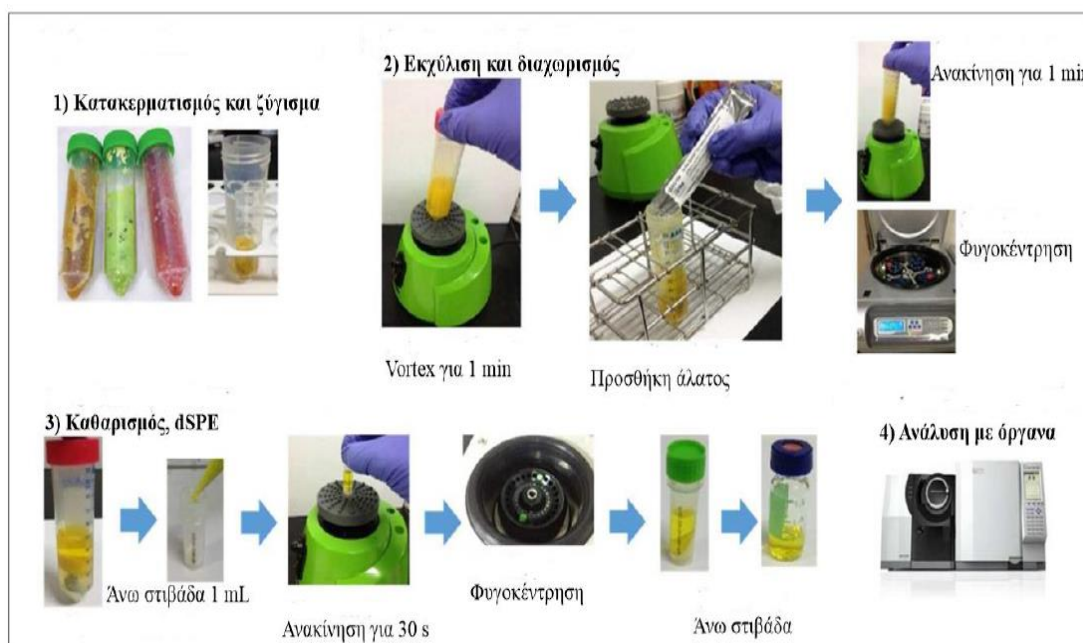
➤ **Η μέθοδος AOAC 2007.01 (AOAC Official Method 2007.01)**

Το ακετονιτρίλιο χρησιμοποιείται ως διαλύτης εκχύλισης, επαυξημένο με οξικό οξύ 1%. Επιπλέον, το άνυδρο οξικό νάτριο (CH₃COONa) λειτουργεί ως ρυθμιστής του pH για την πρόληψη της αποσύνθεσης ουσιών που είναι ευάλωτες σε ένα αλκαλικό περιβάλλον. Επιπλέον, διευκολύνει την ανάκτηση ουσιών που είναι ευαίσθητες σε δραστικές αλλαγές στο pH.

➤ **Η μέθοδος EN 15662 (European Standard Method EN 15662)**

Το ακετονιτρίλιο χρησιμοποιείται ως διαλύτης για τη διαδικασία εκχύλισης, παράλληλα με την προσθήκη NaCl για την εξάλειψη τυχόν πολικών εμποδίων. Επιπλέον, ρυθμιστικά διαλύματα κιτρικού οξέος χρησιμοποιούνται για τη διαφύλαξη ενώσεων που είναι ευαίσθητες σε αλκαλικά επίπεδα pH.

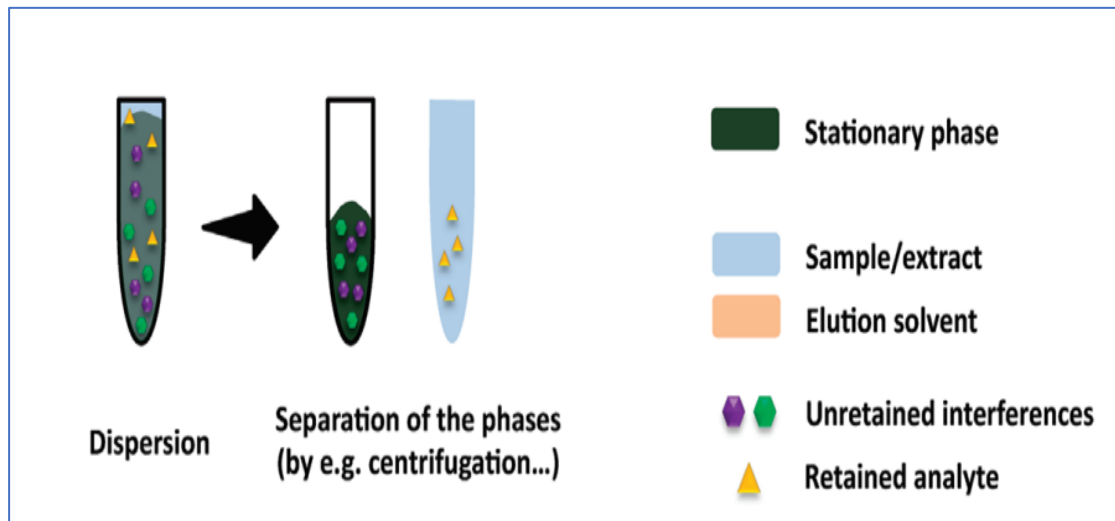
Η QuEChERS είναι μια προτιμώμενη μέθοδος για την προετοιμασία δειγμάτων φρούτων για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε αυτά. Ανάμεσα στα πλεονεκτήματά της είναι η χρήση ελάχιστης ποσότητας οργανικών διαλυτών, η οποία είναι ευεργετική για τη μείωση του κόστους και τον περιορισμό της έκθεσης των χειριστών σε επιβλαβείς χημικές ουσίες. Επιπλέον, η τεχνική QuEChERS απαιτεί ελάχιστο εργαστηριακό εξοπλισμό και αναλώσιμα, καθιστώντας τη μια οικονομικά αποδοτική και αποδοτική προσέγγιση. Ένα άλλο πλεονέκτημα είναι η απλότητά της, η οποία δεν απαιτεί εκτενή εκπαίδευση ή τεχνικές δεξιότητες από τους αναλυτές. Η QuEChERS είναι κατάλληλη τόσο για αέρια όσο και για υγρή χρωματογραφία και αποδίδει υψηλές ανακτήσεις άνω του 85%. Αυτή η μέθοδος είναι επίσης φιλική προς το περιβάλλον, παράγοντας μόνο μια μικρή ποσότητα απορριμμάτων. Συνολικά, η QuEChERS είναι μια εξαιρετικά ωφέλιμη τεχνική για την προετοιμασία δειγμάτων φρούτων (Lawal et al., 2018).



Εικόνα 2.3 Απεικόνιση της μεθόδου QuEChERS (Kim et al., 2019)

2.5 Καθαρισμός με την τεχνική dSPE

Η Κατανεμημένη Εκχύλιση Στερεάς Φάσης (dSPE) είναι μια μέθοδος που χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό ενός δείγματος αφού έχει πραγματοποιηθεί η διαδικασία εκχύλισης, ανεξάρτητα από το αν εκχυλίστηκε μέσω εκχύλισης υγρού-υγρού, στερεού-υγρού ή στερεάς φάσης. Η σύνθεση και η ποσότητα των ουσιών στους σωλήνες φυγοκέντρησης dSPE ποικίλλει ανάλογα με τον αναλυτή στόχο. Τα κύρια συστατικά που χρησιμοποιούνται στους σωλήνες φυγοκέντρησης dSPE είναι θειικό μαγνήσιο και πρωτοταγείς-δευτεροταγείς αμίνες (PSA), οι οποίες συνεργάζονται για να αφαιρέσουν το νερό, τα σάκχαρα και τα λιπαρά οξέα από τον οργανικό διαλύτη. Αυτοί οι σωλήνες διατίθενται με ή χωρίς ενεργό άνθρακα για την αφαίρεση χρωστικών και με ή χωρίς C18 για την αφαίρεση μη πολικών συστατικών. Η διαδικασία dSPE περιλαμβάνει τη μεταφορά του εκχυλίσματος στο σωλήνα φυγοκέντρησης και την έντονη ανάδευση για 30 δευτερόλεπτα έως 2 λεπτά πριν από τη φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 λεπτά. Το προκύπτον υπερκείμενο μπορεί στη συνέχεια να αναλυθεί περαιτέρω (Socas-Rodríguez et al., 2015).



Εικόνα 2.4 Απεικόνιση της μεθόδου dSPE (Socas-Rodríguez et al., 2015)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο : Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ -ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

3.1 Εισαγωγή

Ο ακριβής προσδιορισμός των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα αποτελεί πρόκληση, λόγω της πολυπλοκότητας της μήτρας, και για το λόγο αυτό απαιτείται η επιλογή των καταλληλότερων μεθόδων διαχωρισμού και ανίχνευσης. Στη βιβλιογραφία, η πλειονότητα των πολύ-υπολειμματικών αναλύσεων σε φρούτα πραγματοποιείται με τη χρήση χρωματογραφικών μεθόδων ανάλυσης, υγρή και αέρια χρωματογραφία, σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας σε σειρά (tandem mass spectrometry), καθώς οι τεχνικές αυτές παρουσιάζουν εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα με αποτέλεσμα τη σαφή ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση ενός μεγάλου φάσματος φυτοφαρμάκων (καθώς και των μεταβολιτών τους) στα φρούτα (Fenik et al., 2011, Romniou et al., 2022).

Πιο συγκεκριμένα, η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας σε σειρά (LC-MS/MS), με την οποία ασχολείται η παρούσα εργασία, αποτελεί μία πανίσχυρη τεχνική για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα, καθώς και τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό τους ώστε να είναι δυνατή η επιβεβαίωση πως βρίσκονται σε επίπεδα χαμηλότερα των MRL που τίθενται από τη νομοθεσία και άρα είναι ασφαλή προς κατανάλωση (Malik et al., 2010). Στα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της σύζευξης της LC με την MS/MS ανήκουν η εξαιρετικά υψηλή ευαισθησία του αναλυτικού συστήματος, η δυνατότητα ακριβούς ταυτοποίησης σχεδόν όλων των συστατικών του δείγματος, η μεγάλη επαναληψιμότητα των μετρήσεων, η δυνατότητα ποσοτικού προσδιορισμού των ουσιών που περιέχονται στο δείγμα καθώς επίσης και η δυνατότητα διάκρισης ουσιών που έχουν ταυτόσημη μοριακή μάζα αλλά διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης, δηλαδή των ισομερών. Επιπρόσθετα, με την τεχνική αυτή, δύναται να πραγματοποιηθεί ο ποσοτικός προσδιορισμός των ουσιών ακόμα και στην περίπτωση που δεν είναι πλήρως διαχωρισμένες χρωματογραφικά (Stachniuk, 2016).

3.2 Υγρή Χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία, επίσης γνωστή ως LC, είναι μια ιδιαίτερα χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού που εφαρμόζεται σε παγκόσμια κλίμακα. Ως μέλος της οικογένειας των χρωματογραφικών τεχνικών, η LC βασίζεται στην αλληλεπίδραση μεταξύ μιας κινητής και σταθερής φάσης για να διαχωρίσει τις ενώσεις. Αυτή η δυναμική μέθοδος προσφέρει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές δυνατότητες προσδιορισμού, παρέχοντας ένα ευρύ φάσμα δυνατοτήτων για ακριβή ανάλυση σε διάφορες κλίμακες. Η ευελιξία της έχει οδηγήσει σε επιτυχημένες εφαρμογές στην ανάλυση μιας τεράστιας σειράς χημικών ενώσεων, παράγοντας αξιόπιστα αποτελέσματα. Η εκτεταμένη χρήση της υγρής χρωματογραφίας αποδίδεται στην εξαιρετική ακρίβεια και ευαισθησία της, καθώς και στην αποτελεσματικότητά της στο διαχωρισμό μη πτητικών ή ευαίσθητων στη θερμότητα στοιχείων. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ευρέως στην αναγνώριση επιστημονικά σημαντικών ενώσεων, συμπεριλαμβανομένων, μεταξύ άλλων, αμινοξέων, πρωτεϊνών, στεροειδών, αντιβιοτικών, φυτοφαρμάκων, υδρογονανθράκων, προϊόντων προσωπικής φροντίδας, οργανομεταλλικών ενώσεων και διαφόρων ανόργανων ουσιών (Zhu et al., 2005).

Στη χρωματογραφία, η κινητή φάση είναι υγρό και η στατική φάση είναι είτε στερεό είτε υγρό που στερεώνεται σε μια αδρανή επιφάνεια. Καθώς οι ενώσεις υφίστανται διαχωρισμό, κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης ενώ ταυτόχρονα μεταφέρονται προς το τέλος της στήλης από τη ροή του διαλύτη. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί μια κινητή ζώνη που αναγνωρίζεται ως κορυφή στο προκύπτον χρωματογράφημα. Υπό ιδανικές συνθήκες, ο ανιχνευτής είναι σε θέση να ανιχνεύσει και να καταγράψει τις διάφορες ζώνες εξαρτημάτων ως καμπύλες Gauss στο σύστημα εγγραφής. Η διαδικασία ποσοτικοποίησης βασίζεται στη μέτρηση του ύψους ή της επιφάνειας των κορυφών, η οποία είναι ευθέως ανάλογη με την ποσότητα ή τη συγκέντρωση της συγκεκριμένης ένωσης που αναλύεται. Η διαδικασία διαχωρισμού ουσιών σε ένα μείγμα βασίζεται στις μοναδικές αλληλεπιδράσεις τους με την κινητή και τη στατική φάση. Κάθε συστατικό θα έχει έναν ξεχωριστό χρόνο έκλουσης λόγω

αυτών των αλληλεπιδράσεων, οι οποίες επηρεάζονται από παράγοντες όπως το σχήμα των σωματιδίων, το μέγεθος και η πυκνότητα φορτίου. Μέσω της υγρής χρωματογραφίας, είναι δυνατός ο χειρισμός αυτών των αλληλεπιδράσεων επιλέγοντας τον κατάλληλο συνδυασμό στατικών και κινητών φάσεων για έναν δεδομένο διαχωρισμό. Αυτό επιτρέπει τη χρήση μιας ποικιλίας μηχανισμών διαχωρισμού (Skoog, 2010).

Στη σύγχρονη εποχή, η υγρή χρωματογραφία διαχωρισμού είναι ο πιο συχνά χρησιμοποιούμενος και διαδεδομένος τύπος χρωματογραφίας. Αυτή η μέθοδος ταξινομείται σε δύο υποκατηγορίες, οι οποίες διακρίνονται με βάση τη σχετική πολικότητα της στατικής και της κινητής φάσης (Παπαδογιάννης και Σαμανίδου, 2001):

(α) Υγρή χρωματογραφία κανονικής φάσης: Είναι μια τεχνική στην οποία η στατική φάση αποτελείται από ισχυρά πολικά υλικά όπως SiO_2 ή Al_2O_3 και η κινητή φάση περιλαμβάνει μη πολικούς διαλύτες όπως χλωροφόρμιο ή εξάνιο.

(β) Υγρή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης: είναι μια τεχνική που περιλαμβάνει τη χρήση μιας μη πολικής στατικής φάσης και μιας σχετικά πολικής κινητής φάσης. Όταν πρόκειται για την αντίστροφη φάση, η στατική φάση αποτελείται από SiO_2 που είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση. Συνδυάζεται με διαφορετικές ομάδες, γνωστές ως δεσμευμένη φάση (bonded phase), η οποία περιλαμβάνει αλκύλια, φαινύλια, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες και άλλα. Από την άλλη πλευρά, η κινητή φάση περιλαμβάνει γενικά πολικούς διαλύτες, όπως ένα μείγμα νερού ή υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων, αναμεμειγμένο με διάφορους οργανικούς διαλύτες που είναι συμβατοί με το νερό, όπως το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη.

3.2.1 Αναλυτικές στήλες

Το πιο κρίσιμο στοιχείο ενός χρωματογραφικού συστήματος είναι η αναλυτική στήλη, η οποία πρέπει να είναι ανώτερης ποιότητας για να παρέχει ακριβή και συνεπή αποτελέσματα. Η χρωματογραφική στήλη αποτελείται από δύο μέρη - τον εξωτερικό κύλινδρο και το υλικό συσκευασίας. Ο εξωτερικός κύλινδρος μπορεί να

κατασκευαστεί από διαφορετικά υλικά όπως μέταλλο, ανοξείδωτο χάλυβα, γυαλί ή πολυμερές. Η στατική φάση ή το υλικό συσκευασίας που υπάρχει μέσα στον κύλινδρο επιλέγεται με βάση τους τύπους των ενώσεων που πρέπει να διαχωριστούν. Η διαδικασία επιλογής του σωστού υλικού πλήρωσης είναι ζωτικής σημασίας για την ενίσχυση της αναλυτικής διαδικασίας. Η ποικιλία των πληρωτικών που διατίθενται αυτή τη στιγμή στην αγορά προσφέρει ξεχωριστή απόδοση διαχωρισμού με βάση τις μοναδικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες. Το silica gel χρησιμοποιείται συνήθως ως βάση για τα περισσότερα υλικά πλήρωσης λόγω της οικονομικής του τιμής και της μακράς διάρκειας φύσης του (Skoog, 2010).

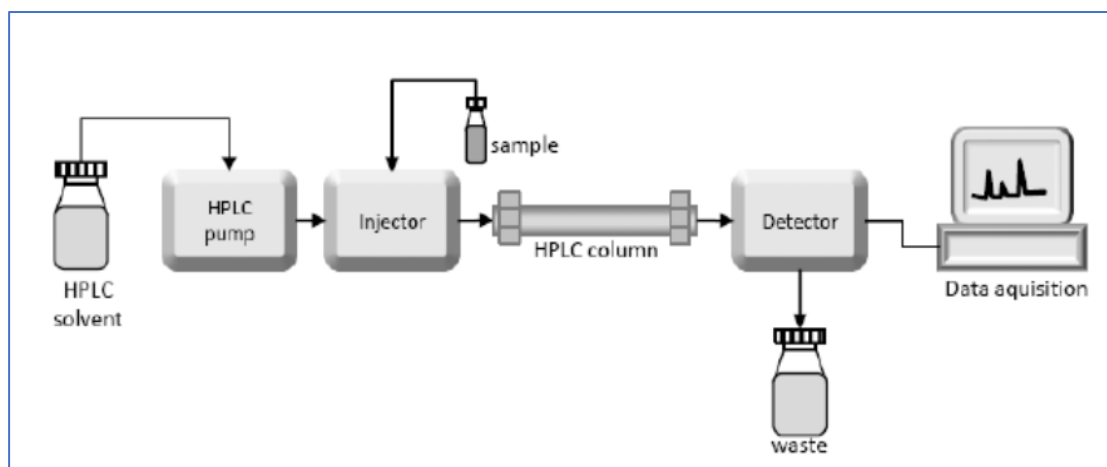
Η επιλογή της σωστής αναλυτικής στήλης είναι ζωτικής σημασίας και εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η γεωμετρία της στήλης, το μέγεθος των μορίων που αναλύονται, η διάμετρος των πόρων μέσα στο υλικό πλήρωσης της στήλης, ο τύπος του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος (το οποίο θα πρέπει να είναι χημικά αδρανές), τη φύση της ομάδας που συνδέεται με το υπόστρωμα (η οποία καθορίζει την εκλεκτικότητα της στατικής φάσης) και την ποσότητα των ελεύθερων υδροξυλίων σιλανόλης που υπάρχουν στη στήλη (όσο υψηλότερο είναι το ποσοστό των ελεύθερων υδροξυλίων τόσο πιο πολική είναι η στήλη, οδηγώντας σε ασθενέστερη κατακράτηση των μη πολικών ενώσεων). Όσον αφορά στις αναλυτικές στήλες, μπορούν να ταξινομηθούν με βάση τη διάμετρό τους, η οποία μπορεί να είναι είτε συμβατική είτε τριχοειδής, ενώ ο κάθε τύπος στήλης έχει τα δικά του μοναδικά χαρακτηριστικά και εφαρμογές (Zuvela et al., 2019).

3.2.2 Ανιχνευτές

Η λειτουργία του ανιχνευτή σε μια διάταξη υγρής χρωματογραφίας είναι να παρατηρεί συνεχώς το υγρό καθώς ρέει έξω από τη στήλη. Διάφοροι τύποι ανιχνευτών χρησιμοποιούνται στην Υγρή Χρωματογραφία, συμπεριλαμβανομένων ανιχνευτών ορατού/υπεριώδους (UV), ανιχνευτών συστοιχίας φωτοδιόδου, ανιχνευτών αγωγιμότητας, ανιχνευτών δείκτη διάθλασης, φασματογράφους μάζας, ηλεκτροχημικούς ανιχνευτές και φθορισμομετρικούς ανιχνευτές (Skoog, 2010).

3.2.3 HPLC και UHPLC

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) είναι μια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό υγρών δειγμάτων σε στήλη υπό υψηλή πίεση. Θεωρείται ανώτερη από την παραδοσιακή Υγρή Χρωματογραφία (LC) λόγω της εξαιρετικής διακριτικής της ικανότητας. Η κύρια διαφορά μεταξύ αυτών των δύο τεχνικών είναι ότι η HPLC χρησιμοποιεί πολύ μικροσκοπικά σφαιρίδια πλήρωσης στη χρωματογραφική στήλη που πακτώνονται το ένα δίπλα στο άλλο, αφήνοντας ελάχιστο χώρο για τη διέλευση της υγρής φάσης και των συστατικών του δείγματος. Αυτό γίνεται γιατί με τη χρωματογραφική στήλη με σφαιρίδια πληρωτικού υλικού μικρής διαμέτρου, επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός των συστατικών αφού αυξάνονται οι θεωρητικές πλάκες της στήλης (Giles, 2022).



Εικόνα 3.1 Σχηματική απεικόνιση της HPLC (Czaplicki, 2013)

Τον τελευταίο καιρό, η επιστημονική κοινότητα χρησιμοποιεί μια νέα μορφή HPLC γνωστή ως Υγρή Χρωματογραφία Υπερυψηλής Απόδοσης (UHPLC) για την ανάλυση δειγμάτων. Αυτή η νεότερη μέθοδος έχει μετατοπίσει το επίκεντρο από τις παραδοσιακές τεχνικές ανάλυσης φυτοφαρμάκων στην ολοκληρωμένη ανάλυση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, με μικρότερους χρόνους ανάλυσης και ελάχιστη προετοιμασία δειγμάτων. Η κύρια διαφορά μεταξύ HPLC και UHPLC έγκειται στη

διάμετρο των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης και στην εσωτερική διάμετρο της στήλης. Το UHPLC χρησιμοποιεί σωματίδια που έχουν μέγεθος μικρότερο από 2 μικρόμετρα (μm) και εσωτερική διάμετρο 2 mm, ενώ το HPLC χρησιμοποιεί σωματίδια μεγέθους 3-5 μικρομέτρων (μm) και εσωτερικής διαμέτρου 3-4,6 mm. Αυτό σημαίνει ότι το UHPLC πρέπει να ασκεί εξαιρετικά υψηλή πίεση στην κινητή φάση για να διαχωρίσει τα συστατικά του μείγματος (Nováková, Svoboda and Pavlík, 2017).

Η μέθοδος UHPLC προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με την HPLC, όπως μεγαλύτερη ταχύτητα, βελτιωμένη ανάλυση, μειωμένες παρεμβολές από πολύπλοκες μήτρες και βελτιωμένη ανιχνευσιμότητα. Επιπλέον, θεωρείται ότι είναι πιο φιλική προς το περιβάλλον λόγω της χρήσης μικρότερων ποσοτήτων κινητής φάσης, με αποτέλεσμα λιγότερα απόβλητα και χαμηλότερο κόστος ανάλυσης. Σε σύγκριση με την HPLC, η UHPLC παράγει κορυφές που έχουν λιγότερη επικάλυψη και μικρότερο εύρος. Τελικά, η UHPLC επιτρέπει την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση ενός ευρύτερου φάσματος αναλυτών (Klimczak and Gliszczynska-Świąto, 2015).

3.3 Φασματομετρία Μάζας

Η Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry, MS) είναι μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδος ανάλυσης που περιλαμβάνει τη μετατροπή των μοριακών συστατικών ενός δείγματος σε ιόντα που κινούνται γρήγορα και στη συνέχεια διαχωρίζονται με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται τόσο για τον προσδιορισμό της δομής των ενώσεων και των στοιχείων, όσο και για την ποσοτική μέτρησή τους μέσω του ιονισμού ατόμων ή μορίων και της παραγωγής ιοντικών θραυσμάτων. Καταγράφοντας τη σχετική ένταση του ιοντικού ρεύματος για κάθε τιμή m/z , η MS παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για τη σύνθεση ενός δείγματος. Η φασματομετρία μάζας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση μιας ένωσης αναλύοντας το μοναδικό της φάσμα μάζας, το οποίο λαμβάνεται μέσω ακριβούς ελέγχου. Ωστόσο, αυτή η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ποσοτικό προσδιορισμό μόνο αφού η ένωση έχει υποστεί χρωματογραφικό διαχωρισμό (Watson and Sparkman, 2007). Από το 1995, η

φασματομετρία μάζας έχει υποστεί ταχεία ανάπτυξη και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως σε διάφορους τεχνολογικούς και ερευνητικούς τομείς. Οι βελτιώσεις στη μικροηλεκτρονική και η αυξανόμενη ανάγκη για ακριβή χημική ανάλυση έχουν ωθήσει την πρόοδο αυτής της τεχνικής, καθιστώντας την απαραίτητο εργαλείο για πολλές ερευνητικές δραστηριότητες. Η φασματομετρία μάζας παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την ποσοτική και ποιοτική σύνθεση άγνωστων μειγμάτων, τη χημική σύνθεση μιας τεράστιας σειράς ενώσεων, την παρουσία και την αναλογία ισοτόπων, καθώς και τη δομή και τη σύνθεση της επιφάνειας μέσω απεικόνισης (Watson and Sparkman, 2007).

3.3.1 Γενική Περιγραφή του Οργάνου

Ένα φασματόμετρο μάζας συνήθως περιλαμβάνει πολλά τμήματα όπως (Skoog, 2010):

1. ένα σύστημα εισαγωγής δείγματος,
2. μια πηγή ιόντων,
3. έναν ή περισσότερους αναλυτές μάζας,
4. έναν ανιχνευτή,
5. ένα σύστημα κενού και
6. έναν υπολογιστή με εξειδικευμένο λογισμικό.

Αυτά τα τμήματα συνεργάζονται για να αναλύσουν με ακρίβεια τις χημικές και φυσικές ιδιότητες ενός δεδομένου δείγματος. Το δείγμα εισάγεται πρώτα στο όργανο και στη συνέχεια ιονίζεται από την πηγή ιόντων. Οι αναλυτές μάζας ταξινομούν τα ιόντα με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο και ο ανιχνευτής μετρά την αφθονία ιόντων. Για την αποφυγή παρεμβολών από μόρια αέρα, το σύστημα κενού διατηρεί ένα περιβάλλον χαμηλής πίεσης. Τα δεδομένα που συλλέγονται από τον ανιχνευτή υποβάλλονται σε επεξεργασία και αναλύονται από το λογισμικό ενός υπολογιστή,

επιτρέποντας στους ερευνητές να αναγνωρίσουν και να ποσοτικοποιήσουν τα συστατικά του δείγματος (Skoog, 2010).

3.3.2 Τεχνικές ιοντισμού

Το αρχικό στάδιο της φασματομετρίας μάζας περιλαμβάνει τον μετασχηματισμό των μορίων των ουσιών που πρόκειται να αναγνωριστούν σε αέρια ιόντα μέσω μιας διαδικασίας ιονισμού. Η επιλογή της συγκεκριμένης τεχνικής ιονισμού που θα χρησιμοποιηθεί είναι ένας κρίσιμος παράγοντας στην επακόλουθη ανάλυση, καθώς το προκύπτον φάσμα μπορεί να ποικίλλει πολύ ακόμη και για την ίδια ένωση ανάλογα με την τεχνική και τις συνθήκες που χρησιμοποιούνται. Έτσι, η τεχνική ιονισμού είναι ο καθοριστικός παράγοντας για τη μορφή του φάσματος μάζας. Για την επιλογή της καταλληλότερης τεχνικής ιονισμού, πρέπει να ληφθούν υπόψη διάφοροι παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και των χαρακτηριστικών της ουσίας που αναλύεται, των οργάνων που χρησιμοποιούνται και των ειδικών αναλυτικών δεδομένων που απαιτούνται (Skoog, 2010).

Οι τεχνικές ιονισμού μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο ομάδες: «ήπιες ή μαλακές» και «σκληρές». Στις σκληρές τεχνικές, τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας εκτίθενται σε υψηλή ενέργεια, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία καταστάσεων υψηλής διέγερσης. Αυτό οδηγεί σε εκτεταμένο κατακερματισμό και θραύση δεσμού κατά την αποδιέγερση, παράγοντας ιοντικά θραύσματα που είναι μικρότερα από το μητρικό ιόν με αναλογίες m/z . Από την άλλη πλευρά, οι ήπιες τεχνικές χρησιμοποιούν λιγότερη ενέργεια για να ιονίσουν τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας, προκαλώντας ελάχιστο κατακερματισμό. Ως αποτέλεσμα, το λαμβανόμενο φάσμα μάζας περιέχει την κύρια μορφή του μοριακού ιόντος μαζί με μερικές επιπλέον κορυφές που αντιστοιχούν στα προϊόντα κατακερματισμού. Οι πληροφορίες που λαμβάνονται από τα φάσματα που παράγονται τόσο με σκληρές όσο και με μαλακές τεχνικές είναι εξαιρετικά πολύτιμες. Οι πολυάριθμες κορυφές στα φάσματα που δημιουργούνται από σκληρές τεχνικές παρέχουν πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στο αρχικό μόριο, επιτρέποντάς μας να προσδιορίσουμε τη δομή του με μεγαλύτερη σαφήνεια. Από την άλλη πλευρά, τα

φάσματα που παράγονται με μαλακές τεχνικές επιτρέπουν πιο ακριβείς υπολογισμούς της σχετικής μοριακής μάζας των μορίων της αναλυόμενης ουσίας (Θεοδωρίδης κ.α., 2015).

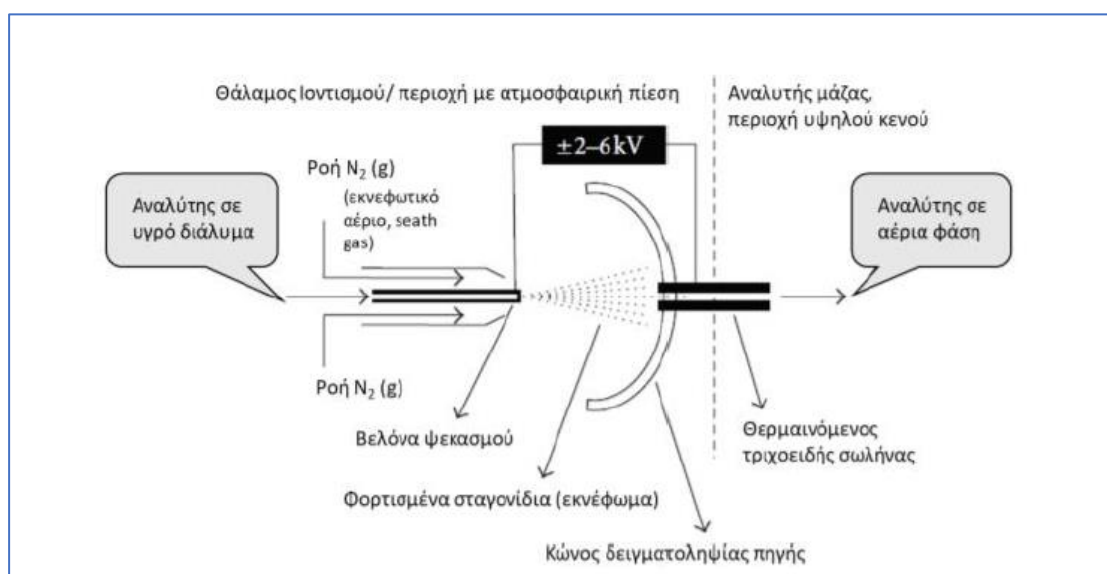
Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες πηγών ιονισμού που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων, οι οποίες ταξινομούνται με βάση τη φύση των ενώσεων που αναλύονται. Η πρώτη κατηγορία είναι οι πηγές αερίου φάσης, όπου το δείγμα εξατμίζεται και στη συνέχεια ιονίζεται. Η δεύτερη κατηγορία είναι οι πηγές εκρόφησης, όπου το δείγμα απορροφά ενέργεια και τα μόριά του μετατρέπονται απευθείας σε ιόντα στην αέρια φάση. Οι πηγές εκρόφησης μπορούν περαιτέρω να χωριστούν σε δύο υποκατηγορίες, δηλαδή σε πηγές ιονισμού υγρής φάσης και σε πηγές ιονισμού στερεάς κατάστασης (Medhe, 2018).

Ο ιονισμός αέριας φάσης είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος που χρησιμοποιείται συνήθως για σταθερές ενώσεις που αντέχουν σε υψηλές θερμοκρασίες και έχουν σημεία βρασμού κάτω από 500°C. Ωστόσο, υπάρχουν περιορισμοί με αυτή τη μέθοδο, καθώς δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενώσεις με σχετική μοριακή μάζα που υπερβαίνει τα 1000 Da. Οι τεχνικές ιονισμού αέριας φάσης χωρίζονται σε εκείνες που χρησιμοποιούνται στο κενό, όπως ο ιονισμός ηλεκτρονίων σε συνδυασμό με αέρια χρωματογραφία, και οι τεχνικές ατμοσφαιρικής πίεσης, οι οποίες χρησιμοποιούνται συνήθως με τεχνικές διαχωρισμού υγρής φάσης όπως το LC-MS. Αυτές οι τεχνικές ατμοσφαιρικής πίεσης έχουν γίνει οι πιο δημοφιλείς και ευρέως χρησιμοποιούμενες μέθοδοι στη φασματομετρία μάζας, αποτελώντας το μεγαλύτερο τμήμα της αγοράς για όργανα και εφαρμογές. Αρκετές τεχνικές εμπίπτουν στην κατηγορία του ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης, συμπεριλαμβανομένου του ιονισμού με Ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) και του Χημικού Ιονισμού Ατμοσφαιρικής Πίεσης (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI). Η επιλογή μιας συγκεκριμένης τεχνικής ή των παραλλαγών της εξαρτάται από την απόδοση ιονισμού που απαιτείται για κάθε εφαρμογή. Ο ηλεκτροψεκασμός χρησιμοποιείται συνήθως για την ανάλυση ενώσεων με μέση έως υψηλή πολικότητα και μοριακό βάρος έως 100.000, ενώ το APCI είναι κατάλληλο για μικρότερα και λιγότερο πολικά μόρια όπως λιπίδια, στεροειδή και ορμόνες (Θεοδωρίδης κ.α., 2015, Hoffmann and Stroobant, 2007).

Η τεχνική του ιονισμού με Ηλεκτροψεκασμό (ESI) είναι η κύρια και ευρέως χρησιμοποιούμενη προσέγγιση για τη σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (LC-MS). Κατηγοριοποιείται ως μέθοδος ήπιου ιονισμού και επιτρέπει την ανάλυση ουσιών με σχετικό μοριακό βάρος άνω των 100.000 Da. Αυτό το καθιστά χρήσιμο για τη μελέτη βιομορίων όπως πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια. Η τεχνική λειτουργεί με ψεκασμό υγρού μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο αρκετών χιλιάδων βολτ, με αποτέλεσμα το υγρό να σπάσει σε ένα νέφος από μικροσκοπικά φορτισμένα σταγονίδια (Banerjee and Mazumdar, 2012).

Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό είναι μια μέθοδος που περιλαμβάνει την εφαρμογή ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου σε ένα υγρό που ρέει μέσω ενός μεταλλικού τριχοειδούς σωλήνα υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Αυτό το ηλεκτρικό πεδίο δημιουργείται εφαρμόζοντας ένα υψηλό δυναμικό μεταξύ του μεταλλικού τριχοειδούς και ενός κοντινού αντί-ηλεκτροδίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός νέφους φορτισμένων σταγονιδίων στο άκρο του τριχοειδούς. Αυτά τα σταγονίδια στη συνέχεια υφίστανται αποδιάλυση καθώς περνούν από την πηγή ιονισμού και κατευθύνονται προς το φασματόμετρο μάζας. Ο ρυθμός ροής υγρού είναι τυπικά χαμηλός, κυμαίνεται από 1-10 $\mu\text{L}/\text{min}$, και το μεταλλικό τριχοειδές και το αντίθετο ηλεκτρόδιο βρίσκονται σε απόσταση 0,3-2 cm το ένα από το άλλο. Τα σταγονίδια που παράγονται κατά τον ηλεκτροψεκασμό γίνονται όλο και μικρότερα, με αποτέλεσμα τα φορτισμένα σωματίδια μέσα τους να συμπιέζονται σε μικρότερο χώρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των απωθητικών δυνάμεων μεταξύ των σωματιδίων. Η σταθερότητα των σταγονιδίων κατά τον ηλεκτροψεκασμό εξαρτάται από την ισορροπία μεταξύ των απωθητικών δυνάμεων που σπρώχνουν τα σωματίδια και της επιφανειακής τάσης του σταγονιδίου που τα συγκρατεί. Καθώς το μέγεθος της σταγόνας μειώνεται, οι απωθητικές δυνάμεις γίνονται ισχυρότερες, φτάνοντας τελικά σε ένα σημείο όπου είναι ίσες με την επιφανειακή τάση και το σταγονίδιο γίνεται ασταθές. Το σημείο αυτό καλείται όριο Rayleigh, το οποίο είναι ένα κρίσιμο όριο που σηματοδοτεί το σημείο στο οποίο οι ελκτικές δυνάμεις που συγκρατούν την επιφάνεια μιας σταγόνας ενωμένη ξεπερνιούνται από τις απωθητικές δυνάμεις μεταξύ των φορτίων της. Όταν συμβαίνει αυτό, εμφανίζεται ένα φαινόμενο γνωστό ως έκρηξη Coulomb, το οποίο οδηγεί στον κατακερματισμό της σταγόνας σε πολλαπλά

μικρότερα σταγονίδια. Στη συνέχεια λαμβάνει χώρα μια σειρά από εκρήξεις, με αποτέλεσμα τη δημιουργία αερίων ιόντων των ουσιών που αναλύονται. Αυτά τα ιόντα στη συνέχεια περνούν μέσα από ένα μικρό άνοιγμα πριν εισέλθουν στο φασματομέτρο μάζας, αφαιρώντας τυχόν μόρια διαλύτη που έχουν απομείνει μέσω είτε ενός θερμαινόμενου τριχοειδούς είτε μέσω ενός θερμαινόμενου παραπετάσματος αδρανούς αερίου, συνήθως αζώτου. Αυτή η διαδικασία συνοδεύεται από σταδιακή μείωση της πίεσης (Banerjee and Mazumdar, 2012).



Εικόνα 3.2 Σχηματική απεικόνιση της πηγής ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI (Banerjee and Mazumdar, 2012)

3.3.3 Αναλυτές μαζών

Μετά την παραγωγή αερίων ιόντων στην πηγή ιονισμού, τα ιόντα αποστέλλονται στον αναλυτή μάζας όπου διαχωρίζονται ανάλογα με την αναλογία μάζας προς φορτίο. Ο πιο αποτελεσματικός αναλυτής μάζας θα πρέπει να έχει την ικανότητα να διαφοροποιεί μικρές διαφορές m/z και να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλης ποσότητας ιόντων, ώστε να επιτυγχάνεται το υψηλότερο επίπεδο ευαισθησίας και να είναι συμβατός με όλες τις μεθόδους εισαγωγής και ιονισμού δείγματος. Υπάρχουν διάφοροι τύποι αναλυτών μάζας και καθένας από αυτούς διαχωρίζει ιόντα με βάση

ξεχωριστές αρχές. Ενώ όλοι οι αναλυτές μάζας χρησιμοποιούν ηλεκτρικά και μαγνητικά πεδία, διαφέρουν ως προς τις μεθόδους τους για τη χρήση αυτών των πεδίων για τον διαχωρισμό των σωματιδίων. Αυτές οι παραλλαγές χρησιμεύουν ως παράγοντες για τον προσδιορισμό του καταλληλότερου αναλυτή για μια συγκεκριμένη εφαρμογή (Skoog, 2010).

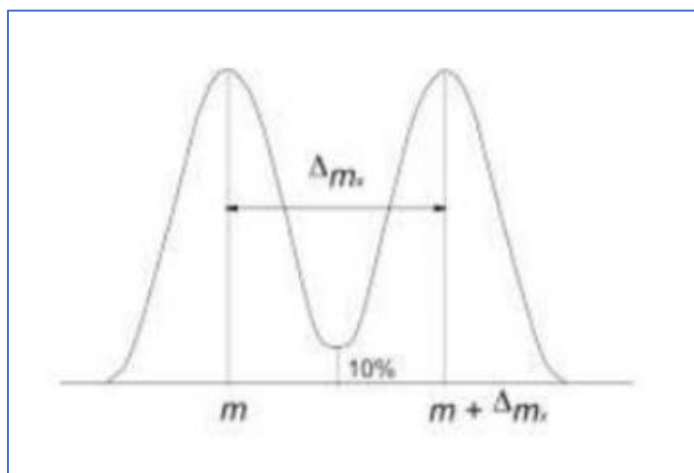
Υπάρχουν τρεις κύριοι τύποι αναλυτών μάζας: αναλυτές σάρωσης, αναλυτές παλμών και υβριδικοί αναλυτές. Οι αναλυτές σάρωσης, όπως ο τετραπολικός αναλυτής μάζας, σαρώνουν με διαφορετικούς λόγους μάζας προς φόρτιση. Οι αναλυτές παλμών, όπως οι αναλυτές χρόνου πτήσης και οι τετραπολικές παγίδες ιόντων χρησιμοποιούν παλμούς για τη μέτρηση των αναλογιών μάζας προς φόρτιση. Οι υβριδικοί αναλυτές συνδυάζουν διαφορετικούς τύπους αναλυτών για να αυξήσουν τις πιθανές χρήσεις τους και να επιτρέψουν τη διεξαγωγή πολλαπλών πειραμάτων. Παραδείγματα υβριδικών αναλυτών περιλαμβάνουν τα Q-TRAP και Q-TOF (Μαραγκού, 2010).

Οι αναλυτές μάζας διαθέτουν πολλά θεμελιώδη χαρακτηριστικά, όπως η διακριτική ικανότητα ή η ισχύς ανάλυσης (resolution- R), το εύρος μάζας, η ταχύτητα ανάλυσης και η διαπερατότητα ιόντων. Μεταξύ αυτών των ιδιοτήτων, η ικανότητα διαχωρισμού είναι η πιο κρίσιμη και μπορεί να προσδιοριστεί από την εξίσωση:

$$R = \frac{m}{\Delta m}$$

Όπου: Δm η διαφορά μαζών m_1 και m_2 , μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών και m είναι η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής ή η μέση τιμή των δύο κορυφών του φάσματος.

Όταν δύο κορυφές έχουν παρόμοιο επίπεδο έντασης, θεωρείται ότι διαχωρίζονται επαρκώς εάν το ύψος της γραμμής βάσης μεταξύ τους είναι μικρότερο από το 10% του ύψους τους. Ωστόσο, εάν δεν υπάρχει γειτονική κορυφή συγκρίσιμης έντασης διαθέσιμη για σύγκριση και η επικάλυψη δεν είναι σαφώς καθορισμένη, τότε το πλήρες εύρος στο μισό μέγιστο της κορυφής ενδιαφέροντος χρησιμοποιείται ως το καθορισμένο Δm (Μαραγκού, 2010, Θεοδωρίδης κ.α., 2015).



Εικόνα 3.3 Διαχωριστική ικανότητα φασματομέτρου μαζών (Λαίμου-Γεράνιου, 2020)

Οι αναλυτές μάζας που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα τελευταία χρόνια για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα είναι ο τετραπολικός αναλυτής, ο αναλυτής χρόνου-πτήσης καθώς και ο αναλυτής παγίδας ιόντων, οι οποίοι περιγράφονται αναλυτικότερα στη συνέχεια.

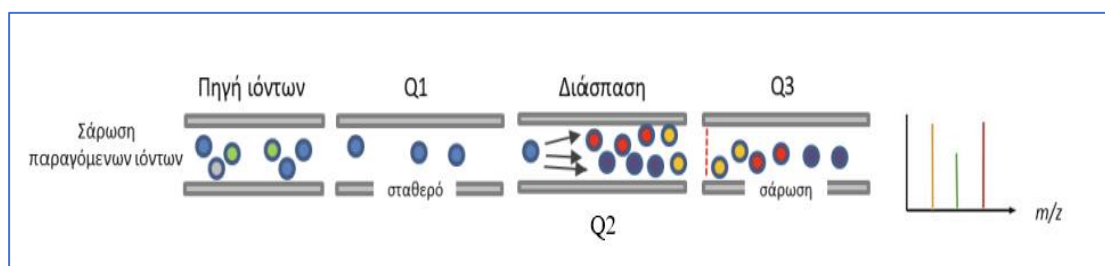
3.3.3.1 Τετραπολικός Αναλυτής (Quadrupole)

Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας (Quadrupole mass analyzer) επιτρέπει τον διαχωρισμό των κατακερματισμένων προϊόντων με την αναλογία m/z τους χωρίς τη χρήση μαγνητικού πεδίου. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση της σταθερότητας των τροχιών ιόντων σε ένα ταλαντούμενο ηλεκτρικό πεδίο για την ταξινόμηση των ιόντων σύμφωνα με την αναλογία m/z τους. Οι τετραπολικοί αναλυτές χρησιμοποιούν τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδους που είναι συμμετρικά τοποθετημένες γύρω από μια δέσμη ιόντων και συνδέονται διαγώνια μεταξύ τους. Αυτές οι ράβδοι έχουν διάμετρο περίπου 6 mm και μήκος περίπου 10 cm. Κάθε ζεύγος ράβδων συνδέεται με έναν πόλο πηγής τάσης που περιλαμβάνει τόσο ένα συνεχές ρεύμα (DC) όσο και ένα στοιχείο ραδιοσυχνότητας υψηλής συχνότητας (RF). Τα ιόντα προωθούνται προς την κεντρική περιοχή, η οποία είναι το τετραπολικό ηλεκτρικό πεδίο κατά μήκος του άξονα z που οδηγεί στον ανιχνευτή. Ο λόγος μάζας προς φορτίο

(αναλογία m/z) των θραυσμάτων που εξέρχονται από το φίλτρο μάζας καθορίζεται από τις παραμέτρους του εναλλασσόμενου δυναμικού, την ένταση του συνεχούς ρεύματος και το πλάτος του πεδίου. Ως αποτέλεσμα, μόνο ιόντα με συγκεκριμένη τιμή m/z θα περάσουν από το τετραπολικό φίλτρο, ενώ εκείνα που δεν θα χτυπήσουν τους πόλους, θα χάσουν το φορτίο τους και θα εξαλειφθούν από το σύστημα χρησιμοποιώντας ισχυρό κενό (Μαραγκού, 2010, Θεοδωρίδης κ.α., 2015).

Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας έχει πολλά πλεονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της ικανότητάς του να σαρώνει και να παράγει γρήγορα φάσματα σε λίγα μόνο χιλιοστά του δευτερολέπτου. Αυτό το καθιστά εξαιρετικό εργαλείο για χρήση σε συνδυασμό με χρωματογραφικές τεχνικές, επιτρέποντας τη λήψη των φασμάτων μάζας των διαχωρισμένων ενώσεων ταυτόχρονα με την έκλουσή τους. Οι μέτριες απαιτήσεις κενού 10-5 Torr καθιστούν επίσης τον τετραπολικό αναλυτή κατάλληλο για χρήση με πηγές ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης. Επιπλέον, είναι ένα αξιόπιστο, οικονομικό, συμπαγές και φιλικό προς το χρήστη όργανο. Τέλος, είναι ιδανικό για ποσοτική ανάλυση και μπορεί να συνδεθεί με διαδοχικούς αναλυτές όπως το τριπλό τετράπολο. Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας έχει μερικά μειονεκτήματα, συμπεριλαμβανομένης της σχετικά χαμηλής ανάλυσης, η οποία τυπικά κυμαίνεται μεταξύ 1000 και 2000, αλλά μερικές φορές μπορεί να φτάσει έως και 5000. Επιπλέον, αυτοί οι αναλυτές έχουν περιορισμένη περιοχή μάζας, με την υψηλότερη τιμή m/z να είναι 4000 u, και ακρίβεια μάζας μόνο περίπου 0,5 u (Skoog 2010, Μαραγκού, 2010).

Για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα, χρησιμοποιείται πολύ συχνά ο τύπος του φασματομέτρου μάζας τριπλού- τετράπολου (Grimalt et al., 2010). Το τριπλό τετράπολο αποτελείται από τα τετράπολα Q1- αναλυτής MS, Q2 - θραυσματοποίηση ιονισμένων μορίων και Q3 -αναλυτής MS (Νάννου, 2018).



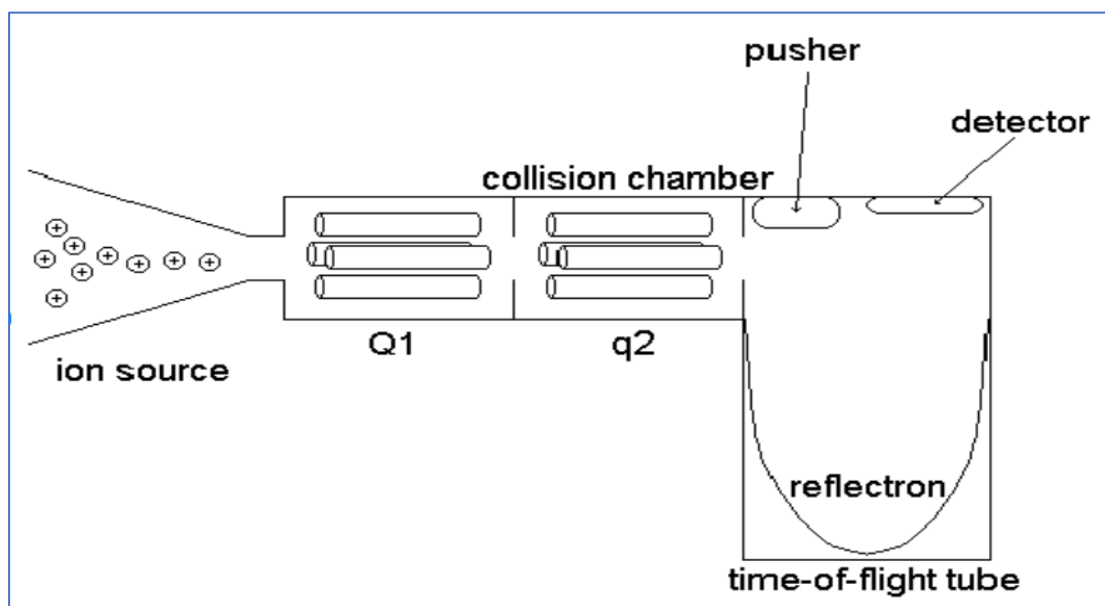
Εικόνα 3.4 Σχηματική απεικόνιση του τριπλού τετράπολου (Νάννου, 2018)

3.3.3.2 Αναλυτές μάζων χρόνου πτήσης (TOF)

Ο αναλυτής Time of Flight (TOF) είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αναλυτής μάζας που έχει γίνει όλο και πιο δημοφιλής τα τελευταία χρόνια λόγω των διαφόρων βελτιώσεων στον σχεδιασμό του. Διαχωρίζει τα ιόντα με βάση την κινητική τους ενέργεια, επιτρέποντάς τους να κινούνται ελεύθερα σε έναν θάλαμο πτήσης που είναι απαλλαγμένος από ηλεκτρομαγνητικά πεδία. Αυτό επιτυγχάνεται επιταχύνοντας πρώτα τα ιόντα με ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο πριν τα απελευθερώσουν στον θάλαμο πτήσης. Η διαδικασία περιλαμβάνει την παροχή σε όλα τα ιόντα της ίδιας ποσότητας κινητικής ενέργειας, με αποτέλεσμα κάθε ιόν να έχει μια μοναδική ταχύτητα με βάση την αναλογία m/z τους. Λόγω αυτών των μεταβαλλόμενων ταχυτήτων, τα ιόντα χρειάζονται διαφορετικό χρόνο για να ταξιδέψουν στο μήκος του θαλάμου πτήσης. Στο τέλος του θαλάμου, υπάρχει ένας ανιχνευτής ιόντων για την αναγνώριση των ιόντων (Νάννου 2018, Κακλαμάνος, 2009).

Το Q-TOF αποτελεί έναν υβριδικό αναλυτή μάζας τετράπολου – χρόνου πτήσης και είναι ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος αναλυτής μάζας στην ανάλυση ταυτοποίησης φυτοφαρμάκων σε φρούτα. Με τη φασματομετρία μάζας τετραπόλου - χρόνου πτήσης υψηλής ανάλυσης με παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (HR-MRM), τα επιλεγμένα πρόδρομα ιόντα περνούν στην κυψέλη σύγκρουσης όπου καταγράφονται φάσματα υψηλής ανάλυσης των προϊόντων ιόντων τα οποία επιτρέπουν τον ποσοτικό προσδιορισμό αναλυτών με πολύ υψηλή εκλεκτικότητα (Peti et al., 2018).

Ως υβριδική συσκευή, είναι γνωστή για την υψηλή της ακρίβεια στη μέτρηση μάζας και τη γρήγορη λειτουργία. Το Q-TOF είναι ιδιαίτερα χρήσιμο στη δημιουργία φασμάτων μάζας υψηλής ανάλυσης, γεγονός που το καθιστά ιδανικό για την ταυτόχρονη ανίχνευση και ταυτοποίηση πολλών φυτοφαρμάκων και των μεταβολιτών τους (Shizuka et al., 2015).



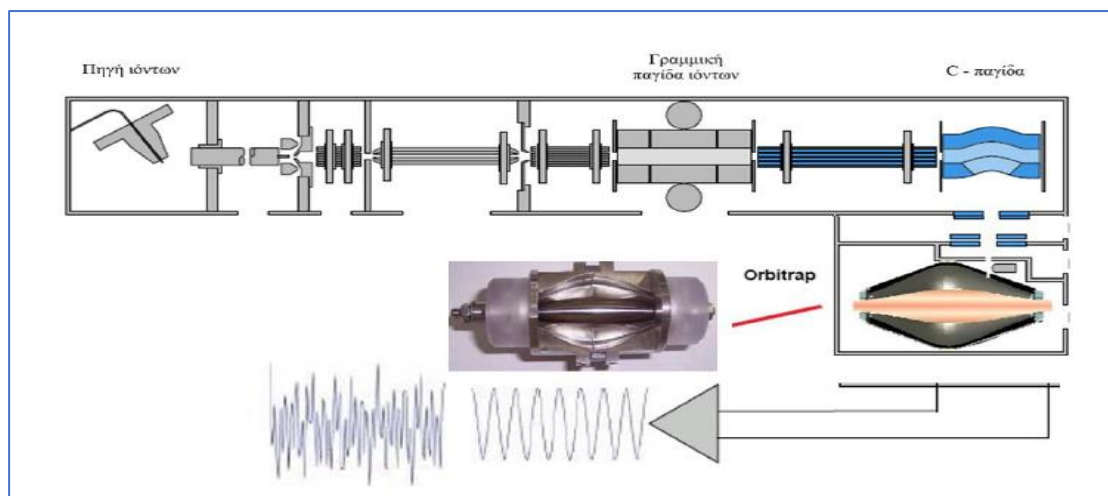
Εικόνα 3.5 Σχηματικό διάγραμμα αναλυτή Q-TOF (Yanofsky et al., 2008)

3.3.3.3 Αναλυτές μαζών παγίδας ιόντων (Orbitrap)

Τα τελευταία χρόνια, εισήχθη ένας νέος τύπος αναλυτή φασματομετρίας μάζας που ονομάζεται παγίδα ιόντων Orbitrap. Αυτή η συσκευή αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια - ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο σε σχήμα ατράκτου και ένα εξωτερικό ηλεκτρόδιο που μοιάζει με βαρέλι. Όταν τα ιόντα εισάγονται στο Orbitrap, έλκονται από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και παγιδεύονται εκεί. Στη συνέχεια, τα ιόντα κινούνται σε σπειροειδείς τροχιές γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο, που χωρίζονται με αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z). Ρυθμίζοντας την ένταση του ηλεκτρικού πεδίου, το Orbitrap είναι σε θέση να κατευθύνει όλα τα ιόντα προς τον ανιχνευτή (Κακλαμάνος, 2009).

Τα τελευταία χρόνια, υβριδικοί συνδυασμοί όπως το Q-TRAP, δηλαδή συνδυασμός τετράπολου με αναλυτή παγίδας ιόντων, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον εντοπισμό άγνωστων ουσιών με μεγαλύτερη ευαισθησία και εξειδίκευση. Αυτοί οι συνδυασμοί έχουν αποδειχθεί πιο αποτελεσματικοί από την απλή ρύθμιση Orbitrap-MS. Το Q-TRAP λειτουργεί παρόμοια με τον αναλυτή TOF στο υβριδικό

σύστημα Q-TOF και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για αναλύσεις φυτοφαρμάκων σε φρούτα (Rajski et al., 2014).



Εικόνα 3.6 Απεικόνιση αναλυτή μάζας Orbitrap (Κακλαμάνος, 2009)

3.3.4 Τεχνικές ανάλυσης φασματομετρίας μάζας

Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιεί διάφορες αναλυτικές τεχνικές, οι πιο εξέχουσες από τις οποίες είναι η πλήρης σάρωση (Full Scan, FS), η επιλεκτική παρακολούθηση ιόντων (Single Ion Monitoring, SIM) και η διαδοχική φασματομετρία μάζας (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS), η οποία περιλαμβάνει διάφορες μεθόδους σάρωσης όπως για παράδειγμα την παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης SRM (selected reaction monitoring) ή MRM (multiple reaction monitoring) (Θεοδωρίδης κ.α., 2015, Κακλαμάνος, 2009).

Η τεχνική πλήρους σάρωσης, η οποία περιλαμβάνει τη λήψη του πλήρους φάσματος μεταξύ δύο τιμών m/z για μια καθορισμένη χρονική περίοδο, χρησιμοποιείται συνήθως για να εξακριβωθεί η δομή και να επαληθευτεί η ταυτότητα μιας άγνωστης ουσίας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί προσδιορίζοντας το μοριακό του βάρος ή συγκρίνοντάς το με τυπικά φάσματα. Η ευαισθησία μπορεί να αυξηθεί με την επιμήκυνση του χρόνου σάρωσης, με αποτέλεσμα περισσότερα ιόντα να φτάνουν στον ανιχνευτή ή με τη συντόμευση του εύρους σάρωσης. Ωστόσο, υπάρχει κίνδυνος απώλειας πληροφοριών με αυτές τις προσεγγίσεις (Watson and Sparkman, 2007).

Η μέθοδος επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (SIM) είναι εξαιρετικά αποτελεσματική για την ανίχνευση ιχνών ουσιών και συνήθως χρησιμοποιείται κατά την ανάλυση ενώσεων με γνωστά φάσματα. Αυτή η τεχνική περιλαμβάνει την επιλογή συγκεκριμένων ιόντων από το φάσμα μιας συγκεκριμένης ένωσης και τη γρήγορη εναλλαγή του αναλυτή μεταξύ αυτών των ιόντων, μετρώντας μόνο τα επιλεγμένα. Η SIM παρέχει χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μεγαλύτερες ταχύτητες από την πλήρη σάρωση λόγω του προσεκτικού ελέγχου και παρακολούθησης ενός μικρού αριθμού ιόντων, γεγονός που την καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμη για ποσοτική ανάλυση. Ωστόσο, υπάρχει κίνδυνος ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων, καθώς οποιαδήποτε ένωση που παράγει τα ίδια επιλεγμένα ιόντα θα μπορούσε να αναγνωριστεί εσφαλμένα. Συνολικά, η SIM είναι ένα ευαίσθητο και πολύτιμο εργαλείο για την ανάλυση ιχνοουσιών (Watson and Sparkman, 2007).

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS) είναι μια συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική που περιλαμβάνει πολλαπλά επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιείται συχνά σε τριπλά τετράπολα ή υβρίδια, όπου τα μεμονωμένα τμήματα μπορούν να επιλέξουν να μεταφέρουν ένα ιόν ή όλα τα ιόντα. Κατά τη μετάβαση μεταξύ των επιπέδων MS, τα ιόντα μπορεί να υποστούν μια σειρά διεργασιών, συμπεριλαμβανομένης της σύγκρουσης με αδρανή ή αντιδρώντα αέρια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, καθώς και επιτάχυνση, επιβράδυνση και σταθεροποίηση. Επιλέγοντας από μια σειρά αναλυτών MS που είτε σαρώνουν είτε δεν σαρώνουν, και επιλέγοντας διάφορες διεργασίες για τα ιόντα μεταξύ των αναλυτών, οι ερευνητές μπορούν να διεξάγουν μια πληθώρα πειραμάτων MS/MS. Αυτά τα πειράματα μπορούν να δώσουν πολύτιμες πληροφορίες για τη δομή του δείγματος που αναλύεται και μπορούν να ενισχύσουν την ακρίβεια και την ευαισθησία της μέτρησης (Büyükköroğlu et al., 2018).

3.4 Σύζευξη υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας σειρά (LC-MS/MS)

Στον τομέα της εργαστηριακής χημείας, υπάρχει μια αυξανόμενη τάση προς τη χρήση συνδυασμένων τεχνικών για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας των

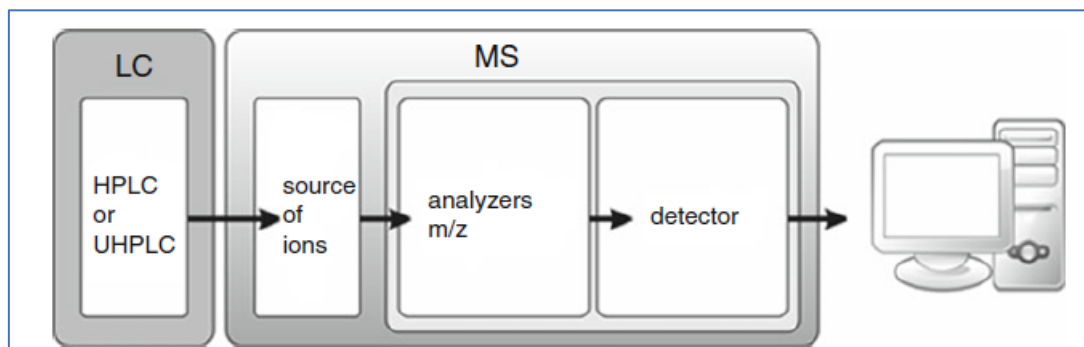
επιστημονικών αναλύσεων. Μία από τις νεότερες και πιο καινοτόμες μεθόδους για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων περιλαμβάνει τον συνδυασμό υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας (LC-MS). Ενσωματώνοντας τα πλεονεκτήματα αυτών των δύο τεχνικών, οι ερευνητές είναι σε θέση να εντοπίσουν υπολείμματα με μεγαλύτερη ακρίβεια μέσω φασματομετρίας μάζας, ενώ απολαμβάνουν επίσης την ευελιξία του διαχωρισμού πολλαπλών ενώσεων χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία. Όταν χρησιμοποιούνται ανιχνευτές απορρόφησης και φθορισμού για τον διαχωρισμό ενός μείγματος ενώσεων, η αναγνώριση των κορυφών προσδιορίζεται συγκρίνοντας τους χρόνους κατακράτησης των ενώσεων στο δείγμα με αυτούς σε ένα πρότυπο διάλυμα υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Ωστόσο, λόγω του τεράστιου αριθμού ενώσεων με παρόμοιους χρόνους κατακράτησης, είναι δύσκολο να προσδιοριστούν με ακρίβεια οι συγκεκριμένες ενώσεις που υπάρχουν στο μείγμα. Επιπλέον, όταν χρησιμοποιείται υγρή χρωματογραφία για την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων, μπορεί να υπάρχουν περιπτώσεις όπου είναι δύσκολο να απομονωθούν πλήρως όλα τα συστατικά. Αυτό οφείλεται στην εμφάνιση αλληλεπικαλυπτόμενων χρωματογραφικών κορυφών, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε ανακριβή ή ακόμη και ανέφικτο ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών που υπάρχουν (Hoffmann and Stroobant, 2007).

Αντίθετα, η φασματομετρία μάζας είναι μια εξαιρετικά αξιόπιστη μέθοδος για την ταυτοποίηση ενώσεων λόγω των μοναδικών φασμάτων μάζας πολλών ενώσεων. Ωστόσο, εάν η ένωση που αναλύεται είναι μέρος ενός μεγαλύτερου μείγματος και δεν έχει διαχωριστεί εκ των προτέρων, το προκύπτον φάσμα θα περιλαμβάνει ιόντα από τα άλλα συστατικά, καθιστώντας την ταυτοποίηση πιο δύσκολη. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα όταν η ένωση υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις ή ίχνη, καθιστώντας την ανίχνευση σχεδόν αδύνατη (Hoffmann and Stroobant, 2007).

Ο συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας είναι ένα ισχυρό εργαλείο που επιτρέπει την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων ουσιών. Αυτή η τεχνική επιτρέπει την εισαγωγή μιγμάτων στο φασματόμετρο μάζας, το οποίο παρέχει αξιόπιστη αναγνώριση των ενώσεων, ακόμη και όταν ο διαχωρισμός δεν έχει ολοκληρωθεί. Επιπλέον, ο ποσοτικός προσδιορισμός είναι πιο ακριβής, καθώς τα

χρωματογραφήματα μπορούν να παρακολουθούνται χρησιμοποιώντας ένα μόνο χαρακτηριστικό ιόν ή χαρακτηριστικές μεταπτώσεις όταν χρησιμοποιείται φασματομετρία σε σειρά (tandem). Συνολικά, η σύζευξη αυτών των δύο τεχνικών προσφέρει μια εξαιρετικά αποτελεσματική μέθοδο για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων ουσιών (Νάννου, 2018). Ειδικότερα, όσον αφορά στα φυτοφάρμακα, η ανάλυση LC/MS έχει σταθερά εδραιωθεί για την ανάλυση μη πτητικών, πολικών και θερμικά ασταθών φυτοφαρμάκων, όπως είναι για παράδειγμα οι πυριμιδίνες, τα καρβαμικά και οι τριαζόλες (Lambropoulou and Albanis, 2007).

Η UHPLC χρησιμοποιείται συχνά για ερευνητικούς σκοπούς όπου απαιτείται υψηλός βαθμός ευαισθησίας και επιλεκτικότητας. Για να επιτευχθούν ακόμη μεγαλύτερα επίπεδα ακρίβειας, το UHPLC συχνά συνδυάζεται με αναλυτές μάζας υψηλής απόδοσης, όπως το Q-TOF και το Q-TRAP. Αυτά τα υβριδικά συστήματα ενισχύουν σημαντικά την ευαισθησία και την ανιχνευσιμότητα της μεθόδου, καθιστώντας την πιο αξιόπιστη αναλυτική τεχνική για τον εντοπισμό άγνωστων ουσιών και τον ποσοτικό προσδιορισμό των γνωστών αναλυτών-στόχων σε δείγματα φρούτων (Stachniuk, 2016).



Εικόνα 3.7 Σχηματική απεικόνιση της αναλυτικής πορείας με την συζευγμένη τεχνική LC-MS (Stachniuk, 2016)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο : ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HPLC- MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΦΡΟΥΤΑ

4.1 Εισαγωγή

Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκε έρευνα στην πρόσφατη διεθνή βιβλιογραφία για την εύρεση μελετών που αφορούν στην ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με τη συζευγμένη τεχνική LC-MS/MS. Συγκεκριμένα αναζητήθηκαν άρθρα πρωτογενούς έρευνας από το 2015 έως και το 2023 στις βάσεις δεδομένων Scopus και Pubmed με τις εξής λέξεις-κλειδιά: pesticide, residues, fruits, LC-MS/MS. Οι έρευνες που αφορούσαν ανίχνευση φυτοφαρμάκων τόσο σε φρούτα όσο και σε λαχανικά αποκλείστηκαν, όπως επίσης αποκλείστηκαν και μελέτες που αφορούσαν τόσο τη χρήση υγρής όσο και αέριας χρωματογραφίας και τελικά βρέθηκαν 20 μελέτες οι οποίες επικεντρώνονται αποκλειστικά στην εκχύλιση/καθαρισμό και στην ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με LC-MS/MS. Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται συνοπτικά οι 20 αυτές μελέτες, ως προς την προκατεργασία των δειγμάτων και την χρησιμοποιούμενη τεχνική ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες διάφορων ειδών φρούτων, ενώ επίσης αναφέρονται οι ανακτήσεις, η σχετική τυπική απόκλιση (RSD), τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ).

Οι τεχνικές εκχύλισης που χρησιμοποιούνται στις συγκεκριμένες μελέτες αφορούν στην εκχύλιση υγρού – υγρού (LLE), τη διασπορά στερεάς φάσης υποστρώματος (MSPD) καθώς και την τεχνική QuEChERS με διάφορες παραλλαγές, ενώ η κύρια τεχνική καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε στις μελέτες αυτές είναι η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (d-SPE). Για την ανίχνευση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα διάφορα φρούτα έγινε χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής διακριτικής ικανότητας σε σύζευξη με τριπλό τετραπολικό φασματόμετρο μάζας, με υβριδικό αναλυτή τετράπολου - χρόνου πτήσης Q-TOF καθώς και με υβριδικό αναλυτή μαζών Q-TRAP. Στη συνέχεια της παρούσας εργασίας συζητούνται επίσης

οι κύριες αναλυτικές παράμετροι των τεχνικών αυτών σε σχέση με τις ανακτήσεις και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, καθώς και οι βελτιστοποιήσεις που πραγματοποιήθηκαν σε κάθε μία μέθοδο ως προς τη μείωση των επιδράσεων της μήτρας.

Πίνακας 4.1 Περίληψη των διαδικασιών εκχύλισης και ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα κατά το χρονικό διάστημα 2015 -2023, συμπεριλαμβανομένων των ανακτήσεων και των RSD, CV, LODs και LOQs, κατά χρονολογική σειρά

A/A	ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	ΔΕΙΓΜΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΜΕΘΟΔΟΣ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ (s)	ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΣ	ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΗ ΣΤΗΛΗ	ΑΝΑΚΤΗΣΗ (%)	RSD/CV* (%)	LOD (mg/kg)	LOQ (mg/kg)	ΕΤΟΣ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
1	17 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Ροδάκινα, λευκά σταφύλια, μπανάνες, φράουλες, αχλάδια	15g	QuEChERS: 15 mL ακετονιτρίλιο/ 0.1 % CH ₃ COOH (acetate QuEChERS) ή 15mL ακετονιτρίλιο (citrate QuEChERS)	SPE: Προσθήκη 50mg GCB	TQD UPLC-MS/MS (ESI)	UPLC BEH C ₁₈ 1.7 μm, 2.1×100 mm , έκλουση με νερό /MeOH 0.1 % formic acid ,0.45 mL min ⁻¹ ροή	63–138	-	0.1-2.5 ng/L	0.3-7.5 ng/L	2015	Christia et al., 2015
2	8 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Γκότζι μπερί	5 g	Modified QuEChERS: Εκχύλιση με 10 mL ακετονιτρίλιο, 2 g NaCl and 2 g MgSO ₄	SPE:Προσθήκη 50mg PSA, αραίωση με 0.1% formic acid σε νερό σε αναλογία 4:6	UPLC-MS/MS (Triple Quadrupole, ESI)	C18 στήλη (100 mm , 2.1 mm, 1.7 μm). Κινητή φάση: 0.1% formic acid σε νερό (A) και ακετονιτρίλιο (B)	82 -96	< 7	0.001-0.005	0.003-0.015	2017	Fu et al., 2017
3	68 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Μάνγκο	5g	LLE: 25:75 (v/v) ακετονιτρίλιο/οξικός αιθυλεστέρας +500 mg NaCl a+ 1.5 g MgSO ₄	SPE:Προσθήκη 200mg PSA +500 mg Na ₂ SO ₄	UHPLC-Q-TOF/MS (ESI)	UPLC® BEH C18, 2.1 × 50mm; 1.7 μm. Κινητή φάση A 0.1% formic acid σε μεθανόλη, κινητή φάση B 0.1% formic acid σε νερό	70 - 122	< 16	0.5-7 (μg/Kg)	2-25 (μg/Kg)	2017	Sivaperuma l et al., 2017
4	1 φυτοφάρμακο και ο μεταβολίτης του	Σταφύλια	5g	QuEChERS: 10 mL ακετονιτρίλιο +1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	SPE:Προσθήκη 50mg PSA + 3 mg MWCNTs	LC-MS/MS (Triple Quadrupole, ESI)	C18 στήλη (50 mm , 3mm, 1.7 μm). Κινητή φάση: νερό 25% και ακετονιτρίλιο 75%, ισοκρατική έκλουση	83.2 - 105.4	< 7.1	2.1 × 10 ⁻⁵ - 8.7 × 10 ⁻⁴	0.1	2018	Dong et al., 2018
5	1 φυτοφάρμακο (thiamethoxam)	Μπανάνες	10 g	QuEChERS:Εκχύλιση με 10 mL ακετονιτρίλιο, 1 g	SPE:Προσθήκη 100mg PSA +600 mg	TQD LC-MS/MS (Triple	C18 στήλη(5 μm X 4.8 × 250 mm). Κινητή φάση:	90 -109	< 13	0.001-0.002μg/g	0.005-0.008 μg/g	2018	Suganthi et al., 2018

				NaCl and 4 g MgSO4	MgSO4	Quadrupole, ESI)	0.5% HCOOH σε νερό και 0.5% HCOOH σε ακετονιτρίλιο						
6	50 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Τροπικά φρούτα	10g	QuEChERs (modified): 10 mL ακετονιτρίλιο +2.5 g NaCl	SPE:Προσθήκη 250mg PSA +750 mg MgSO4	UHPLC-Q-TOF/MS (ESI)	C18 RRHD στήλη (50 mm× 2.1 mm; 1.8 μm). Κινητή φάση A: υδατικό διάλυμα 1 mM ammonium acetate Κινητή φάση B: υδατικό διάλυμα 1μM methanol	63 - 119	< 3.2	0.03–4 (μg/Kg)	0.1-12 (μg/Kg)	2018	Yang et al., 2018
7	165 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Εσπεριδοειδή	10g	QuEChERs: 10 mL ακετονιτρίλιο	SPE:Προσθήκη 150mg PSA + 900mg MgSO4	LC-MS/MS (Triple Quadrupole, ESI)	XDB-C18 (2,1x100mm), Κινητή φάση: A: H2O, 2mM HCOONH4, HCOOH 1% και B: CH3OH, 2mM HCOONH4, HCOOH 1%	70 - 100	< 20	-	0.71 - 5 μg/kg	2019	Calvaruso et al., 2019
8	133 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Μήλα, ροδάκινα, αχλάδια, δαμάσκηνα	1g	BiT- MSPD: 2 mL ακετονιτρίλιο	-	UHPLC-MS/MS (Triple quadrupole -ESI)	BEH C18 στήλη (50 ×2.1 mm, 1.7 μm). with a mobile phase consisting of Κινητή φάση A: υδατικό διάλυμα 2% (v/v) μεθανόλη και B: μεθανόλη	72 - 113	< 17	3 (μg/Kg)	10 (μg/Kg)	2019	Kemmerich et al., 2019
9	1 φυτοφάρμακο (Pyraclostrobin)	Φράουλες	10g	QuEChERs: 10 mL ακετονιτρίλιο, 1 g NaCl , 4 g MgSO4	-	LC-MS/MS (Q Trap, ESI)	C18 στήλη(2.5 μm 3.0×50mm). Κινητή φάση A: 10mM ammonium Formate σε διάλυμα νερό/ μεθανόλη (90:10, v/v). Κινητή φάση B: μεθανόλη	97 - 104	< 6	-	0.001	2019	Malhat et al., 2019

10	1 φυτοφάρμακο (Nitenpyram)	Ακτινίδια	10g	QuEChERS (modified): 20 mL ακετονιτρίλιο +1.5 g NaCl +4 g MgSO ₄	SPE:Προσθήκη 50 mg PSA, 50 mg C18 και 50 mg GCB	LC-MS/MS (Q Trap, ESI)	SB-C18 στήλη (4.6 × 150 mm, 5 μm). Κινητή φάση A: νερό + 0.1% formic acid. Κινητή φάση B: ακετονιτρίλιο	71 - 96	< 10	0.003	0.01	2020	Ge et al., 2020
11	284 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Σταφύλια, πεπόνια, καρπούζια, ροδάκινα, φράουλες	10g	QuEChERS (modified): 10 mL ακετονιτρίλιο +5 g NaCl	-	UHPLC-Q- TOF/MS (ESI)	UPLC HSS T3 στήλη (2.1 × 100 mm; 1.8 μm). Κινητή φάση A: 100% μεθανόλη, Κινητή φάση B: 5 mM ammonium acetate σε νερό	70 - 120	< 15.5	0.6–10 (μg/Kg)	2-30 (μg/Kg)	2021	Zhang et al., 2021
12	10 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Μήλα	10g	QuEChERS (modified): 10 mL ακετονιτρίλιο +1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	SPE: 250 mg C18, 50mg PSA 300 mg MgSO ₄	UHPLC-Q- TOF/MS (ESI, HR- MRM)	C18 στήλη (150mm,2.1mm, 5 μm). Κινητή φάση : Μεθανόλη με 0.1% formic acid και 5mM ammonium acetate (A), νερό με 0.1% formic acid και 5 mM ammonium acetate	78.9- 109.4	< 12.4	0.28-1 (μg/Kg)	0.85-3 (μg/Kg)	2021	Tu &Yang , 2021
13	294 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Μπανάνες	10g	QuEChERS : 10 mL ακετονιτρίλιο +1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	dSPE: 150 mg PSA	LC- QTRAP MS/MS (ESI)	XDB C18 στήλη(2.1 × 150 mm, 3.5 μm) Κινητή φάση : A (5 mM ammonium formate in HPLC grade water with 0.1% formic acid) and B (5 mM ammonium formate in	70- 120	< 20	0.003	0.01	2021	Almutairi et al , 2021

							methanol)						
14	6 διαφορετικά πολικά φυτοφάρμακα	Ρόδια	10g	QuPPe: 1.5 g νερό, 50 μ L διάλυμα ILIS + 10 mL μεθανόλη	-	LC-MS/MS (Triple quadrupole, ESI ⁺ ESI ⁻)	Hypercarb TM porous graphitic carbon στήλη(2.1 \times 100 mm, 5 μ m) Κινητή φάση : A (water/methanol/a cetic acid, 94/5/1, v/v/v) και B (methanol/acetic acid, 99/1, v/v)	70- 120	< 20	-	-	2021	Gormez et al , 2021
15	43 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Φράουλες	10g	QuEChERS : 10 mL ακετονιτρίλιο +1 g NaCl + 4 g MgSO ₄	dSPE: 50 mg PSA + 50 mg C18 + 150 mg MgSO ₄	UPLC- MS/MS (triple quadrupole, ESI)	UPLC BEH C18 στήλη (2.1 mm \times 100 mm, 1.8 μ m). Κινητή φάση: Νερό (A) και 5 mM ammonium formate σε μεθανόλη (B)	70.1–119.6	<20	0.0001 - 0.002	\leq 0.005	2021	Wang et al., 2021
16	14 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Πορτοκάλια	10g	QuEChERS : 10 mL ακετονιτρίλιο +QuEChERS extraction salts	-	UPLC- MS/MS (QTrap. ESI ⁺)	C18 στήλη (50 mm \times 2 mm) Κινητή φάση : (A) Νερό κα 2 mM ammonium formate (B) μεθανόλη	84-99	< 20	0.000621 - 0.001578	0.0014 - 0.0052	2021	Ahmed et al , 2021
17	31 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Γκότζι μπερι	2g	QuEChERS : 10 mL ακετονιτρίλιο +1 g NaCl	SPE: 400 mg C18, 400 mg PSA, 45 mg GCB και 1200 mg MgSO ₄ .	UPLC- MS/MS (Triple quadrupole. ESI, MRM mode)	BEH C18 στήλη (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μ m) Κινητή φάση : Νερό και ακετονιτρίλιο	73.8- 111.5	< 10	0.5(μ g/Kg)	1(μ g/K g)	2022	Xing et al , 2022
18	287 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Μανταρίνια, πορτοκάλια, γκρέιπφρουτ	10g	QuEChERS : ακετονιτρίλιο +1.5 g NaOAc, 6 g MgSO ₄ (AOAC 2007.01 method kit)	dSPE: 150 mg MgSO ₄ και 25 mg PSA	LC-MS/MS (triple quadrupole, ESI ⁺ , ESI ⁻)	C18 στήλη (2.1mm,150 mm, 2.7 μ m). Κινητή φάση: (A) Νερό και 0.1% formic acid και 5	70.-120	<20	-	0.001- 0.01	2022	Yuan et al., 2022

							mM ammonium formate (B) 0.1% formic acid και 5 mM ammonium formate σε μεθανόλη.						
19	5 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Λωτοί	10g	QuEChERS : 10mL ακετονιτρίλιο + 1 g sodium citrate, 4 g MgSO ₄ , 0.5 g sodium citrate sesquihydrate και 1 g NaCl	SPE: 900 mg MgSO ₄ + 150 mg PSA.	HPLC-MS/MS (triple quadrupole, ESI)	C18 στήλη (4.6 x 150 mm, 3 μm). Κινητή φάση: (A) Νερό και 10 mM ammonium formate και 0.1% formic acid (B) ακετονιτρίλιο	87.6–102	<9.57	7x10 ⁻³ μg/Kg	1μg/Kg	2022	Sandín-España et al., 2022
20	74 διαφορετικά φυτοφάρμακα	Ρόδια	2g	QuEChERS (modified) : 20 mL ακετονιτρίλιο +1,5 g NaCl	SPE: 400 mg PSA και 1 g MgSO ₄ .	UPLC-MS/MS (Triple quadrupole. ESI, MRM mode)	BEH C18 στήλη (100 mm x 2.1 mm, 1.7 μm) Κινητή φάση : Νερό και ακετονιτρίλιο	70- 120	< 15	0.5(μg/Kg)	1(μg/Kg)	2022	Naik-Palavi et al, 2022

4.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με UHPLC-QTOF --MS/MS

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με το υβριδικό φασματόμετρο μάζας τετραπόλου-χρόνου πτήσης (LC-Q-TOF/MS) αποτελεί μία από τις πιο και αποτελεσματικές τεχνικές για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε δείγματα τροφίμων. Οι δυνατότητές και τα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνουν το ευρύ φάσμα m/z , τη γρήγορη διαλογή των αναλυτών-στόχων, την υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα των αναλυτών καθώς και τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών- στόχων, με ελαχιστοποίηση των ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων (Wang et al., 2013).

Στη συνέχεια, περιγράφονται οι μεθοδολογίες LC-Q-TOF/MS που ακολούθησαν οι ερευνητές από το 2015 και μετά για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με χρήση των τεχνικών εκχύλισης LLE και QuEChERS.

4.2.1 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική LLE σε συνδυασμό με UHPLC-QTOF -MS/MS

Οι Sivaperumal et al. (2017) πραγματοποίησαν τον προσδιορισμό 68 συνολικά φυτοφαρμάκων σε μήτρες φρούτων μάνγκο χρησιμοποιώντας την τεχνική της UHPLC-MS/MS. Για τη βελτίωση της μεθόδου ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων, τα οποία πρόκειται για πολικές ουσίες, οι ερευνητές επέλεξαν ως μέθοδο εκχύλισης την εκχύλιση υγρού- υγρού με διαλύτη ένα μίγμα ακετονιτριλίου/οξικού αιθυλεστέρα σε διαφορετικές αναλογίες ώστε να βρεθεί η ιδανική αναλογία με την οποία επιτυγχάνονται τα μεγαλύτερα ποσοστά ανάκτησης. Βρέθηκε πως το μίγμα 25:75 (v/v) ακετονιτριλίου και οξικού αιθυλεστέρα εκχύλισε όλα τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων με πολύ ικανοποιητικά ποσοστά ανάκτησης που κυμαίνονταν από 73-111% και αυτή ήταν η αναλογία που χρησιμοποιήθηκε στην προτεινόμενη μεθοδολογία, ενώ στη συνέχεια ακολούθησε ο καθαρισμός του δείγματος με την τεχνική της κατανεμημένης εκχύλισης στερεάς φάσης (dSPE).

Τα βήματα που ακολούθησαν οι ερευνητές για την εκχύλιση και τον καθαρισμό του δείγματος ήταν τα ακόλουθα:

- Ανάμιξη και ομογενοποίηση των αναλυτικών δειγμάτων
- Προσθήκη 5g ομογενοποιημένου δείγματος σε δοχείο πολυτετραφθοροαιθυλενίου μαζί με 10 ml μίγματος ακετονιτριλίου και οξικού αιθυλεστέρα 25:75 (v/v) και ανακίνηση επί 2 λεπτά
- Προσθήκη 500 mg NaCl και 1,5 g MgSO₄, ανακίνηση επί για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση
- Μεταφορά του εκχυλίσματος σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 200 mg PSA και 500 mg Na₂SO₄ και εξάτμιση στους 35 °C
- Διαλυτοποίηση των υπολειμμάτων σε 1 mL μεθανόλης

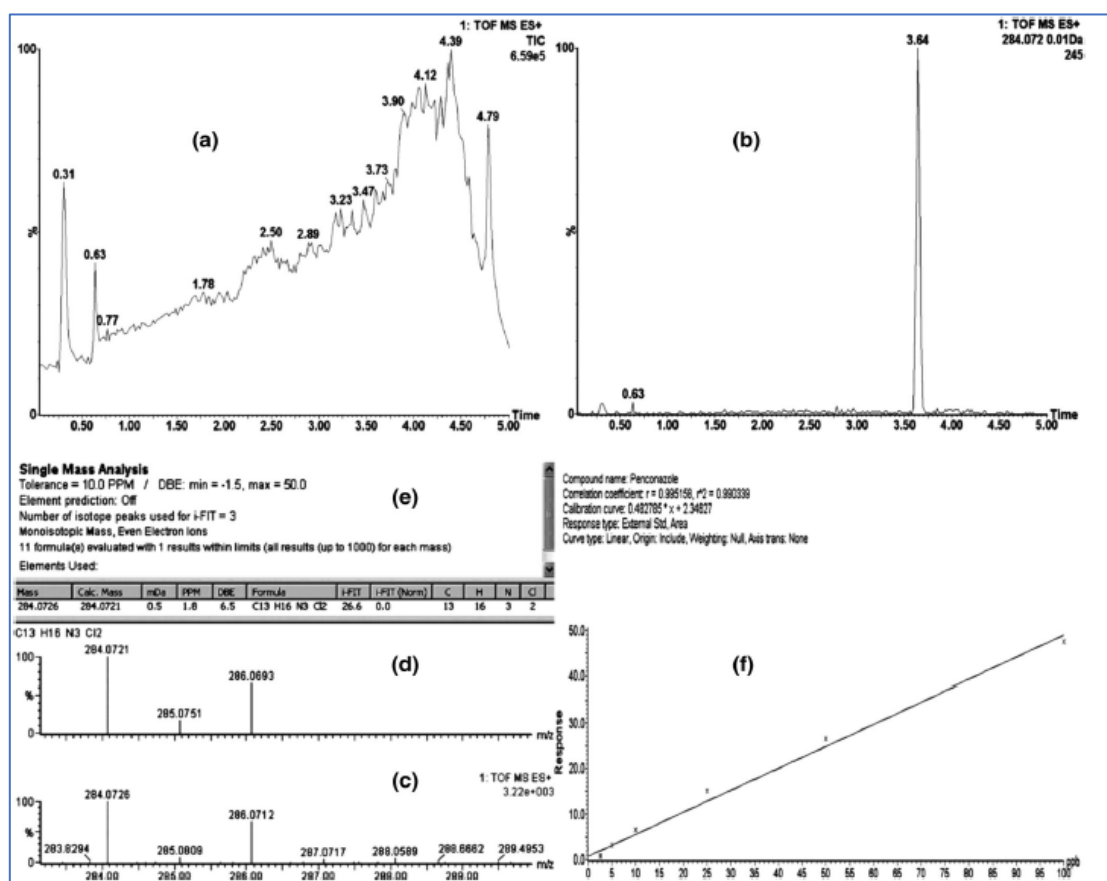
Στη συνέχεια, 10 μ L από το τελικό προϊόν της προκατεργασίας του δείγματος εγχύθηκαν στο αναλυτικό όργανο, δηλαδή στο συζευγμένο σύστημα UHPLC-Q-TOF/MS, το οποίο λειτούργησε με τη μέθοδο του θετικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+). Οι προδιαγραφές της χρωματογραφικής στήλης αναφέρονται στον πίνακα 4.1 (Sivaperumal et al., 2017).

Οι ερευνητές επικύρωσαν την προτεινόμενη μέθοδό τους τους σύμφωνα με τις οδηγίες της Ευρωπαϊκής Ένωσης (SANTE/11945/2015), προκειμένου να διαπιστωθεί η ακρίβεια της μεθόδου, η ανάκτηση, η γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης καθώς και οι επιδράσεις της μήτρας. Η επίδραση της μήτρας αξιολογήθηκε μέσω της προετοιμασίας προτύπων προσαρμοσμένων στη μήτρα (matrix matched), σε ακατέργαστο μάνγκο και εκχύλισμα χυμού. Το εμβαδόν κορυφής του χρωματογραφήματος του καθενός φυτοφαρμάκου στον διαλύτη συγκρίθηκε με το αντίστοιχο εμβαδόν κορυφής του matrix-matched προτύπου και η επίδραση της μήτρας (ME) υπολογίστηκε με τον ακόλουθο τύπο: $ME \% = (\text{Εμβαδόν κορυφής μετά την εκχύλιση} \times 100 / \text{εμβαδόν κορυφής του προτύπου διαλύτη})$.

Όταν το ME % είναι μεγαλύτερο του 100% υποδηλώνεται ενίσχυση του σήματος λόγω μήτρας, ενώ μια τιμή ME % <100% υποδηλώνει καταστολή του σήματος του αναλύτη

λόγω των παρεμποδίσεων της μήτρας. Σύμφωνα με τους Ferrer et al. (2011), μία διαφορά $\pm 20\%$ στο %ME θεωρείται ήπια παρεμπόδιση της μήτρας και είναι αποδεκτή. Τα αποτελέσματα της μελέτης των Sivaperumal et al. (2017) έδειξαν ισχυρές παρεμποδίσεις της μήτρας για τα περισσότερα φυτοφάρμακα και για το λόγο αυτό πραγματοποιήθηκε πολυεπίδεδη matrix-matched βαθμονόμηση με χρήση της τεχνικής διπλού εκνεφωτή, με την οποία εισάγονται ταυτόχρονα (μέσω ενός αυτοματοποιημένου βαθμονομημένου συστήματος παροχής) τόσο το δείγμα όσο και το αντίστοιχο πρότυπο αναφοράς.

Επιπρόσθετα, διαπιστώθηκε πως η μέθοδος των Sivaperumal et al. εμφανίζει πολύ καλή γραμμικότητα και ακρίβεια καθώς και ελαχιστοποιημένες επιδράσεις της μήτρας, ενώ τα LOD και LOQ κυμαίνονταν από 0,5 έως 7 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και από 2 έως 25 $\mu\text{g kg}^{-1}$, αντίστοιχα, επιβεβαιώνοντας πως η συγκεκριμένη αναλυτική μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε τακτικό επίπεδο για τον ποσοτικό προσδιορισμό των επιλεγμένων φυτοφαρμάκων σε υποστρώματα μάνγκο.



Εικόνα 4.1 Ποσοτικός προσδιορισμός φυτοφαρμάκων σε μάνγκο με την τεχνική UHPLC-Q-TOF/MS. α) Χρωματογράφημα ολικού ιόντος β) Χρωματογράφημα του φυτοφαρμάκου penconazole στα m/z 284.0721. γ) Φάσμα μάζας του penconazole δ) Φάσμα μάζας αναφοράς του penconazole ε) Στοιχειακή ανάλυση του penconazole ς) Καμπύλη βαθμονόμησης για το penconazole (Sivaperumal et al., 2017)

4.2.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική εκχύλισης QuEChERS σε συνδυασμό με UHPLC-QTOF - MS/MS

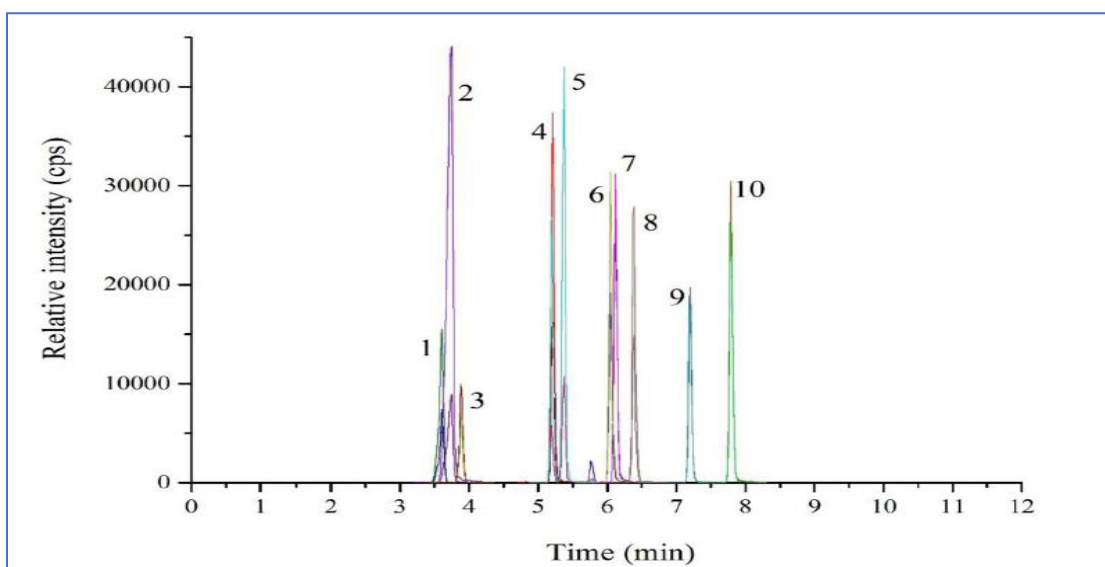
Οι Tu and Yang (2021) παρουσίασαν μία απλή, γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο για τον προσδιορισμό 10 φυτοφαρμάκων σε μήλα με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης σε σύζευξη με υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματογράφο μάζας τετραπόλου - χρόνου πτήσης HR-MRM, ενώ για την προετοιμασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος QuEChERS.

Αρχικά, οι ερευνητές πραγματοποίησαν μελέτη βελτιστοποίησης της εκχύλισης δοκιμάζοντας 3 διαφορετικούς διαλύτες, τον οξικό αιθυλεστέρα, την ακετόνη και το ακετονιτρίλιο. Ο οξικός αιθυλεστέρας έχει μικρότερη πολικότητα σε σχέση με την ακετόνη και οι ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων που επιτεύχθηκαν με τη χρήση του ως διαλύτη ήταν αρκετά χαμηλές της τάξης του 51-88%. Με τη χρήση της ακετόνης ως διαλύτη αυξήθηκαν οι ανακτήσεις στα επίπεδα του 55-92%, ωστόσο δεν παρατηρήθηκε βελτίωση στην ανάκτηση δύο φυτοφαρμάκων - του imidacloprid και του thiamethoxam - ενώ ταυτόχρονα τα εκχυλίσματα εμφάνιζαν σκούρο χρώμα. Εν τέλει, προτιμήθηκε η χρήση του ακετονιτρίλιου ως διαλύτη εκχύλισης με τον οποίον επιτεύχθηκαν ανακτήσεις της τάξης του 79-109% και ταυτόχρονα τα εκχυλίσματα που ελήφθησαν ήταν καθαρότερα σε σύγκριση με τα αντίστοιχα της χρήσης ακετόνης λόγω της ενδιάμεσης πολικότητας του ακετονιτρίλιου (Tu & Yang, 2021). Η μεθοδολογία της εκχύλισης που ακολούθησαν οι ερευνητές ήταν η εξής:

- Προσθήκη 10g ομογενοποιημένου δείγματος μήλων σε δοχείο μαζί με 10 ml ακετονιτρίλιο και ανακίνηση επί 1 λεπτό
- Προσθήκη 1 g NaCl and 4 g MgSO₄, ανακίνηση επί για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά
- Μεταφορά 2ml από το εκχύλισμα σε δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε 250 mg C₁₈, 50mg PSA και 300 mg MgSO₄ και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (dSPE καθαρισμός)

- Φιλτράρισμα του διηθήματος για έγχυση στο αναλυτικό όργανο UHPLC-Q-TOF/MS

Οι ερευνητές βελτιστοποίησαν την αναλυτική μέθοδο UHPLC-Q-TOF/MS πραγματοποιώντας δοκιμές για τις βέλτιστες συνθήκες χρωματογραφικής στήλης και κινητής φάσης και οι χρωματογραφικές συνθήκες που επελέγησαν αναφέρονται στον πίνακα 4.1. Για την ανάλυση Q-TOF/MS επιλέχθηκε η λειτουργία του θετικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI^+) με παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων υψηλής διακριτικής ικανότητας (HR-MRM). Οι μεταβάσεις HR-MRM βελτιστοποιήθηκαν επιλέγοντας ζεύγη πρόδρομων ιόντων/θραυσμάτων με την υψηλότερη ευαισθησία και εκλεκτικότητα.



Εικόνα 4.2 Χρωματογραφήματα των 10 φυτοφαρμάκων σε μήλα με την τεχνική UHPLC-Q-TOF/MS (1) thiamethoxam, (2) carbendazim, (3) imidacloprid, (4) diethofencarb, (5) dimethomorph, (6) pyraclostrobin, (7) phoxim, (8) trifloxystrobin, (9) chlorpyrifos, (10) pyridaben (Tu and Yang, 2021)

Για την επικύρωση της μεθόδου που ανέπτυξαν οι Tu & Yang (2021), πραγματοποιήθηκε αρχικά σύγκριση των χρωματογραφημάτων των αναλυτών σε διαλύτη με τα χρωματογραφήματα εκχυλισμάτων μήτρας ενισχυμένων με φυτοφάρμακα και η σύγκριση έδειξε πως δεν παρατηρούνται παρεμβολές μήτρας γεγονός που αποδεικνύει ότι η εκλεκτικότητα είναι αποδεκτή. Ωστόσο, για ορισμένες ενώσεις και κυρίως για τα πολικά

φυτοφάρμακα όπως το thiamethoxam παρατηρήθηκε μία μείωση στο αναλυτικό σήμα και ως εκ τούτου, πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση των καμπυλών με εξωτερικά πρότυπα που αντιστοιχούν στη μήτρα (matrix-matched) ώστε να αντισταθμιστούν οι επιδράσεις της μήτρας. Συνολικά, η μέθοδος των Tu & Yang (2021) χαρακτηρίστηκε από υψηλή ακρίβεια με όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης από 0,28 έως 1,0 $\mu\text{g/kg}$ και 0,85 έως 3,0 $\mu\text{g/kg}$, αντίστοιχα.

Συνεχίζοντας, οι Yang et al. (2018) πραγματοποίησαν την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 50 φυτοφαρμάκων σε μικρά τροπικά φρούτα με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης σε σύζευξη με υβριδική φασματομετρία μάζας τετράπολου - χρόνου πτήσης (UPLC-QTOF-MS). Για την εκχύλιση των δειγμάτων, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μία τροποποιημένη μέθοδο QuEChERS και καθαρισμό με dSPE, πετυχαίνοντας ικανοποιητικές ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων από 63 έως 119%. Τα βήματα της διαδικασίας προκατεργασίας των δειγμάτων ήταν τα ακόλουθα:

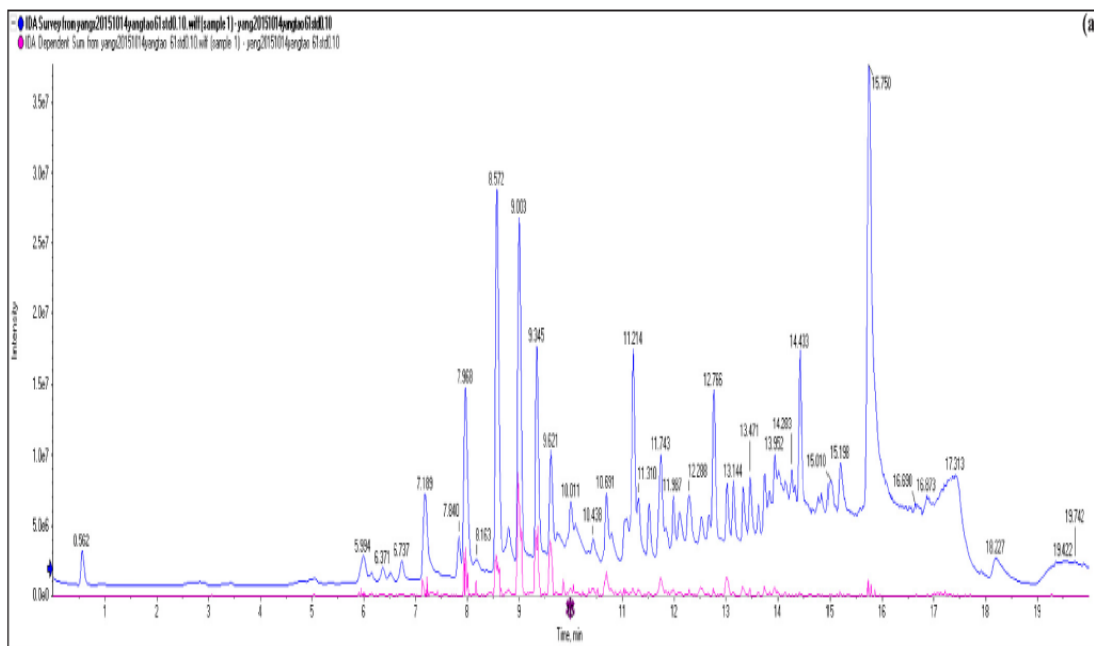
- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένου δείγματος φρούτων σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 10 mL ακετονιτρίλιο
- Προσθήκη 2.5 g NaCl στο μείγμα και φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές ανά λεπτό για 2 λεπτά.
- Μεταφορά 5ml του υπερκειμένου σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, προσθήκη 0,25 g PSA και 0,75 g MgSO₄ και φυγοκέντρωση για 2 λεπτά (dSPE καθαρισμός)

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με UPLC/QTOF-MS, όπου οι χρωματογραφικές συνθήκες βελτιστοποιήθηκαν ώστε να επιτευχθεί καλός διαχωρισμός και εν τέλει ως κινητή φάση επιλέχθηκε ένα υδατικό διάλυμα 1 mM οξικού αμμωνίου (φάση A) και ένα υδατικό διάλυμα 1mM μεθανόλης (φάση B), πετυχαίνοντας ικανοποιητικό χρωματογραφικό διαχωρισμό σε χρονικό διάστημα 20 λεπτών. Η ανάλυση TOF/MS πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία θετικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+) και τα φυτοφάρμακα ταυτοποιήθηκαν με τις ακριβείς μετρήσεις μάζας των

πρωτονιωμένων μορίων ($[M+H]^+$) και των κύριων θραυσμάτων, ανάλυση ισοτοπικού προτύπου και ταυτοποίηση μέσω των χρόνων κατακράτησης των ουσιών.

Όσον αφορά στις επιδράσεις της μήτρας, καθώς είναι δυνατόν να προκαλέσουν την ενίσχυση ή την καταστολή του ιονισμού των αναλυτών και να επηρεάσουν την ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού όταν χρησιμοποιούνται συστήματα TOF/MS (Botero-Coy et al., 2012), οι ερευνητές πραγματοποίησαν βαθμονόμηση με βάση τη μήτρα (matrix-matched). Συγκεκριμένα, για την προετοιμασία των matrix-matched προτύπων, χρησιμοποιήθηκαν τυφλά εκχυλίσματα των φρούτων τα οποία εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιήθηκαν σε πρότυπο διάλυμα των 50 φυτοφαρμάκων σε εύρος συγκεντρώσεων 10–200 ng/mL.

Τα LOD και LOQ της μεθόδου των Yang et al. (2018) ήταν στο εύρος 0,03–4 µg/kg και 0,1–12 µg/kg αντίστοιχα και θεωρούνται ικανοποιητικά καθώς σε σύγκριση με τα γενικά MRL που έχουν τεθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (0,01–10 mg/kg) (EU, 2012), όλα τα LOQ που προέκυψαν είναι σε χαμηλότερα επίπεδα. Συνολικά, η μέθοδος των Yang et al. (2018) εμφάνισε ικανοποιητικά αποτελέσματα όσον αφορά στην ευαισθησία για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλαπλών υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε μικρά τροπικά φρούτα.



Εικόνα 4.3 Χρωματογράφημα ολικού ιόντος εκχυλίσματος starfruit εμβολιασμένου με τα 50 υπό μελέτη φυτοφάρμακα (50–100 ng/mL) (Yang et al., 2018)

Την ίδια ακριβώς μεθοδολογία που περιγράφηκε από τους Yang et al. (2018) ακολούθησαν τρία χρόνια αργότερα οι Zhang et al. (2021) για τον πολύ-υπολειμματικό προσδιορισμό 284 φυτοφαρμάκων σε σταφύλια, πεπόνια, καρπούζια, ροδάκινα και φράουλες στη Σανγκάη με χρήση υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης σε σύζευξη με υβριδική φασματομετρία μάζας τετράπολου - χρόνου πτήσης (UPLC-QTOF-MS). Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των φυτοφαρμάκων ήταν ικανοποιητικά με τιμές 0.6–10 και 2–30 µg/kg αντίστοιχα, ενώ η ανάκτηση των φυτοφαρμάκων ήταν στο εύρος 70-120%, δηλαδή αποδεκτή σύμφωνα με τις οδηγίες SANTE, γεγονός που δείχνει πως η συγκεκριμένη μεθοδολογία μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα. Ωστόσο, παρά το γεγονός ότι οι επιδράσεις της μήτρας βρέθηκαν να είναι σε αποδεκτά πλαίσια μεταξύ –20% και 20% (Ferrer et al., 2011), οι Zhang et al. (2021) διαπίστωσαν πως οι επιδράσεις της μήτρας οδηγούν σε ήπια καταστολή του αναλυτικού σήματος, όπως ακριβώς διαπίστωσαν και οι Yang et al. (2018) και για το λόγο αυτό η βαθμονόμηση με πρότυπα με βάση τη μήτρα (matrix-matched) είναι απαραίτητη για τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων σε φρούτα με UPLC-QTOF-MS.

4.3 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με UHPLC-QTRAP- MS/MS

Ο υβριδικός αναλυτής μάζας QTRAP συνδυάζει τις δυνατότητες ενός φασματογράφου μάζας τριπλού τετραπόλου μαζί με την τεχνολογία παγίδας ιόντων σε μια ενιαία πλατφόρμα. Κατά την τεχνολογία αυτή, το στάδιο κατακερματισμού επιτυγχάνεται μέσω της επιτάχυνσης των ιόντων στην κυψέλη σύγκρουσης και εν συνεχεία με την παγίδευση των ιόντων και πραγματοποίηση της ανάλυσης μάζας στη γραμμική παγίδα ιόντων Q, πραγματοποιώντας ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς με ελαχιστοποίηση των παρεμβολών από τη μήτρα, αυξάνοντας την εκλεκτικότητα των μεθόδων ανάλυσης σε σχέση με την τεχνολογία τριπλού τετραπόλου. (Hager και Le Blanc, 2003).

Οι Malhat et al. (2019) πραγματοποίησαν μία μελέτη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων ενός φυτοφαρμάκου που ανήκει στην κατηγορία των μυκητοκτόνων, της

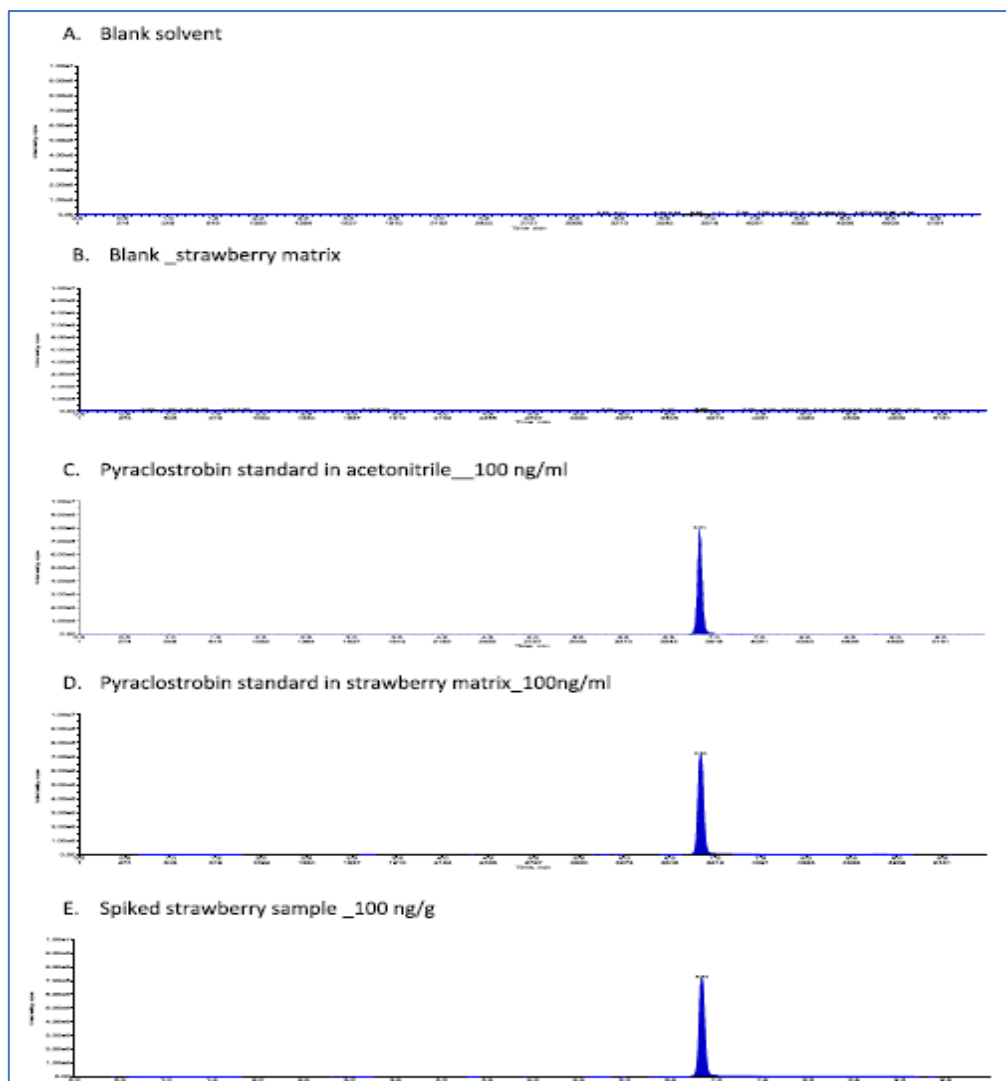
πυρακλοστροβίνης, σε φράουλες στην Αίγυπτο. Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την τεχνολογία της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας σε σειρά και αναλυτή μαζών QTRAP, επιτυγχάνοντας πολύ χαμηλά όρια ποσοτικού προσδιορισμού και πολύ καλές ανακτήσεις.

Για την εκχύλιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος QuEChERS, με προσθήκη 10ml ακετονιτριλίου, 1g NaCl, 1g κιτρικού τρισθενούς νατρίου και 0,5 g κιτρικού δινατρίου σε 10g ομογενοποιημένου δείγματος φραουλών, χωρίς να απαιτηθεί περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος.

Η ανάλυση LC-MS/MS πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ενός Exion HPLC με στήλη C18 και κινητή φάση διάλυμα 10mM μυρμηκικό αμμώνιο σε νερό/μεθανόλη 90:10 (φάση A) και μεθανόλη (φάση B), συνδεδεμένο με φασματογράφο μάζας QTRAP. Η ανάλυση MS/MS πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία θετικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+) με παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) ως λειτουργία σάρωσης. Ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 2 μ l, ενώ ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης της ανάλυσης ήταν 10 λεπτά.

Οι ερευνητές επικύρωσαν τη μέθοδό τους σύμφωνα με τις οδηγίες SANTE (SANTE, 2017). Το LOQ ορίστηκε ως το χαμηλότερο επίπεδο εμπλουτισμού που δοκιμάστηκε με επιτυχία και βρέθηκε ίσο με 0.001mg/kg, το οποίο θεωρείται ικανοποιητικό καθώς είναι χαμηλότερο από το MRL που έχει τεθεί για την πυρακλοστροβίνη σε φράουλα (1.5mg/kg) (FAOSTAT, 2018). Η ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου των Malhat et al. (2019) προσδιορίστηκε μέσω πειραμάτων ανάκτησης και οι ανακτήσεις που βρέθηκαν κυμαίνονταν μεταξύ 97 και 104 %, ενώ το RSD για όλα τα επίπεδα εμπλουτισμού ήταν κάτω από 6%. Τα νούμερα αυτά κρίνονται ιδιαίτερα ικανοποιητικά καθώς βρίσκονται εντός των ορίων που έχουν τεθεί στις οδηγίες SANTE , δηλαδή εύρος ανακτήσεων 70-120% και RSD μικρότερο του 20% (SANTE, 2017). Για τις επιδράσεις της μήτρας πραγματοποιήθηκε σύγκριση των κλίσεων των καμπυλών βαθμονόμησης των αναλυτών σε διαλύτη και σε μήτρα φράουλας και δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές, με το υπολογιζόμενο ποσοστό επίδρασης μήτρας να ανέρχεται στο 12,2%, υποδεικνύοντας ότι η μήτρα φράουλας δεν ενίσχυσε σε σημαντικό βαθμό την απόκριση του σήματος της πυρακλοστροβίνης. Ωστόσο, για να επιτευχθούν πιο έγκυρα αποτελέσματα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν καμπύλες βαθμονόμησης προσαρμοσμένες στη μήτρα (matrix-matched)

για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων της πυρακλοστροβίνης στις φράουλες (Malhat et al., 2019).



Εικόνα 4.4 LC-MS/MS χρωματογραφήματα της πυρακλοστροβίνης σε φράουλες (Α) Τυφλό διάλυμα διαλύτη (Β) Τυφλό δείγμα φράουλας (C) Πρότυπο πυρακλοστροβίνης σε ακετονιτρίλιο (100 ng/ml), (D) Πρότυπο πυρακλοστροβίνης σε μήτρα φράουλας (100 µg/kg) (E) Εμβολιασμένο δείγμα φράουλας με πυρακλοστροβίνη (100 µg/kg) (Malhat et al., 2019)

Οι Ge et al. (2020) πραγματοποίησαν μία μελέτη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων του φυτοφαρμάκου Nitenpyram σε ακτινίδια, με χρήση της τεχνολογίας της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας σε σειρά και αναλυτή μαζών QTRAP, καθώς λόγω της χαμηλής πτητικότητας και υψηλής πολικότητας του

συγκεκριμένου φυτοφαρμάκου δεν συνίσταται η χρήση άλλων μεθόδων, όπως για παράδειγμα η αέρια χρωματογραφία.

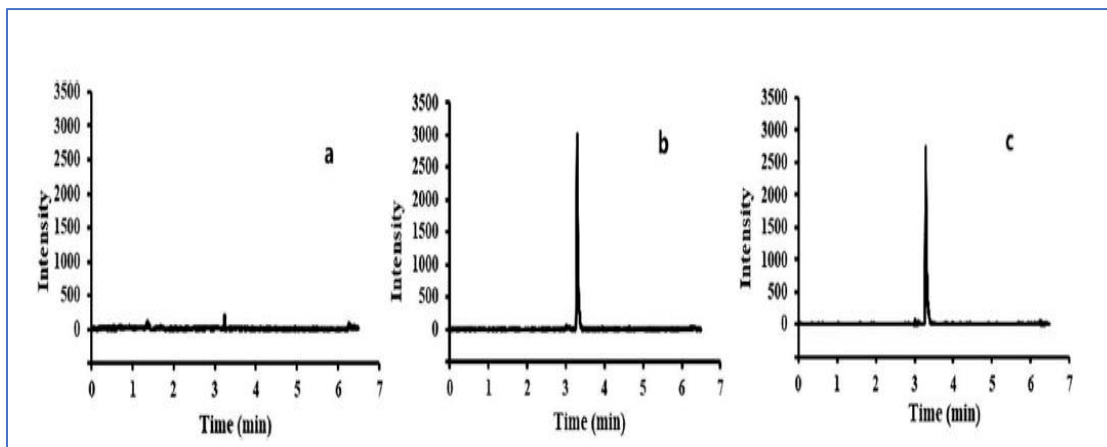
Για την εκχύλιση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε μία παραλλαγή της μεθόδου QuEChERS, με προσθήκη 20ml ακετονιτρίλιου, 1.5 g NaCl και 4 g MgSO₄, σε 10g ομογενοποιημένου δείγματος ακτινιδίων και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε περαιτέρω καθαρισμός του εκχυλίσματος με την τεχνική dSPE με την προσθήκη 50 mg PSA, 50 mg C18 και 50 mg GCB.

Η ανάλυση του nitenpyram πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του αναλυτικού συστήματος AB Sciex 4000 QTrap LC-MS/MS εξοπλισμένο με πηγή ιόντων ESI. Χρησιμοποιήθηκε στήλη C18 και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επετεύχθη με βαθμιαία έκλουση της κινητής φάσης, η οποία αποτελούνταν από υπερκάθαρο νερό με μυρμηκικό οξύ 0.1% (φάση A) και ακετονιτρίλιο (φάση B). Η ανάλυση MS/MS πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία θετικού ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI+) με παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) ως λειτουργία σάρωσης. Ο όγκος έγχυσης του δείγματος ήταν 2 μl, ενώ ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης της ανάλυσης ήταν 6.5 λεπτά.

Οι ερευνητές επικύρωσαν τη μέθοδό τους σύμφωνα με τις οδηγίες SANTE (SANTE, 2017). Το LOQ ορίστηκε ως το χαμηλότερο επίπεδο εμπλουτισμού που δοκιμάστηκε με επιτυχία και βρέθηκε ίσο με 0.01mg/kg, ενώ το LOD υπολογίστηκε με βάση το σήμα/θόρυβος =3 και βρέθηκε ίσο με 0.0006 mg/kg. Η ακρίβεια της αναλυτικής μεθόδου των Ge et al. (2020) προσδιορίστηκε μέσω πειραμάτων ανάκτησης σε διάφορα επίπεδα εμπλουτισμού για το nitenpyram (0.01, 0.10, 1.0 και 4.5 mg/kg) και βρέθηκε εντός των ορίων που έχουν τεθεί στις οδηγίες SANTE, με ανακτήσεις που κυμαίνονταν μεταξύ 71.96–96.67 % και με επίσης ικανοποιητικά RSDs χαμηλότερα του 10%.

Καθώς τα οργανικά οξέα και τα σάκχαρα που περιέχονται στα ακτινίδια είναι δυνατόν να έχουν επίδραση στην ανάλυση των υπολειμμάτων του nitenpyram (Qi et al. 2015), οι ερευνητές πραγματοποίησαν σύγκριση της κλίσης των καμπυλών βαθμονόμησης των αναλυτών σε διαλύτη και σε μήτρα φράουλας ώστε να προσδιορίσουν το ποσοστό επιδράσεων της μήτρας. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως δεν υπήρχαν παρεμποδίσεις της μήτρας του ακτινιδίου στην ανάλυση του nitenpyram, γεγονός που καταδεικνύει την καταλληλότητα της μεθοδολογίας προκατεργασίας του δείγματος των ακτινιδίων και της

αναλυτική τεχνικής HPLC- QTRAP- MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων του nitenpyram σε ακτινίδια (Ge et al., 2020).



Εικόνα 4.5 Χρωματογραφήματα LC-MS/MS του nitenpyram σε ακτινίδια: (a) Τυφλό δείγμα ακτινιδίου (b)Πρότυπο διάλυμα nitenpyram προσαρμοσμένο σε μήτρα ακτινιδίου (0.005 mg/L (c) Δείγμα ακτινιδίου εμβολιασμένου με nitenpyram σε συγκέντρωση 0.01 mg/kg (Ge et al., 2020)

Τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε μπανάνες εισαγόμενες στη Σαουδική Αραβία από το Εκουαδόρ και τις Φιλιππίνες ερευνήθηκαν από τους Almutairi et al. (2021). Συγκεκριμένα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τη συμβατική μέθοδο QuEChERS (European Standard Method EN 15662) για την εκχύλιση 294 διαφορετικών φυτοφαρμάκων σε μπανάνες, ενώ η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση LC-QTRAP-MS/MS. Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένου δείγματος μπανανών σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 10 mL ακετονιτρίλιο
- Προσθήκη 4 g MgSO₄ + 1 g NaCl στο μείγμα και φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές ανά λεπτό για 5 λεπτά.
- Μεταφορά 6ml του υπερκειμένου σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, προσθήκη 150mg PSA και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά (dSPE καθαρισμός)
- Φιλτράρισμα του διηθήματος και προσθήκη 10 μl διαλύματος μυρμηκικού οξέος 5% για βελτίωση της σταθερότητας.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων με έγχυση 5μl του δείγματος που προέκυψε από την προκατεργασία στο σύστημα LC- QTRAP- MS/MS, οι χρωματογραφικές συνθήκες του οποίου αναφέρονται στον πίνακα 4.1, ενώ για την ανίχνευση MS/MS χρησιμοποιήθηκε ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό σε θετική ESI+ και αρνητική λειτουργία ESI-. Οι μέσες τιμές ανάκτησης των φυτοφαρμάκων ήταν αποδεκτές και κυμαίνονταν μεταξύ 70 και 120%, ενώ τα LOD και LOQ της μεθόδου ήταν 0.003mg/kg και 0.01mg/kg αντίστοιχα.

Συνολικά, ανιχνεύθηκαν εννέα φυτοφάρμακα εκ των οποίων τα azoxystrobin, carbendazim, chlorpyrifos, imazalil και thiabendazole ήταν τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα στις μπανάνες και από τις δύο χώρες, ενώ τα επίπεδα των φυτοφαρμάκων βρέθηκαν να είναι χαμηλότερα από τα ανώτατα όρια που έχουν τεθεί από την Αρχή Τροφίμων και Φαρμάκων της Σαουδικής Αραβίας (Almutairi et al., 2021).

Πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα από τη χρήση LC-TRAP-MS/MS, αναφέρουν στη μελέτη τους και οι Ahmed et al. (2021). Οι ερευνητές πραγματοποίησαν την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων 14 φυτοφαρμάκων σε πορτοκάλια στην Αίγυπτο, χρησιμοποιώντας ως μέθοδο εκχύλισης την QuEChERS με χρήση 10ml ακετονιτριλίου και εμπορικά διαθέσιμων αλάτων εκχύλισης QuEChERS σε έτοιμο κιτ για κάθε δείγμα 10g πορτοκαλιού, ενώ δεν απαιτήθηκε περαιτέρω καθαρισμός των δειγμάτων.

Για το χρωματογραφικό διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκε το σύστημα UPLC-MS/MS 6500 QTRAP με στήλη C18 και κινητή φάση 2 mM μυρμηκικό αμμώνιο σε νερό (A) και μεθανόλη (B), ενώ ο τρόπος ιονισμού στο MS/MS ήταν ο θετικός ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI+). Οι ερευνητές επικυρώνοντας τη μέθοδό τους, βρήκαν πως το LOD κυμαίνονταν από 0,000621 έως 0,001578 mg/kg και το LOQ κυμάνθηκε από 0,00141 έως 0,00526 mg/kg, μικρότερο των MRL που έχουν τεθεί για τα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα στα πορτοκάλια. Επιπρόσθετα, οι μέσες ανακτήσεις βρέθηκαν εντός του αποδεκτού εύρους των 70-120% και συγκεκριμένα ήταν 84-99 %, ενώ το RSD κρίθηκε επίσης αποδεκτό καθώς ήταν μικρότερο του 20%, γεγονός που καταδεικνύει την καταλληλότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε πορτοκάλια (Ahmed et al., 2021).

4.4 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με UHPLC-MS/MS τριπλού τετράπολου (TQD UHPLC-MS/MS)

Με την τεχνική MS/MS τριπλού τετράπολου (TQD) σε λειτουργία πολλαπλών μεταπτώσεων MRM επιτυγχάνεται, μειωμένη επίδραση του υποστρώματος, καλή ευαισθησία και αυξημένη εκλεκτικότητα για τους αναλύτες, ενώ δύο μεταπτώσεις ανά ουσία είναι αρκετές για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών (Μηλιάδης, n.d.). Η τεχνική αυτή σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία έχει χρησιμοποιηθεί σε πολλές μελέτες για τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα, χρησιμοποιώντας ως τεχνικές εκχύλισης κυρίως τη μέθοδο QuEChERS, αλλά και άλλες τεχνικές όπως η διασπορά στερεάς φάσης (MSPD) και η Quick Polar Pesticides (QuPPE). Οι πλέον πρόσφατες (από το 2015 και έπειτα) από αυτές τις μελέτες αναλύονται στη συνέχεια.

4.4.1 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική εκχύλισης MSPD σε συνδυασμό με TQD UHPLC -MS/MS

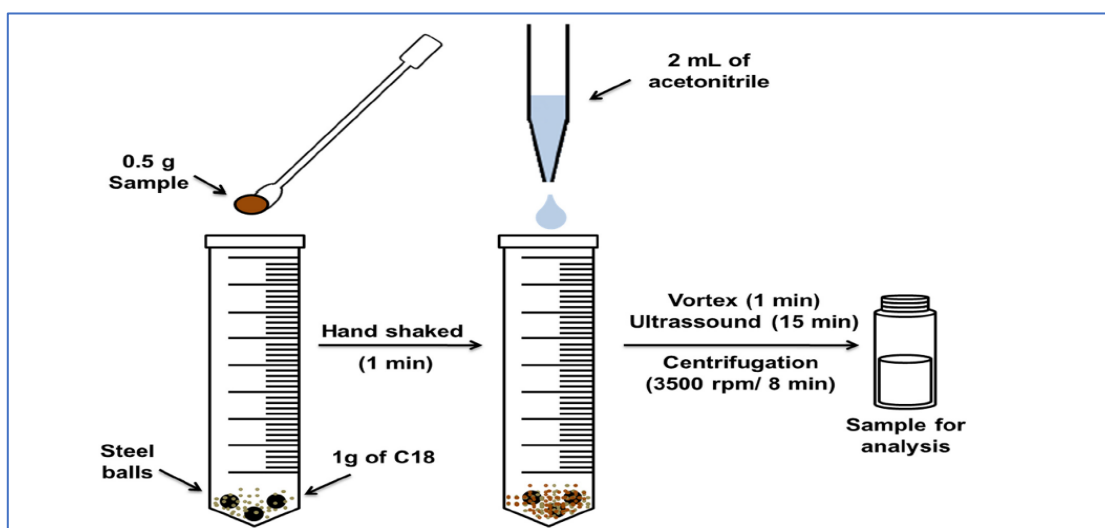
Οι Kemmerich et al. (2020), πραγματοποίησαν στη μελέτη τους την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων από 133 επιλεγμένα φυτοφάρμακα σε υποστρώματα φρούτων όπως τα μήλα, τα ροδάκινα, τα δαμάσκηνα και τα αχλάδια με τη χρήση της τεχνικής UHPLC-MS/MS με τριπλό τετράπολο. Για την προετοιμασία των δειγμάτων πρότειναν μία νέα τεχνική που αποτελεί παραλλαγή της συμβατικής τεχνικής MSPD και ονομάζεται διασπορά στερεάς φάσης με μπάλες σε σωλήνα (BiT-MSPD), κατά την οποία όλη η προετοιμασία του δείγματος πραγματοποιείται απευθείας σε κλειστό σωλήνα εκχύλισης με τη βοήθεια χαλύβδινων σφαιρών. Η προτεινόμενη από τους ερευνητές διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων έχει ως εξής:

- Προσθήκη 0,5g δείγματος σε σωλήνα 50 ml, ακολουθούμενη από την προσθήκη 1g απορροφητικού C18 και 3 χαλύβδινων σφαιρών
- Ανακίνηση του σωλήνα για 1 λεπτό χειροκίνητα και προσθήκη 2 mL ακετονιτριλίου. Προσθήκη ατραζίνης πριν από την εκχύλιση, ως υποκατάστατο πρότυπο σε ποσότητα 10 µg kg⁻¹ και τοποθέτηση του σωλήνα σε λουτρό

υπερήχων για 15 λεπτά πριν τη φυγοκέντρωση

- Φιλτράρισμα του εκχυλίσματος με φίλτρο σύριγγας από νάilon 0,2 μm και αραιώση 1:1 με υπερκάθαρο νερό
- Προσθήκη τριφαινυλοφωσφορικού ως εσωτερικό πρότυπο για τελική συγκέντρωση 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ πριν από την έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα.

Για την ανάλυση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Waters Acquity UPLC (στον πίνακα 4.1 αναφέρονται οι προδιαγραφές της χρωματογραφικής στήλης) σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας τριπλού τετράπολου εξοπλισμένου με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI), ενώ ως τεχνική ανάλυσης επιλέχθηκε η παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (SRM), όπου επιλέχθηκε το πιο άφθονο ιόν (1η μετάβαση) για ποσοτικοποίηση και η 2η πιο έντονη μετάβαση για την ταυτοποίηση των ουσιών.

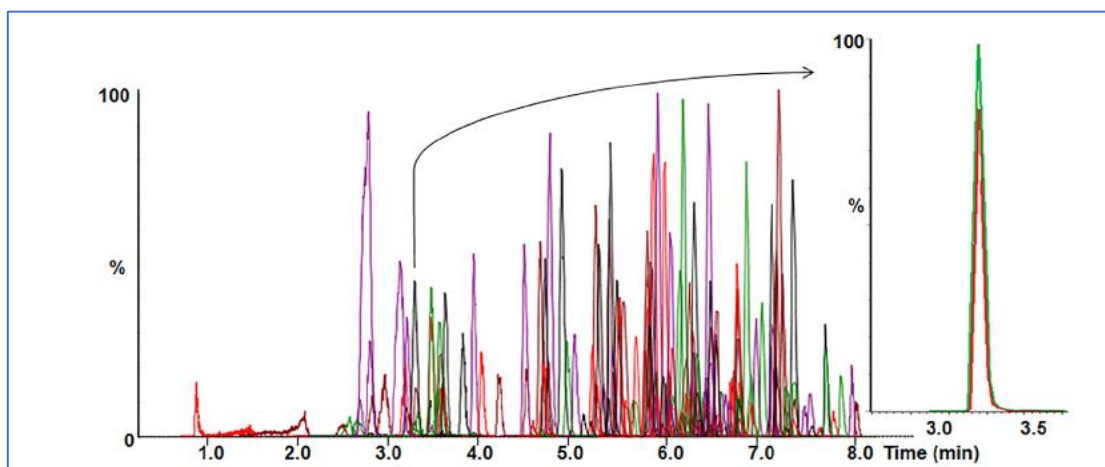


Εικόνα 4.6 Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου εκχύλισης BiT-MSPD για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα (Kemmerich et al., 2020)

Η επίδραση της μήτρας εκτιμήθηκε μέσω της σύγκρισης των κλίσεων των καμπυλών βαθμονόμησης που παρασκευάστηκαν με διάλυση των αναλυτών σε τυφλό εκχύλισμα μήτρας φρούτων και σε καθαρό διαλύτη (ακετονιτρίλιο), θεωρώντας ότι η επίδραση της μήτρας είναι σημαντική όταν υπερβαίνει το $\pm 20\%$ (Ferrer et al., 2011). Οι αρνητικές και θετικές τιμές που λαμβάνονται για την επίδραση της μήτρας είναι συνέπεια του

φαινομένου της καταστολής και της ενίσχυσης αντίστοιχα των ιόντων που προκαλείται από ενώσεις που παρεμβάλλονται στη μήτρα, οι οποίες συνυπάρχουν με τις ενώσεις-στόχους και ανταγωνίζονται για τον ιονισμό. Στη μελέτη των Kemmerich et al. (2020), η επίδραση της μήτρας εμφανίστηκε σημαντική για ορισμένα φυτοφάρμακα, όπως για παράδειγμα το chlorpyrifos σε αχλάδι, μήλο και ροδάκινο.

Η μέθοδος των ερευνητών επικυρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες SANTE και διαπιστώθηκε πως εμφανίζει υψηλή ακρίβεια και ορθότητα για τα φυτοφάρμακα που αναλύθηκαν με τα ποσοστά ανάκτησης να κυμαίνονται από 72 έως 113%. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) για τις υπό μελέτη ενώσεις ήταν 3 και 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$, αντίστοιχα, ενώ σύμφωνα με τους Kemmerich et al., η μέθοδος που ανέπτυξαν είναι απλούστερη και ταχύτερη στην εκτέλεση από την συμβατική MSPD, δεδομένου ότι η εκχύλιση και ο καθαρισμός πραγματοποιούνται στον ίδιο σωλήνα χωρίς να υπάρχει η ανάγκη μεταφοράς σε φυσίγγια ή άλλους αποδέκτες και χωρίς την ανάγκη χρήσης ξεχωριστού περαιτέρω σταδίου καθαρισμού.



Εικόνα 4.7 Χρωματογραφήματα πρότυπου διαλύματος που αντιστοιχεί σε μήτρα αχλαδιού στα 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ και σύγκριση μεταξύ του σήματος για τη θειαβενδαζόλη ενός πρότυπου διαλύματος (20 $\mu\text{g L}^{-1}$, πράσινη γραμμή) και ενός δείγματος αχλαδιού (150 $\mu\text{g kg}^{-1}$, κόκκινη γραμμή) (Kemmerich et al., 2020)

Στα συμπεράσματα της μελέτης τους, οι ερευνητές σημειώνουν πως η συγκεκριμένη αναλυτική τεχνική BiT-MSPD είναι συγκρίσιμη σε απόδοση με τις περισσότερες από τις υπάρχουσες μεθόδους QuEChERS, ενώ επίσης έχει ως πλεονέκτημα την πολύ χαμηλή κατανάλωση οργανικού διαλύτη σε σχέση με άλλες μεθόδους εκχύλισης και συνολικά χαμηλότερο κόστος και λιγότερα στάδια ανάλυσης. Ωστόσο, λόγω των σημαντικών

επιδράσεων της μήτρας στο αναλυτικό σήμα ορισμένων φυτοφαρμάκων, είναι απαραίτητη η δημιουργία καμπυλών βαθμονόμησης προσαρμοσμένων στη μήτρα.

4.4.2 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική εκχύλισης QuPPE σε συνδυασμό με TQD HPLC -MS/MS

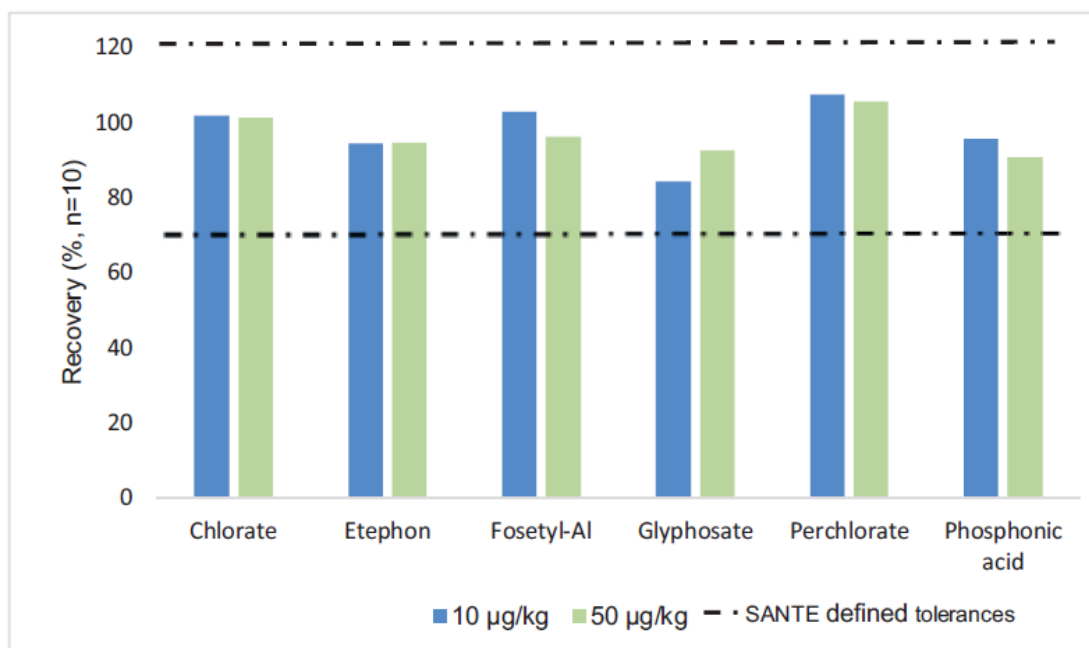
Οι Gomez et al. (2021) σχεδίασαν μία μελέτη για τον ποσοτικό προσδιορισμό 6 υψηλά πολικών φυτοφαρμάκων σε δείγματα ροδιού στην Τουρκία, τα οποία αναλύθηκαν με TQD HPLC -MS/MS, ενώ η εκχύλιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Quick Polar Pesticides (QuPPE). Η QuPPE αποτελεί μία μέθοδο η οποία επιτρέπει την ταυτόχρονη εκχύλιση μεγάλου αριθμού υψηλά πολικών φυτοφαρμάκων που δεν επιδέχονται τις συνήθεις μεθόδους εκχύλισης πολλαπλών υπολειμμάτων, όπως για παράδειγμα η QuEChERS, χρησιμοποιώντας οξινομένη μεθανόλη χωρίς να απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος και η πραγματοποίηση της εκχύλισης γίνεται σύμφωνα με τη διαδικασία EURL-SRM (Anastassiades et al., 2017) . Συγκεκριμένα, η διαδικασία της εκχύλισης που ακολούθησαν οι Gomez et al. (2021) ήταν η εξής:

- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένων δειγμάτων ροδιού σε σωλήνες φυγοκέντρησης μαζί με 1,5 g νερού και 50 µl διαλύματος ILIS 40 µg/ml (Isotopically labelled internal standards)
- Προσθήκη 10 mL μεθανόλης που περιείχε 1% μυρμηκικό οξύ, ανακίνηση για 2 λεπτά και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά
- Φιλτράρισμα 1ml από το υπερκείμενο πριν από την έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα.

Για την ανάλυση των υπολειμμάτων των 6 πολικών φυτοφαρμάκων χρησιμοποιήθηκε το σύστημα Agilent HPLC 1290 (στον πίνακα 4.1 αναφέρονται οι προδιαγραφές της χρωματογραφικής στήλης) σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας τριπλού τετράπολου εξοπλισμένου με πηγή ιονισμού ηλεκτροψεκασμού (ESI) σε λειτουργία αρνητισμού

ιονισμού, ενώ ως τεχνική ανάλυσης επιλέχθηκε η παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (MRM), με τουλάχιστον δύο μεταβάσεις ιόντων για κάθε αναλυόμενη ουσία.

Η επικύρωση της μεθόδου QuPRe πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις κατευθυντήριες οδηγίες SANTE/12682/2019 (SANTE, 2019) . Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των πολικών φυτοφαρμάκων στα ρόδια εφαρμόστηκε γραμμική βαθμονόμηση, ενώ επίσης πραγματοποιήθηκε matrix-matched βαθμονόμηση για την αποφυγή παρεμβάσεων της μήτρας στο αναλυτικό σήμα. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν διαλύματα προτύπων φυτοφαρμάκων προσαρμοσμένων στη μήτρα σε έξι διαφορετικές συγκεντρώσεις 5, 10, 25, 50, 100 και 250 $\mu\text{g/kg}$ σε μήτρες ροδιού. Το LOQ της μεθόδου προσδιορίστηκε μέσω της τυπικής απόκλισης τυφλών δειγμάτων ροδιού εμπλουτισμένων με χαμηλές συγκεντρώσεις των στοχευμένων πολικών αναλυτών που μπορούν να ποσοτικοποιηθούν με ακρίβεια σε εύρος 70-120% και RSD μικρότερο του 20% όπως αναφέρουν οι οδηγίες SANTE και βρέθηκε πως ήταν χαμηλότερο από τα MRL που έχουν τεθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα συγκεκριμένα φυτοφάρμακα. Συνολικά, η μέθοδος των Gomez et al. (2021) επιδεικνύει πολύ καλά αποτελέσματα απόδοσης με τιμές ανάκτησης εντός των επιτρεπτών ορίων 70-120%.



Εικόνα 4.8 Ανάκτηση (%) των 6 πολικών φυτοφαρμάκων στα ρόδια για επίπεδα εμβολιασμού στα 10 και τα 50 $\mu\text{g/kg}$. Με τις διακεκομμένες γραμμές εμφανίζεται το αποδεκτό εύρος ανάκτησης σύμφωνα με τις οδηγίες SANTE/12682/2019 (Gomez et al., 2021)

4.4.3 Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα με την τεχνική εκχύλισης QuEChERS σε συνδυασμό με TQD UHPLC - MS/MS

Η τεχνική QuEChERS αποτελεί την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδο εκχύλισης για την προκατεργασία δειγμάτων φρούτων για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με τη μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης σε σύζευξη με τη φασματογραφία μάζας σε σειρά με τριπλό τετράπολο.

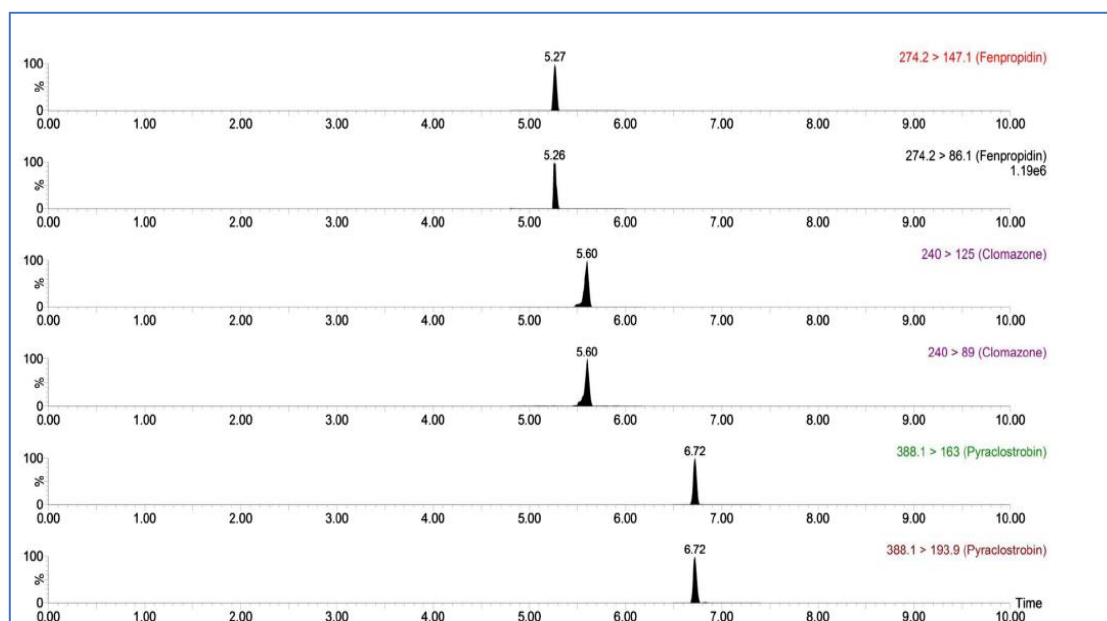
Οι Christia et al. (2015), πραγματοποίησαν μία έρευνα σχετικά με τον προσδιορισμό 17 διαφορετικών φυτοφαρμάκων σε ροδάκινα, σταφύλια, μήλα, μπανάνες, αχλάδια και φράουλες από διάφορες περιοχές της Ελλάδας, χρησιμοποιώντας την αναλυτική τεχνική UPLC-MS/MS με τριπλό τετράπολο (TQD) και τη μέθοδο QuEChERS για την προκατεργασία των δειγμάτων. Σκοπός της μελέτης τους ήταν να βρεθεί ο καταλληλότερος διαλύτης για την εκχύλιση των δειγμάτων για το κάθε φρούτο και στη συνέχεια να εφαρμοστεί η μέθοδος που επιλέχθηκε ως βέλτιστη για τον ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα δείγματα των φρούτων. Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκαν δύο διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα: ακετονιτρίλιο/0,1 % CH₃COOH (οξικού οξέος τύπου QuEChERS) ή ακετονιτρίλιο (κιτρικός τύπος QuEChERS) και η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων είχε ως εξής:

- Προσθήκη 15 g ομογενοποιημένου, φρέσκου δείγματος φρούτων σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με ήταν 15 mL ακετονιτρίλιου/ 0,1 % CH₃COOH ή ακετονιτρίλιου
- Ανάδευση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά
- Μεταφορά 500μL του υπερκειμένου σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 2 ml, ανάδευση και εκ νέου φυγοκέντρηση για 3 λεπτά
- Αραίωση μέρους του εκχυλίσματος σε υπερκάθαρο νερό και καθαρισμός του δείγματος με 50mg GCB εάν απαιτείται

Βρέθηκε πως το QuEChERS με ρυθμιστή οξικού οξέος είναι καταλληλότερο για την προκατεργασία των δειγμάτων από σταφύλια, μπανάνες, μήλα, αχλάδια και φράουλες, ενώ για τα ροδάκινα καταλληλότερη μέθοδος είναι το QuEChERS με ρυθμιστή κιτρικού

οξέος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των φυτοφαρμάκων με έγχυση 20μL του δείγματος που προέκυψε από την προκατεργασία στο σύστημα TQD LC-MS/MS, οι χρωματογραφικές συνθήκες του οποίου αναφέρονται στον πίνακα 4.1, ενώ για την ανίχνευση MS/MS χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία MRM σε θετική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI⁺.

Η μέθοδος των ερευνητών επικυρώθηκε σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή οδηγία 96/23202 και την καθοδήγηση SANCO/12571/2013. Χρησιμοποιήθηκαν καμπύλες βαθμονόμησης βάσει προτύπων σε διαλύτη. Διαπιστώθηκε πως η μέθοδος εμφανίζει ικανοποιητική ακρίβεια για τα φυτοφάρμακα που αναλύθηκαν με τα ποσοστά ανάκτησης να κυμαίνονται από 63 έως 138%, ενώ οι μέσοι όροι κυμάνθηκαν από 100.8 έως 118.3%. Κάποια φυτοφάρμακα εμφάνισαν ποσοστά ανάκτησης εκτός των επιθυμητών ορίων 70 - 120%, κάτι που ίσως οφείλεται στην μη χρήση καμπυλών βαθμονόμησης με βάση την μήτρα. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης (του οργάνου) ήταν 0.1-2.5 ng/L και 0.3-7.5 ng/L αντίστοιχα. Στα αποτελέσματα της έρευνάς τους, οι Christia et al., κατέληξαν πως τα επίπεδα των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα που αναλύθηκαν δεν υπερβαίνουν (στην πλειονότητα των δειγμάτων) τα επίσημα ανώτατα όρια που έχει ορίσει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή. Επιπρόσθετα,δείχθηκε πως τα αχλάδια και τα μήλα είναι τα πιο μολυσμένα φρούτα και πως τα οργανοφωσφορικά είναι τα πιο συχνά ανιχνευόμενα φυτοφάρμακα μαζί με την ομάδα των τριαζινών.



Εικόνα 4.9 Χρωματογραφικές κορυφές (MRM) τριών επιλεγμένων φυτοφαρμάκων (Fenpropidine, Clomazone, Pyraclostrobin) (Christia et al., 2015)

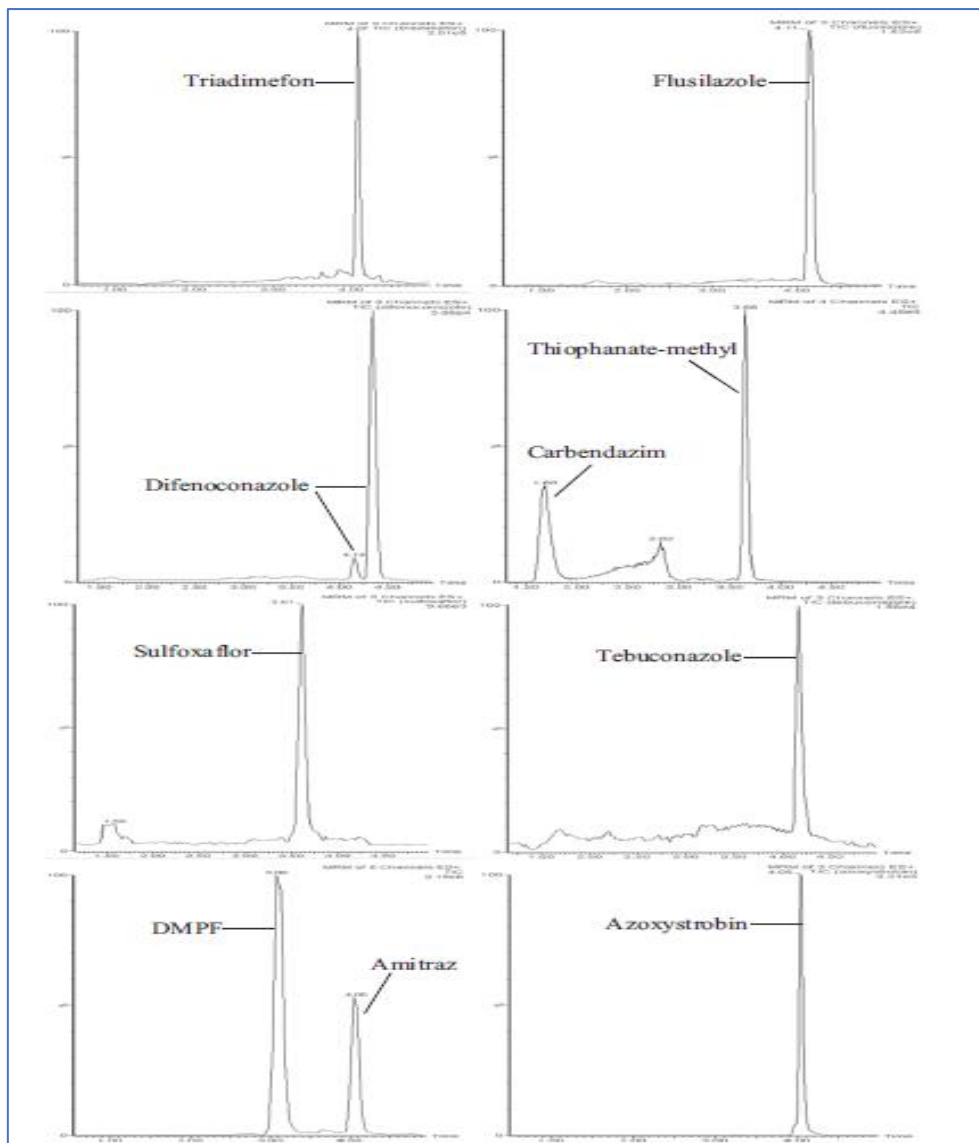
Οι Fu et al. (2017), πραγματοποίησαν μία έρευνα σχετικά με τον προσδιορισμό 8 φυτοφαρμάκων (triadimefon, sulfoxaflo, flusilazole, tebuconazole, difenoconazole, amitraz, azoxystrobin και thiophanate-methyl) σε φρούτα γκότζι μπέρι στην Κίνα, χρησιμοποιώντας την αναλυτική τεχνική TQD UPLC-MS/MS και μία τροποποιημένη μέθοδο QuEChERS για την προκατεργασία των δειγμάτων ακολουθούμενη από καθαρισμό με την τεχνική dSPE. Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων είχε ως εξής:

- Προσθήκη 5 g δείγματος καρπών γκότζι μπέρι σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 10 mL ακετονιτρίλιο
- Ομογενοποίηση με αναδευτήρα υψηλής ταχύτητας για 1 λεπτό
- Προσθήκη 2 g NaCl και 2 g MgSO₄ στο μείγμα και φυγοκέντρωση στις 5000 στροφές ανά λεπτό για 3 λεπτά
- Μεταφορά 3ml του υπερκειμένου σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, προσθήκη 50 mg PSA, ανάδευση για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση (dSPE καθαρισμός)
- Αραίωση 0.4ml του υπερκειμένου υγρού σε μυρμηκικό οξύ 0,1% σε νερό σε αναλογία 4:6 και διήθηση μέσω φίλτρου.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των φυτοφαρμάκων με έγχυση 10μl του δείγματος που προέκυψε από την προκατεργασία στο σύστημα TQD LC-MS/MS, οι χρωματογραφικές συνθήκες του οποίου αναφέρονται στον πίνακα 4.1, ενώ για την ανίχνευση MS/MS χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία MRM σε θετική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI⁺.

Η μέθοδος των ερευνητών επικυρώθηκε με υπολογισμό των LOD και LOQ ως οι συγκεντρώσεις με λόγο σήματος προς θόρυβο μεγαλύτερες από 3 και 10, αντίστοιχα. Οι τιμές LOD βρέθηκαν ίσες με 0,001 mg/kg, με εξαίρεση τις ουσίες amitraz και DMPF, όπου ήταν 0,005 mg/kg, ενώ ο μέσος όρος των ανακτήσεων των 8 φυτοφαρμάκων κυμάνθηκε από 82% έως 96% , τιμές αποδεκτές σύμφωνα με τα εθνικά πρότυπα της Κίνας. Στα αποτελέσματα της έρευνάς τους, οι Fu et al. αναφέρουν πως τα υπολείμματα

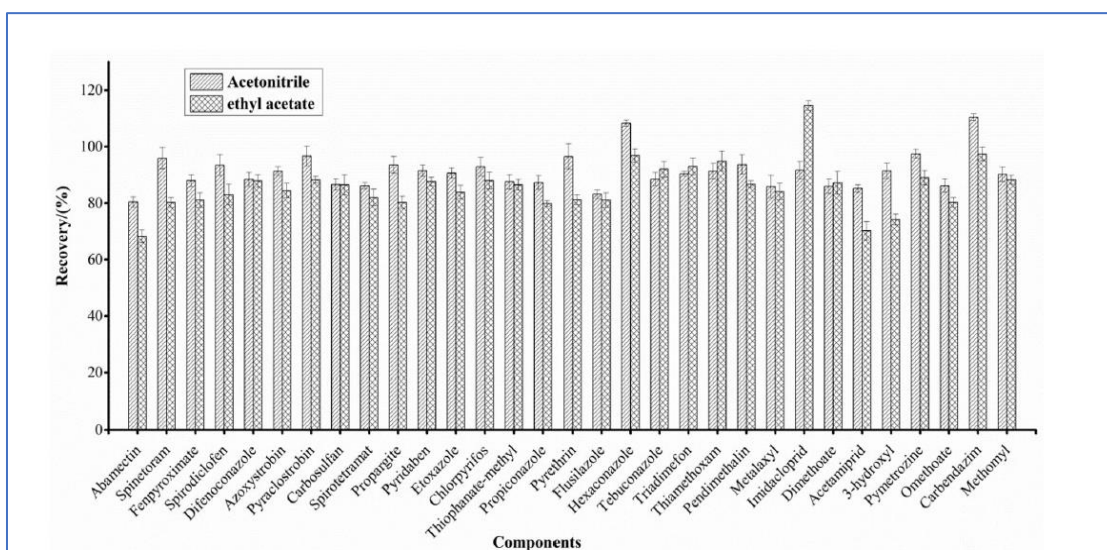
των 8 φυτοφαρμάκων στα γκότζι μπέρι ανιχνεύτηκαν σε επίπεδα χαμηλότερα των μέγιστων επιτρεπόμενων ορίων και για το λόγο αυτό είναι ασφαλή προς κατανάλωση.



Εικόνα 4.10 Χρωματογραφήματα των 8 υπό μελέτη φυτοφαρμάκων σε γκότζι μπέρι (Fu et al., 2017)

Ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε γκότζι μπέρι στην Κίνα πραγματοποιήθηκε και από τους Xing et al. (2022). Οι ερευνητές χρησιμοποίησαν την αναλυτική τεχνική TQD UPLC-MS/MS και μία τροποποιημένη μέθοδο QuEChERS για την προκατεργασία των δειγμάτων ακολουθούμενη από καθαρισμό με την τεχνική dSPE για τον προσδιορισμό 31 φυτοφαρμάκων στα συγκεκριμένα φρούτα. Για την βελτίωση της αποτελεσματικότητας

της εκχύλισης και την ελαχιστοποίηση των χημικών παρεμβολών από άλλες ουσίες στη μήτρα, οι ερευνητές διερεύνησαν την απόδοση δύο διαφορετικών διαλυτών, του ακετονιτρίλιου και του οξικού αιθυλεστέρα και τα αποτελέσματα έδειξαν ότι οι ανακτήσεις όλων των φυτοφαρμάκων που εκχυλίστηκαν με ακετονιτρίλιο ήταν ικανοποιητικές και κυμαίνονταν σε ποσοστά 80,4% - 110,4%, ενώ οι ανακτήσεις όλων των φυτοφαρμάκων που εκχυλίστηκαν με οξικό αιθυλεστέρα κυμαίνονταν μεταξύ 68,2% και 114,6%.



Εικόνα 4.11 Σύγκριση του ποσοστού ανάκτησης διαφόρων φυτοφαρμάκων με εκχύλιση με ακετονιτρίλιο ή οξικό αιθυλεστέρα (Xing et al., 2022)

Βρέθηκε, λοιπόν, πως η εκχύλιση με ακετονιτρίλιο είναι αποδοτικότερη, γεγονός που βρίσκεται σε συμφωνία με τη βιβλιογραφία όπου αναφέρεται πως η χρήση ακετονιτρίλιου ως διαλύτη εκχύλισης στη μέθοδο QuEChERS οδηγεί σε λιγότερες παρεμβολές μήτρας από λιπόφιλες ενώσεις, λιπίδια και χρωστικές ουσίες (Anastassiades et al., 2003).

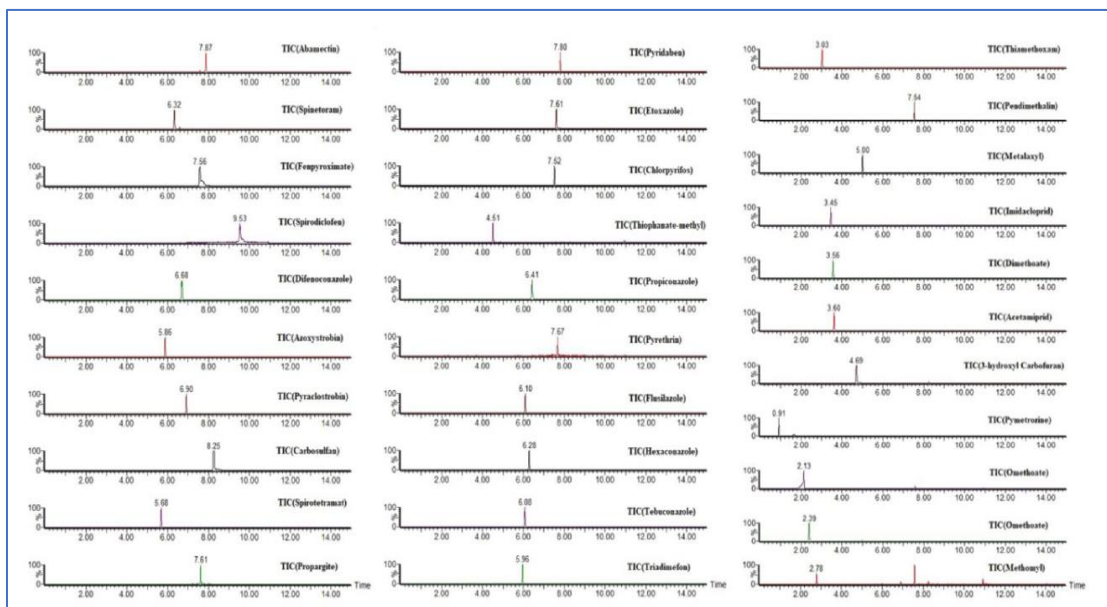
Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που πραγματοποίησαν οι Xing et al. (2022) με εφαρμογή τροποποιημένης τεχνικής QuEChERS είχε ως εξής:

- Προσθήκη 2 g δείγματος καρπών γκότζι μπέρι σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 10 mL ακετονιτρίλιο και 5ml νερό
- Εκχύλιση με χρήση συστήματος υπερήχων για 15 λεπτά
- Προσθήκη 1 g NaCl και και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά.

- Καθαρισμός του εκχυλίσματος με μεταφορά 5ml του υπερκειμένου σε σωλήνα προγεμισμένο με 400 mg C18, 400 mg PSA, 45 mg GCB και 1200 mg MgSO₄, ανάδευση για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά (dSPE καθαρισμός)
- Αραίωση 1ml του υπερκειμένου υγρού σε 1.0 mL νερό με ακετονιτρίλιο 0.1% και διήθηση μέσω φίλτρου.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανίχνευση των φυτοφαρμάκων με έγχυση 5μL του δείγματος που προέκυψε από την προκατεργασία στο σύστημα TQD LC-MS/MS, οι χρωματογραφικές συνθήκες του οποίου αναφέρονται στον πίνακα 4.1, ενώ για την ανίχνευση MS/MS χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία MRM σε θετική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI⁺.

Οι ερευνητές αναφέρουν πως η συγκεκριμένη μέθοδος που ανέπτυξαν καταδεικνύει εξαιρετική εκλεκτικότητα για τα 31 φυτοφάρμακα, καθώς όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα των 31 αυτών ουσιών, μετά τον καθαρισμό QuEChERS οι κορυφές των υπολειμματικών συν-εκχυλιζόμενων ενώσεων δεν παρέμβαιναν και εμφανίζονταν σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης.



Εικόνα 4.12 Χρωματογραφήματα ολικού ιόντος (TIC) για τα 31 υπό μελέτη φυτοφάρμακα (Xing et al., 2022)

Οι επιδράσεις της μήτρας (ME) στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων προσδιορίστηκαν με χρήση της εξίσωσης: $ME = A_{matrix} / A_s$, όπου A_{matrix} είναι το εμβαδόν κορυφής του

χρωματογραφήματος για το πρότυπο δείγμα μήτρας και As είναι το εμβαδόν κορυφής του χρωματογραφήματος για το πρότυπο δείγμα του καθαρού διαλύτη. Οι ερευνητές διαπίστωσαν πως οι τιμές ME για κάποια από τα φυτοφάρμακα ήταν σημαντικές, υποδεικνύοντας πως παρά τον καθαρισμό του δείγματος κάποιες παρεμποδιστικές ουσίες παραμένουν στο διάλυμα εκχύλισης δυσχεραίνοντας την ορθή ανάλυση των αναλυτών-στόχων. Για να αντισταθμίσουν, λοιπόν, τις παρεμποδίσεις από τη μήτρα, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν μια πρότυπη καμπύλη βαθμονόμησης με βάση τη μήτρα (matrix-matched) για τον ποσοτικό προσδιορισμό των 31 φυτοφαρμάκων στα δείγματα γκότζι μπέρι.

Επιπρόσθετα, η μέθοδος των ερευνητών επικυρώθηκε με υπολογισμό των LOD και LOQ, τα οποία βρέθηκαν ίσα με 0.5 $\mu\text{g/kg}$ και 1.0 $\mu\text{g/kg}$ αντίστοιχα, ενώ ενώ ο μέσος όρος των ανακτήσεων των 31 φυτοφαρμάκων κυμάνθηκε σε αποδεκτές τιμές από 73.8%-111.5%. Στα αποτελέσματα της έρευνάς τους, οι Xing et al. αναφέρουν πως τα φυτοφάρμακα που ανιχνεύθηκαν σε μεγαλύτερο βαθμό ήταν τα carbendazim, pyridaben, propargite, thiamethoxam, acetamiprid και imidacloprid, ενώ τα επίπεδα συγκέντρωσής τους που προσδιορίστηκαν στα γκότζι μπέρι δεν αποπνέουν ανησυχία για την υγεία των καταναλωτών.

Οι Suganthi et al. (2018) πραγματοποίησαν μία έρευνα σχετικά με τον προσδιορισμό υπολειμμάτων του φυτοφαρμάκου thiamethoxam – το οποίο εμφανίζει χαμηλή πτητικότητα και υψηλή πολικότητα) σε μπανάνες, τόσο στο βρώσιμο φρούτο όσο και στη φλούδα των μπανανών, χρησιμοποιώντας την αναλυτική τεχνική TQD UPLC-MS/MS και τη μέθοδο QuEChERS για την προκατεργασία των δειγμάτων ακολουθούμενη από καθαρισμό με την τεχνική dSPE. Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένου δείγματος μπανανών σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 10 mL ακετονιτρίλιο και ανάμιξη και ομογενοποίηση για 20 λεπτά
- Προσθήκη 1g NaCl και 4g MgSO_4 στο μείγμα και φυγοκέντρωση στις 6000 στροφές ανά λεπτό για 10 λεπτά.

- Μεταφορά 6ml του υπερκειμένου σε σωλήνα φυγοκέντρησης, προσθήκη 100mg PSA και 600mg άνυδρου MgSO_4 , ανάδευση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 3000 στροφές ανά λεπτό (dSPE καθαρισμός)
- Φιλτράρισμα 1ml από το υπερκείμενο υγρό και έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης.

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός του φυτοφαρμάκου πραγματοποιήθηκε σε σύστημα TQD LC-MS/MS. Για τη χρωματογραφική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση με 0.5% HCOOH σε νερό και 0.05% HCOOH σε ακετονιτρίλιο. Για την ανίχνευση MS/MS χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία MRM σε θετική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI^+ . Για την επιβεβαίωση της ουσίας thiamethoxam, χρησιμοποιήθηκαν δύο μεταβάσεις παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM) παράλληλα με την αντιστοίχιση του χρόνου κατακράτησης. Επιπρόσθετα, οι ερευνητές διαπίστωσαν πως με την προσθήκη HCOOH στο νερό και στο ακετονιτρίλιο της κινητής φάσης, το πρόβλημα της καταστολής του ιονισμού λόγω επιδράσεων της μήτρας επιλύεται.

Οι ερευνητές επικύρωσαν τη συγκεκριμένη μέθοδο ανίχνευσης του thiamethoxam σε μπανάνες και όπως αναφέρουν, οι ανακτήσεις εμφανίζουν ικανοποιητικό επίπεδο από 90-115% παρά το γεγονός ότι η μπανάνα περιέχει υψηλή περιεκτικότητα σε φαινόλες, ενώ επίσης η ακρίβεια της μεθόδου χαρακτηρίζεται ιδιαίτερη υψηλή. Το κατώτερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού που επιτεύχθηκαν με την μέθοδο αυτή ήταν 0,002 και 0,008 $\mu\text{g/g}$ για το φλούδι μπανάνας και 0,001 και 0,005 $\mu\text{g/g}$ για τον βρώσιμο καρπό της μπανάνας, αντίστοιχα (Suganthi et al., 2018).

Οι Dong et al. (2018) ανέπτυξαν και επικύρωσαν μία αναλυτική μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του τριαζολικών μυκητοκτόνων tebuconazole και thiophanate-methyl, καθώς και του μεταβολίτη του τελευταίου, την ουσία carbendazim, σε σταφύλια στην Κίνα, με χρήση της τεχνικής QuEChERS και LC-MS/MS τριπλού τετράπολου. Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Προσθήκη 5 g ομογενοποιημένων δειγμάτων σταφυλιών σε σωλήνα φυγοκέντρησης μαζί με 10 mL ακετονιτρίλιου και έντονη ανακίνηση για 1 λεπτό

- Προσθήκη 1g NaCl και 4g άνυδρου MgSO₄ στο μίγμα και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά.
- Καθαρισμός του δείγματος με μεταφορά 1ml του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα φυγοκέντρωσης και προσθήκη 50mg PSA, 150mg άνυδρο MgSO₄ και 3 mg MWCNTs (νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων). Ανάδευση για 30 sec και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά (dSPE καθαρισμός)
- Φιλτράρισμα του υπερκειμένου υγρού και έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης.

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων και του μεταβολίτη πραγματοποιήθηκε σε σύστημα TQD LC-MS/MS. Για τη χρωματογραφική ανάλυση, πραγματοποιήθηκε ισοκρατική έκλουση με κινητή φάση μείγμα νερού (25%) και ακετονιτριλίου (75%). Για την ανίχνευση MS/MS χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία MRM σε θετική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI+.

Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες του Υπουργείου Γεωργίας της Κίνας και βρέθηκε πως το LOD κυμαίνονταν από 2.1×10^{-5} έως 8.7×10^{-4} mg/L, ενώ το LOQ της μεθόδου βρέθηκε ίσο με 0.1 mg/kg και για τους 3 αναλύτες. Η μέσες τιμές ανακτήσεων για το tebuconazole, το thiophanate-methyl και το carbendazim βρέθηκαν ίσες με 83.2% - 99.0%, 92.2% - 105.4% και 91.2%- 97.8% αντίστοιχα, με το RSD να είναι μικρότερο του 7.1. Καθώς οι τιμές αυτές είναι πλήρως αποδεκτές και ικανοποιητικές, η μέθοδος των Dong et al. (2018) θεωρείται αξιόπιστη για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των τριών αυτών ουσιών στα σταφύλια.

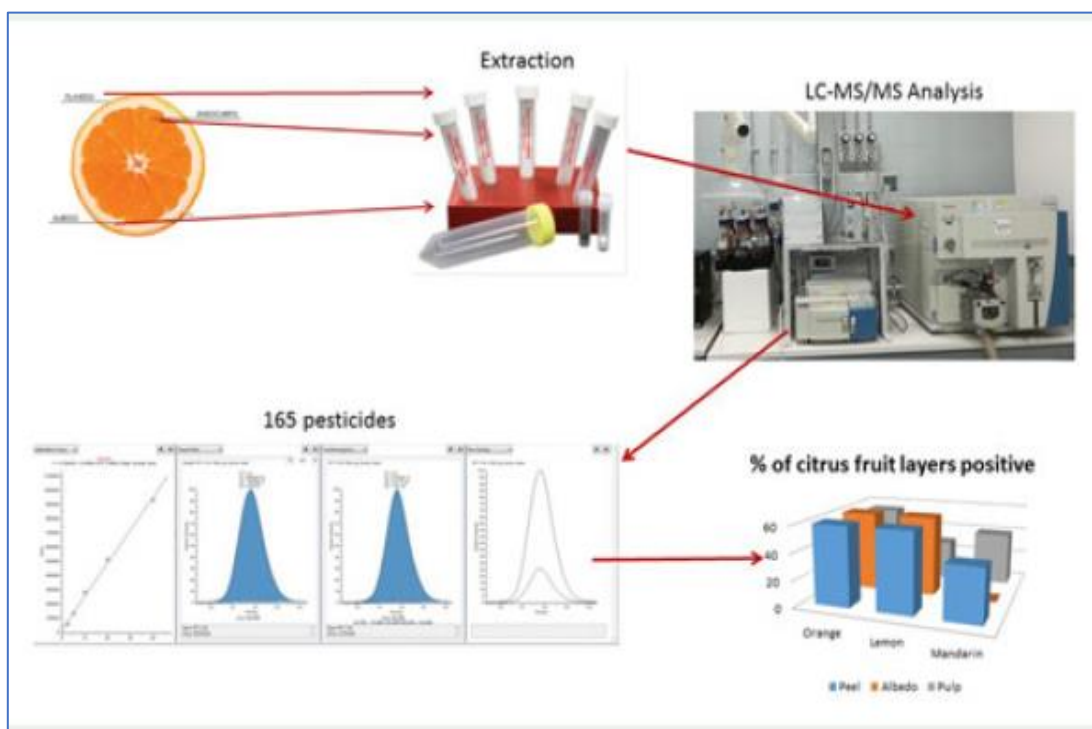
Συνεχίζοντας, οι Calvaruso et al. (2019) ανέπτυξαν μία ευαίσθητη μέθοδο LC-ESI-MS/MS τριπλού τετράπολου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό 165 φυτοφαρμάκων σε δείγματα εσπεριδοειδών στη Σικελία, χρησιμοποιώντας ως τεχνική εκχύλισης τη μέθοδο QuEChERS σε συνδυασμό με καθαρισμό του δείγματος με dSPE. Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένου δείγματος εσπεριδοειδών σε σωλήνα φυγοκέντρωσης μαζί με 10 mL ακετονιτριλίου ,έντονη ανακίνηση για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά

- Καθαρισμός του δείγματος με μεταφορά 6ml του υπερκειμένου σε νέο σωλήνα φυγοκέντρησης και προσθήκη 150mg PSA και 900mg άνυδρου MgSO_4 . Ανάδευση για 30 sec και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (dSPE καθαρισμός)
- Φιλτράρισμα του υπερκειμένου υγρού, προσθήκη 10 μl διαλύματος μυρμηκικού οξέος 5% σε 1ml του υπερκειμένου και έγχυση 10 μl του δείγματος που προέκυψε στο χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης TQD LC-MS/MS.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη με στερεά φάση το C18 και κινητή φάση αποτελούμενη από: A. H_2O , 2mM HCOONH_4 , HCOOH 1% και B. CH_3OH , 2mM HCOONH_4 , HCOOH 1%. Για την ανίχνευση MS/MS χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία MRM σε θετική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI+. Η μέθοδος των ερευνητών επικυρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες SANTE/11813/2017 (SANTE, 2017) και βρέθηκε πως εμφανίζει αποδεκτή ορθότητα, ακρίβεια και γραμμικότητα με το LOQ της μεθόδου να είναι μικρότερο του 5 $\mu\text{g/kg}$, ενώ η ανάκτηση ήταν επίσης εντός των αποδεκτών ορίων (70-100%). Η εκλεκτικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε μέσω της έγχυσης του αναλύτη σε τυφλά εκχυλίσματα δείγματος, ενώ η απουσία σήματος στους χρόνους κατακράτησης των αναλυτών επάνω από το επίπεδο σήμα/θόρυβο=3, έδειξε ότι η συγκεκριμένη μέθοδος είναι απαλλαγμένη από παρεμβολές μήτρας.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από αυτή τη μελέτη έδειξαν πως σε ποσοστό μεγαλύτερο του 95% των δειγμάτων εσπεριδοειδών ανιχνεύτηκαν φυτοφάρμακα της κατηγορίας των μυκητοκτόνων, ενώ οι υψηλότερες συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων ανιχνεύτηκαν στη φλούδα των φρούτων (4468 $\mu\text{g/Kg}$). Τα ευρήματά της μελέτης αυτής επιβεβαιώνουν την ανάγκη της ανάλυσης και του προσδιορισμού των φυτοφαρμάκων σε όλα τα στρώματα των φρούτων ξεχωριστά, καθώς οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών του κάθε στρώματος του φρούτου με τα φυτοφάρμακα δύναται να είναι διαφορετικές (Calvaruso et al., 2019).



Εικόνα 4.13 Προσδιορισμός 165 φυτοφαρμάκων σε εσπεριδοειδή με LC-MS/MS (Calvaruso et al, 2019)

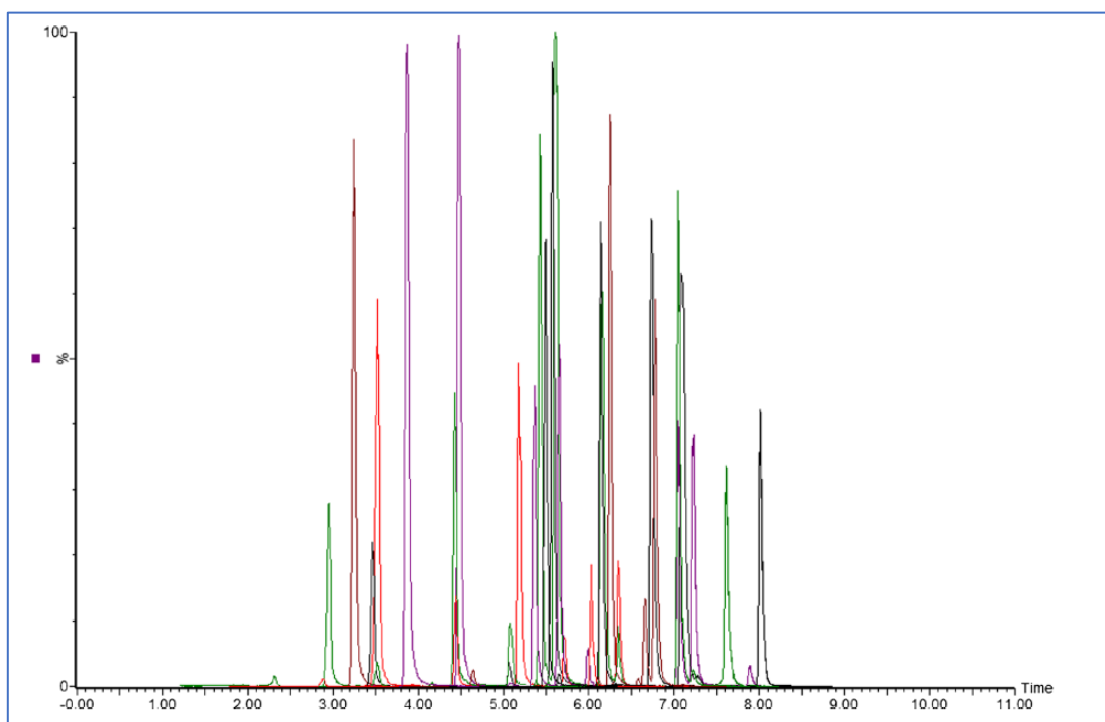
Οι Wang et al. (2021) ανέπτυξαν μία μέθοδο που βασίζεται στην τεχνική QuEChERS σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας τριπλού τετράπολου για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων από 43 φυτοφάρμακα σε φράουλες στο Πεκίνο. Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που ακολουθήθηκε είχε ως εξής:

- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένου δείγματος φραουλών σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με 10 mL ακετονιτρίλιο και ανακίνηση σε vortex για ένα λεπτό
- Προσθήκη 1g NaCl και 4g MgSO₄ στο μείγμα και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά.
- Μεταφορά 1ml του υπερκειμένου σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, προσθήκη 50mg PSA, 150mg άνυδρου MgSO₄ και 50mg C18 και φυγοκέντρωση για 3 λεπτά (dSPE καθαρισμός)
- Φιλτράρισμα του υπερκειμένου υγρού ώστε να ακολουθήσει η έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης TQD UPLC-MS/MS.

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε στήλη με στερεά φάση το C18 και κινητή φάση αποτελούμενη από: Α. 5 mM NH_4HCO_2 σε υπερκάθαρο νερό και Β. 5 mM NH_4HCO_2 σε μεθανόλη και ο όγκος έγχυσης ήταν 5μl. Για την ανίχνευση MS/MS χρησιμοποιήθηκε η λειτουργία MRM σε θετική και αρνητική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροσπεκασμό.

Η μέθοδος των ερευνητών επικυρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες SANTE/12682/2019 (SANTE, 2019) και βρέθηκε πως είχε γραμμικό εύρος 0,001-0,1 mg/kg, ενώ οι ανακτήσεις των επιλεγμένων φυτοφαρμάκων κυμαίνονταν στο εύρος 70,1-119,6% με σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) χαμηλότερες από 20%. Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (LOD) κυμάνθηκε μεταξύ 0.0001 and 0.002 mg/kg και το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) των 43 φυτοφαρμάκων ήταν μικρότερο από 0,005 mg/kg. Επιπρόσθετα, οι ερευνητές αξιολόγησαν την επίδραση του όγκου του δείγματος που εγχύεται στο χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης στην επίδραση της μήτρας (matrix effect), καθώς ο όγκος έγχυσης στην υγρή χρωματογραφία αποτελεί σημαντική παράμετρο που επηρεάζει την ανίχνευση του matrix effect (Lee et al. 2018). Οι ερευνητές εκτίμησαν το matrix effect μέσω της χρήσης των καμπυλών βαθμονόμησης που παρασκευάστηκαν σε τυφλό εκχύλισμα μήτρας και διαλύτη και διαπίστωσαν πως οι επιδράσεις της μήτρας μειώνονταν με τη μείωση του όγκου έγχυσης από τα 5μl στο 1 μl, ωστόσο μειώνονταν παράλληλα και η ευαισθησία της ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων, η οποία ήταν βέλτιστη με όγκο έγχυσης στα 5μl. Για το λόγο αυτό, πραγματοποιήθηκε βαθμονόμηση με βάση τη μήτρα (matrix-matched) μέσω της χρήσης τυφλών εκχυλισμάτων εμβολιασμένων με πρότυπα διαλύματα των φυτοφαρμάκων.

Όσον αφορά στα αποτελέσματα της μελέτης, ανιχνεύθηκαν συνολικά στις φράουλες 12 από τα 43 υπό μελέτη φυτοφάρμακα σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,02 έως 2,5 mg/kg και συμπερασματικά, η προτεινόμενη μέθοδος των Wang et al εμφανίζει υψηλή ακρίβεια και πιστότητα και μπορεί να εφαρμοστεί για την ανίχνευση των επιλεγμένων φυτοφαρμάκων σε φράουλες. (Wang et al., 2021).



Εικόνα 4.14 Χρωματογράφημα εκχυλισμένων ιόντων του μικτού πρότυπου διαλύματος που λαμβάνεται με UPLC-MS/MS σε συγκέντρωση 0,1 mg/kg (Wang et al., 2021)

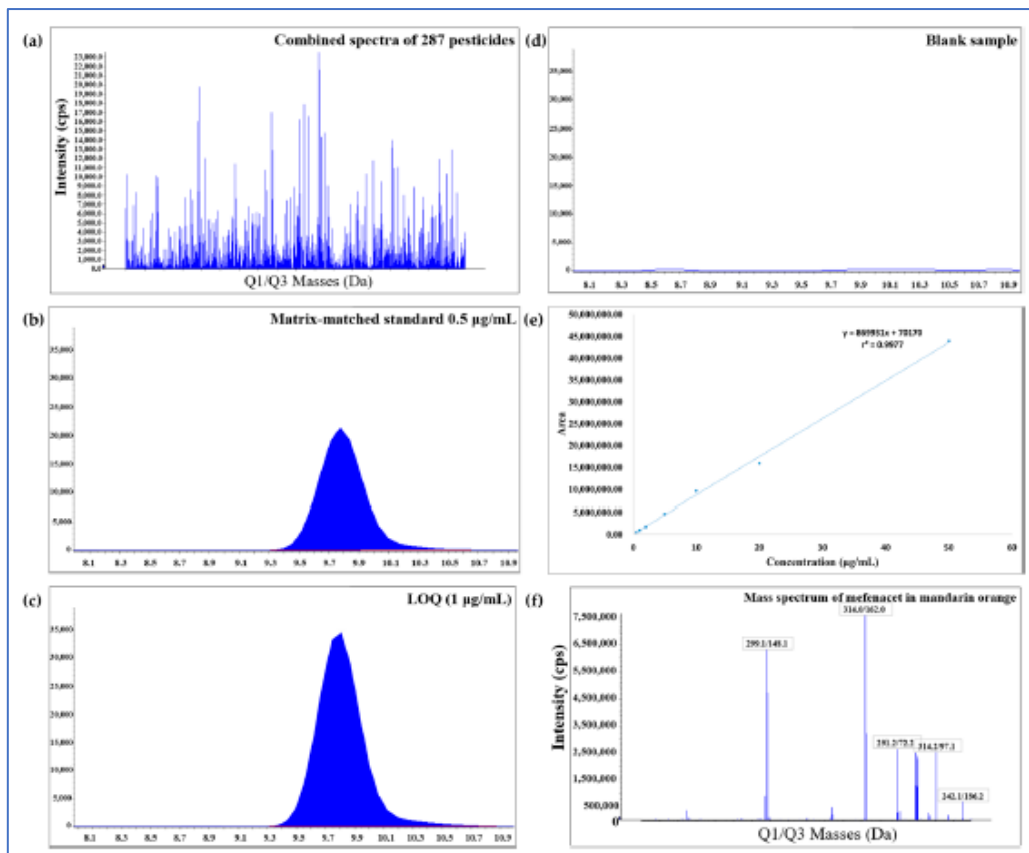
Σκοπός της μελέτης των Yuan et al. (2022) ήταν η ανάπτυξη μίας πολυδιάστατης μεθόδου ανάλυσης υπολειμμάτων 287 φυτοφαρμάκων σε μανταρίνια και γκρέιπφρουτ με την τεχνική TQD UPLC-MS/MS, μέσω της βελτιστοποίησης της διαδικασίας προετοιμασίας του δείγματος, την εύρεση του βέλτιστου όγκου έγχυσης στο χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης καθώς και την αξιολόγηση της επίδρασης της αραίωσης του δείγματος για την επίτευξη μειωμένων επιδράσεων μήτρας. Για την επίτευξη του βέλτιστου ποσοστού ανάκτησης και επιδράσεων μήτρας, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές ανάκτησης σε συγκέντρωση 50 µg/mL των διαλυτών εκχύλισης (ακετονιτρίλιο και μυρμηκικό οξύ 0,1% σε ακετονιτρίλιο), των αλάτων των κιτ εκχύλισης QuEChERS AOAC και EN καθώς και των κιτ καθαρισμού d-SPE. Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που ακολουθήθηκε εν τέλει ήταν η εξής:

- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένου δείγματος φραουλών σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με διαλύτη μυρμηκικό οξύ 0,1% σε ακετονιτρίλιο
- Προσθήκη 1.5g NaCl και 6g MgSO₄ στο μείγμα (QuEChERS AOAC 2007.01 kit)

- Μεταφορά 1ml του υπερκειμένου σε σωλήνα φυγοκέντρησης, προσθήκη 25mg PSA και 150mg άνυδρου $MgSO_4$ και 50mg C18 και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (dSPE καθαρισμός)
- Φιλτράρισμα του υπερκειμένου υγρού ώστε να ακολουθήσει η έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης TQD UPLC-MS/MS, με χρήση της λειτουργίας MRM σε θετική και αρνητική λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκάσμο ESI+ και ESI-.

Μετά τη βελτιστοποίηση της προετοιμασίας του δείγματος, συγκρίθηκαν τέσσερις διαφορετικοί όγκοι έγχυσης (1, 2, 5 και 10 μ l) ως προς τις επιδράσεις της μήτρας και την ευαισθησία της μεθόδου ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων και τα αποτελέσματα έδειξαν πως με όγκο έγχυσης 2 μ l, εξασφαλίζεται μειωμένη επίδραση μήτρας καθώς και αυξημένη ευαισθησία. Επίσης, οι ερευνητές πραγματοποίησαν δοκιμές αραίωσης του δείγματος με ακετονιτρίλιο σε διάφορους συντελεστές αραίωσης, διαπιστώνοντας όμως πως η αραίωση δεν μειώνει το φαινόμενο της επίδρασης μήτρας το ίδιο για όλα τα φυτοφάρμακα, γεγονός που υποδηλώνει πως η κάθε χημική ένωση ή οι και οι ίδιες ενώσεις σε διαφορετικά υποστρώματα απαιτούν διαφορετικούς συντελεστές αραίωσης για επίτευξη των μικρότερων επιδράσεων μήτρας. Εν τέλει, οι ερευνητές πραγματοποίησαν matrix- matched βαθμονόμηση 4:1, η οποία αντιστοιχεί σε συντελεστή αραίωσης 0.8, καθώς συμπέραναν πως πετυχαίνει καλύτερη μείωση του φαινομένου επίδρασης μήτρας σε σχέση με τη matrix-matched βαθμονόμηση 1:1. Στη συνέχεια, η αναλυτική μέθοδος των Yuan et al. (2022) επικυρώθηκε όσον αφορά την εκλεκτικότητα, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ), τη γραμμικότητα, την ακρίβεια και την επίδραση της μήτρας και βρέθηκε πως επιτυγχάνει LOQ για όλα τα φυτοφάρμακα μικρότερο του 0.01 mg/kg, ενώ η γραμμικότητα της καμπύλης βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη (matrix-matched) κυμαίνεται από 0,0005 έως 0,05 μ g/mL. Οι τιμές ανάκτησης όλων των φυτοφαρμάκων κυμαίνονταν σε ικανοποιητικά επίπεδα 70-120% , ενώ το RSD βρέθηκε μικρότερο του 20% για όλα τα δείγματα μανταρινιού και γκρέιφρουτ. Επιπρόσθετα, η επίδραση της μήτρας που παρατηρήθηκε ήταν αμελητέα για το περίπου 95% των φυτοφαρμάκων στο μανταρίνι και το 85% των φυτοφαρμάκων στο γκρέιφρουτ. Συμπερασματικά, η αναλυτική μέθοδος που ανέπτυξαν οι Yuan et al. (2022) μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία

για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε εσπεριδοειδή, όπως το μανταρίνι και το γκρέιφρουτ.

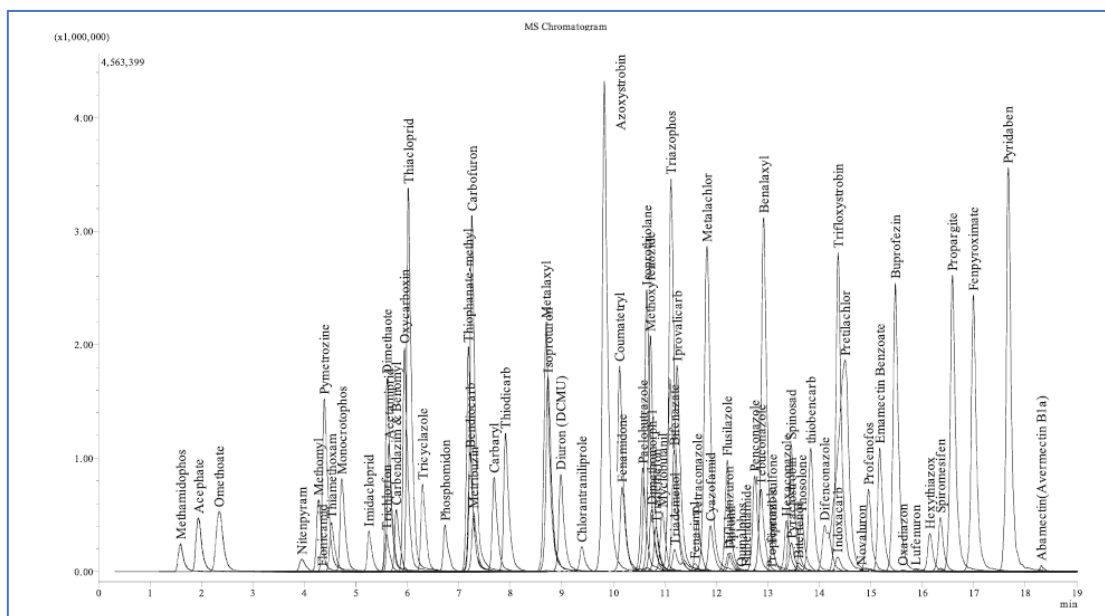


Εικόνα 4.15 (α) Φάσματα μάζας των 287 φυτοφαρμάκων σε εσπεριδοειδή (β) Χρωματογράφημα του matrix matched προτύπου συγκέντρωσης 0.5mg/ml (γ) Χρωματογράφημα LOQ. (δ) Χρωματογράφημα του τυφλού διαλύματος (ε) Καμπύλη βαθμονόμησης matrix-matched . (φ) Φάσμα μάζας του mefenacet σε δείγμα μανταρινιού (Yuan et al., 2022)

Οι Naik et al (2022) ανέπτυξαν μία αναλυτική μέθοδο με LC-MS/MS για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε ρόδια, η οποία επικυρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες SANTE/12682/2019 (SANTE, 2019). Η εκχύλιση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με ένα τροποποιημένο πρωτόκολλο QuEChERS ακολουθούμενο από καθαρισμό με την τεχνική dSPE. Η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που ακολουθήθηκε εν τέλει ήταν η εξής:

- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένου δείγματος ροδιών σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με διαλύτη ακετονιτρίλιο (20ml)

- Η πλειονότητα των φυτοφαρμάκων ανιχνεύτηκε μέσω της θετικής λειτουργίας ESI, ενώ οι ερευνητές βελτιστοποίησαν τις ειδικές παραμέτρους του MS/MS, πραγματοποιώντας αρχικά την καταγραφή του φάσματος μάζας πλήρους σάρωσης για όλα τα φυτοφάρμακα ώστε να επιλεγεί η τιμή m/z με την υψηλότερη ένταση, ενώ ως πρόδρομο ιόν επιλέχθηκαν τα πρωτονιωμένα μοριακά ιόντα $(M + H)^+$.



Εικόνα 4.16 Χρωματογράφημα ολικών ιόντων LC-MS/MS για τα 74 φυτοφάρμακα-στόχους σε ρόδια (Naik et al., 2022)

Μέσω αυτής της μεθόδου, όλα τα φυτοφάρμακα ανιχνεύθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν με το όριο ποσοτικοποίησης να είναι ίσο με $10 \mu\text{g/kg}$. Η ανάκτηση υπολογίστηκε μέσω του εμβολιασμού γνωστής ποσότητας μήτρας με μίγμα φυτοφαρμάκων στα 10, 50, and 100 $\mu\text{g/kg}$ και βρέθηκε ικανοποιητική με εύρος 70-120%, ενώ το RSD βρέθηκε μικρότερο του 15%. Οι ερευνητές πραγματοποίησαν επίσης υπολογισμό της αβεβαιότητας των μετρήσεων σύμφωνα με τις οδηγίες EURACHEM/CITAC (Ellison and Williams, 2012) και βρέθηκε πως η αβεβαιότητα μέτρησης στα $50 \mu\text{g/kg}$ κυμαινόταν από 4,02 έως $16,12 \mu\text{g/kg}$ και θεωρήθηκε αποδεκτή. Η χρήση, λοιπόν, της προτεινόμενης αυτής μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στα ρόδια θεωρείται κατάλληλη και αναπαραγώγιμη, έχοντας ως πρόσθετο πλεονέκτημα τον πολύ σύντομο χρόνο εκτέλεσης που ανέρχεται στα 25 λεπτά της ώρας (Naik et al., 2022).

Τέλος, οι Sandín-España et al. (2022) πραγματοποίησαν μία μελέτη για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων 5 φυτοφαρμάκων (boscalid, pyraclostrobin, fludioxonil, fluopyram και tebuconazole) σε λωτούς με χρήση LC-ESI-MS/MS τριπλού τετράπολου, με στόχο τον προσδιορισμό και καθορισμό των MLA για τα συγκεκριμένα φρούτα με βάση τα γνωστά MLA των συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων στα μήλα.

Για την εκχύλιση των δειγμάτων, οι ερευνητές χρησιμοποίησαν τη μέθοδο QuEChERS, στην έκδοση με το κιτρικό άλας, αφού πραγματοποίησαν δοκιμές τόσο με κιτρικό άλας όσο και με οξικό άλας. Οι δοκιμές αυτές έδειξαν πως και στις δύο περιπτώσεις, οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές μεταξύ 89,2 και 103,1% με σχετική τυπική απόκλιση στο εύρος 4,1-10,2% για όλες τις ενώσεις. Ωστόσο η επιλογή του κιτρικού άλατος έγινε καθώς έδωσε καθαρότερα εκχυλίσματα που επιτύγχαναν υψηλότερα σήματα απόκρισης. Εν τέλει η διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων που ακολουθήθηκε και επικυρώθηκε ήταν η εξής:

- Προσθήκη 10 g ομογενοποιημένου δείγματος λωτών σε δοκιμαστικό σωλήνα μαζί με διαλύτη ακετονιτρίλιο (10ml)
- Προσθήκη 1g κιτρικού νατρίου, 4g MgSO_4 και 1g NaCl και φυγοκέντρωση για το διαχωρισμό του υδατικού και του οργανικού στρώματος

- Μεταφορά 6ml από την οργανική φάση σε σωλήνα φυγοκέντρησης, προσθήκη 150mg PSA, 900mg άνυδρου $MgSO_4$ και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά (dSPE καθαρισμός)
- Φιλτράρισμα 1ml του υπερκείμενου υγρού ώστε να ακολουθήσει η έγχυση στο χρωματογραφικό σύστημα ανάλυσης TQD UPLC-MS/MS,

Έπειτα από δοκιμές για τη βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών, οι ερευνητές κατέληξαν στις συνθήκες που αναφέρονται στον πίνακα 4.1, ενώ για την ανάλυση MS/MS οι συνθήκες που επιλέχθηκαν ήταν σε θετική λειτουργία ιονισμού για όλες τις ενώσεις εκτός από το fludioxonil, για το οποίο η καλύτερη απόκριση πραγματοποιήθηκε σε κατάσταση αρνητικού ιονισμού.

Η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου των Sandin-Espana et al., πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες SANCO 3029/99 (European Commission SANCO), και την οδηγία SANTE 11813/2017 (SANTE, 2017). Η παρασκευή των προτύπων καμπυλών βαθμονόμησης έγινε με διαλύματα προσαρμοσμένα στη μήτρα (matrix-matched), όπου τα πρότυπα των φυτοφαρμάκων και τα εσωτερικά πρότυπα προστέθηκαν σε τυφλά εκχυλίσματα λωτών. Η εκλεκτικότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε σε τυφλά δείγματα λωτών που εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν για την αναζήτηση τυχόν παρεμβαλλόμενων κορυφών υπό τις ίδιες συνθήκες, μέσω παρακολούθησης του επιλεγμένου ιόντος. Το LOD εκτιμήθηκε για λόγο σήματος προς θόρυβο ίσο με 3 από τα χρωματογραφήματα στη χαμηλότερη συγκέντρωση αναλύτη, ενώ το LOQ καθορίστηκε ως η χαμηλότερη συγκέντρωση που δοκιμάστηκε και έδωσε αποδεκτές τιμές ακρίβειας και ανάκτησης. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το εύρος των ανακρίσεων για τα 5 φυτοφάρμακα κυμαίνεται μεταξύ 87-102, ενώ το LOQ για όλους τους αναλύτες ήταν ίσο με 1μg/kg εκτός από το fludioxonil, που ήταν 2.5 μg/kg και τα αποτελέσματα αυτά θεωρούνται ικανοποιητικά (Sandín-España et al., 2022).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο : ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από την παρούσα μελέτη, προκύπτει πως η σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας επιτρέπει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε πολύπλοκα δείγματα όπως είναι τα φρούτα με μεγάλη ακρίβεια και χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, σημαντικά χαμηλότερα από τα καθορισμένα μέγιστα ανεκτά επίπεδα υπολειμμάτων (MRL) φυτοφαρμάκων σε φρούτα. Σημαντικά, επίσης, πλεονεκτήματα της συζευγμένης τεχνικής LC-MS αποτελούν η υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα καθώς και η μεγάλη ταχύτητα ανάλυσης που επιτρέπει το διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό ενός σημαντικά μεγάλου αριθμού φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε ένα μόνο αναλυτικό κύκλο.

Ωστόσο, η πολύ χαμηλή συγκέντρωση των υπολειμμάτων των φυτοφαρμάκων στα φρούτα, που πολλές φορές βρίσκεται σε επίπεδο ιχνών, όπως επίσης και το γεγονός ότι τα φρούτα αποτελούν πολύπλοκες μήτρες που περιέχουν μεγάλο αριθμό ανόργανων και οργανικών ουσιών, οδηγεί στην ανάγκη ανάπτυξης κατάλληλων μεθόδων προκατεργασίας των δειγμάτων για την εκχύλιση των αναλυτών. Η πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης των δειγμάτων φρούτων για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων τα τελευταία χρόνια αποτελεί η μέθοδος QuEChERS, η οποία είναι μία απλή, γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική που επιτυγχάνει υψηλά ποσοστά ανάκτησης των φυτοφαρμάκων. Για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης και του καθαρισμού του δείγματος έχουν χρησιμοποιηθεί αρκετές παραλλαγές της μεθόδου, με τη χρήση του ακετονιτριλίου ως διαλύτη εκχύλισης να είναι πλέον συνηθέστερη, ενώ επίσης συχνά η εκχύλιση με την τεχνική QuEChERS ακολουθείται από καθαρισμό του δείγματος με την τεχνική dSPE. Έχουν, ωστόσο, αναφερθεί πρωτόκολλα εκχύλισης με τη μέθοδο QuEChERS με τα οποία επετεύχθη σημαντικά υψηλή ανάκτηση των αναλυτών χωρίς την ανάγκη περαιτέρω καθαρισμού του δείγματος (Ahmed et al., 2021, Malhat et al., 2019).

Εκτός της μεθόδου QuEChERS, αξίζει να αναφερθεί η χρήση μίας νέας τεχνικής που αποτελεί παραλλαγή τη τεχνικής MSPD και ονομάζεται διασπορά στερεάς φάσης με μπάλες σε σωλήνα (BiT-MSPD), όπου η προετοιμασία του δείγματος πραγματοποιείται

απευθείας σε κλειστό σωλήνα εκχύλισης με τη βοήθεια χαλύβδινων σφαιρών (Kemmerich et al., 2020).

Η τεχνική BiT-MSPD έχει ως πλεονεκτήματα την πολύ χαμηλή κατανάλωση οργανικού διαλύτη, χαμηλότερο κόστος και λιγότερα στάδια ανάλυσης από άλλες μεθόδους εκχύλισης και είναι συγκρίσιμη σε απόδοση με τις περισσότερες από τις υπάρχουσες μεθόδους QuEChERS. Ωστόσο, εμφανίζει το μειονέκτημα των σημαντικών επιδράσεων της μήτρας στο αναλυτικό σήμα. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί πως στην περίπτωση ιδιαίτερα πολικών φυτοφαρμάκων, όπου δεν ενδείκνυται η τεχνική QuEChERS, έχει εφαρμοστεί με επιτυχία η τεχνική Quick Polar Pesticides (QuPPE) με χρήση οξινομένης μεθανόλης ως διαλύτη εκχύλισης χωρίς να απαιτείται περαιτέρω καθαρισμός του δείγματος και δίνοντας ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων εντός των επιτρεπτών ορίων 70-120% που έχουν τεθεί από τις οδηγίες SANTE.

Όσον αφορά στα διάφορα είδη ζεύξης μεταξύ υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας, το κυρίαρχο είδος ιονισμού που χρησιμοποιείται για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φρούτα είναι ο ηλεκτροψεκασμός (ESI), είτε σε θετική είτε σε αρνητική λειτουργία. Ωστόσο, έχει αναφερθεί ότι τα φαινόμενα παρεμπόδισης μήτρας είναι συνήθη κατά την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με LC-MS σε λειτουργία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό με αποτέλεσμα την ενίσχυση ή την καταστολή του αναλυτικού σήματος (Chawla et al., 2017). Για το λόγο αυτό, η βαθμονόμηση με χρήση μήτρας δείγματος (matrix-matched) είναι η πιο συχνή τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μείωση της επίδρασης της μήτρας στο αποτέλεσμα του ποσοτικού προσδιορισμού των φυτοφαρμάκων στα φρούτα.

Όσον αφορά στα είδη των αναλυτών μάζας, οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενοι ανήκουν στην κατηγορία του τριπλού τετράπολου (TQD). Ιδιαίτερα σε λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM), οι συγκεκριμένοι αναλυτές μάζας επιτυγχάνουν σημαντικά αυξημένη εκλεκτικότητα για τους αναλύτες, καλή ευαισθησία και μειωμένη επίδραση της μήτρας. Ωστόσο, με την ραγδαία ανάπτυξη της τεχνολογίας τα τελευταία χρόνια, έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται υβριδικοί αναλυτές μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας, όπως οι Q-TOF και Q-TRAP, με τους οποίους επιτυγχάνεται ακριβής προσδιορισμός πολλαπλών υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα σε μία μόνο ανάλυση, με ελαχιστοποίηση των παρεμβολών από τη μήτρα, αυξάνοντας την εκλεκτικότητα των μεθόδων ανάλυσης σε σχέση με την τεχνολογία τριπλού τετράπολου.

Εν κατακλείδι, η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας αποτελεί μία κατάλληλη μέθοδο για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα φρούτα. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων, η πολυπλοκότητα της μήτρας καθώς και ο ολοένα αυξανόμενος αριθμός νέων φυτοφαρμάκων που εγκρίνονται για χρήση στις γεωργικές καλλιέργειες οδηγούν στη συνεχή ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθοδολογιών με LC-MS με στόχο τη μείωση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, την βελτίωση της ανάκτησης των αναλυτών, τη μείωση των παρεμποδίσεων από τη μήτρα και τη δημιουργία απλών, γρήγορων και αποτελεσματικών πολύ-υπολειμματικών μεθόδων με δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων με ακρίβεια και αξιοπιστία.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

ΕΛΛΗΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Βοτάνη Α. (2019). *Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης οργανικών μικρορύπων σε ροή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Εφαρμογή στον προσδιορισμό αντιηλιακών ενώσεων σε δείγματα εδαφών και ιζημάτων*. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Σχολή Θετικών Επιστημών, Ιωάννινα.

Γεωργόπουλος, Α., Νικολάου, Κ., Δημητρίου, Α., Γαβριλάκης, Κ. & Μπλιώνης, Γ. (2013). *ΓΗ -ένας μικρός και εύθραυστος πλανήτης*, Gutenberg, Εκπαίδευση και Περιβάλλον. Αθήνα.

ΕΛΙΝΥΑΕ (2013). ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ ΚΑΙ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ. [online] Available at: <https://www.elinyae.gr/sites/default/files/2019-07/Fytoprostasia.1384864363546.pdf> [Accessed 22 May 2023].

Εμμανουήλ, Ν., Τζάνος, Ε., Πασπάτης, Ε. & Βιτσαζάκης, Γ. (2019). *Φυτοπροστασία*. Αθήνα: Εκδόσεις ΙΤΥΕ Διόφαντος.

Θεοδωρίδης, Γ., Γηρούση, Σ., Ζαχαριάδης, Γ., Ζώτου, Α., Σαμανίδου, Β. (2015). *Βιοαναλυτική χημεία*, [ηλεκτρ. βιβλ.], Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, Αθήνα.

Κακλαμάνος Γ. (2009). *Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ορμονών με αυξητική δράση σε βιολογικά δείγματα με υγρή αχρωματογραφία – φασματομετρία μαζών*. Διδακτορική Διατριβή. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης. Σχολή θετικών επιστημών. Τμήμα Χημείας.

Καρακίτσιου, Α. (2012). *Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε αγροτικά προϊόντα και εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης* (Διδακτορική διατριβή). Διαθέσιμο από: Εθνικό Αρχείο Διδακτορικών Διατριβών.

Μαραγκού, Ν. (2010). *Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ενώσεων που προκαλούν ορμονικές διαταραχές με υγροχρωματογραφία–φασματομετρία μαζών*, Διδακτορική Διατριβή. ΕΚΠΑ, Αθήνα.

Μηλιάδης, Δ. (n.d.). *ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ ΚΑΙ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΠΟΣΙΜΟΥ ΝΕΡΟΥ*. [online] Available at: <http://www.watermicro.gr/wp-content/uploads/miliadis.pdf> [Accessed 11 Jun. 2023].

Μπότη, Β. (2009). *Αναλυτικές τεχνικές για τον προσδιορισμό επιλεγμένων ενώσεων με ενδοκρινική διαταρακτική δράση (EDCs) σε φυσικά νερά, ιζήματα και τρόφιμα– Εφαρμογή χημειομετρικών μεθόδων*, Διδακτορική Διατριβή. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Νάννου, Χ. (2018). Σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε φυσικά νερά και ιζήματα, Διδακτορική Διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.

Παπαδογιάννης Ν.Ι., Σαμανίδου Φ.Β. (2001). Ενόργανη χημική ανάλυση, Εκδόσεις Πήγασος, Θεσσαλονίκη 2001.

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ahmed, M.H., Ahmed, S.A., Rania and Abd Elkareem, Fatemah Alzhraa, M. W. A (2021). Determination of Pesticides Residues in Orange Samples Marketed in Assiut Governorate, Egypt. 13(1), pp.189–194. doi:<https://doi.org/10.21608/eajbsf.2021.155109>.

Almutairi, M., Alsaleem, T., Al Herbish, H., Al Sayari, A.A. and Alowaifeer, A.M. (2021). LC-MS/MS and GC-MS/MS analysis of pesticide residues in Ecuadorian and Filipino Cavendish bananas imported into Saudi Arabia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 38(8), pp.1376–1385. doi:<https://doi.org/10.1080/19440049.2021.1930199>.

Anastassiades, M., Kolberg, Eichhorn, Benkenstein, Lukačević, Mack, Wildgrube, Sigalov, Dörk and Barth (2017). *EU Reference Laboratory for pesticides requiring Single Residue Methods (EURL-SRM) Quick Method for the Analysis of numerous Highly Polar Pesticides in Foods of Plant Origin via LC-MS/MS involving Simultaneous Extraction with Methanol (QuPpe-Method)*. [online] Available at: https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/srm/meth_QuPpe.pdf

Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, 86(2), 412-431. <http://dx.doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>.

Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *International journal of analytical chemistry*, 2012, 282574. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>

Boxall, A.B.A., Fogg, L.A., Blackwell, P.A., Blackwell, P., Kay, P., Pemberton, E.J. and Croxford, A. (2004). Veterinary Medicines in the Environment. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, [online] pp.1–91. doi:https://doi.org/10.1007/0-387-21729-0_1.

Büyükköroğlu, G., Dora, D.D., Özdemir, F. and Hızal, C. (2018). Techniques for Protein Analysis. *Omics Technologies and Bio-Engineering*, [online] 1, pp.317–351. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804659-3.00015-4>.

Calvaruso, E., Cammilleri, G., Pulvirenti, A., Lo Dico, G.M., Lo Cascio, G., Giaccone, V., Vitale Badaco, V., Cipri, V., Alessandra, M.M., Vella, A., Macaluso, A., Di Bella, C. and

Ferrantelli, V. (2019). Residues of 165 pesticides in citrus fruits using LC-MS/MS: a study of the pesticides distribution from the peel to the pulp. *Natural Product Research*, 34(1), pp.34–38. doi:<https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1561682>.

Chawla, S., Patel, H.K., Gor, H.N., Vaghela, K.M., Solanki, P.P. and Shah, P.G. (2017). Evaluation of Matrix Effects in Multiresidue Analysis of Pesticide Residues in Vegetables and Spices by LC-MS/MS. *Journal of AOAC INTERNATIONAL*, 100(3), pp.616–623. doi:<https://doi.org/10.5740/jaoacint.17-0048>.

Christia, C., Bizani, E., Christophoridis, C., Fytianos, K. (2015). Pesticide residues in fruit samples: comparison of different QuEChERS methods using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. 22(17), pp.13167–13178. doi:<https://doi.org/10.1007/s11356-015-4456-0>.

Chung, S. W. C. & Chen, B. L. S. (2011). Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *Journal of Chromatography A*, 1218, 5555–5567. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.06.066>

Collimore, W.A. and Bent, G.-A. (2020). A newly modified QuEChERS method for the analysis of organochlorine and organophosphate pesticide residues in fruits and vegetables. *Environmental Monitoring and Assessment*, 192(2). doi:<https://doi.org/10.1007/s10661-020-8072-1>.

Czaplicki, S. (2013). Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatography*. doi:<https://doi.org/10.5772/55620>.

Dong, B., Yang, Y., Pang, N. and Hu, J. (2018). Residue dissipation and risk assessment of tebuconazole, thiophanate-methyl and its metabolite in table grape by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 260, pp.66–72. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.062>.

Ellison, S. L. R., Williams, A. (Eds.) (2012). EURACHEM/CITAC guide: quantifying uncertainty in analytical measurement, Third edition, ISBN 978-0-948926-30-3. <http://www.eurchem.org>.

European Commission (2015). *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed*. SANTE/11945/2015.

European Commission SANCO (1999). Guidance Document SANCO/3029/99 Rev. 4 for Generating and Reporting Methods of Analysis in Support of Pre-Registration Data Requirements for Annex II (Part A, Section 4) and Annex III (Part A, Section 5) of Directive 91/414; European Commission: Brussels, Belgium; pp. 1–26

European Union (EU). (2012). Commission regulation (EC) 396/2005 of the European parliament and of the council of 23rd February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending council directive 91/414/EEC. 2005R0396-EN-26.10.2012-010.001, 1–1766.

FAO (2022). FAOSTAT: pesticide trade 2019. Available at:
<http://www.fao.org/faostat/en/#data/RT>

FAOSTAT (2018). In: Food and Agriculture Organization of the United Nation, Available at: <http://faostat.fao.org/>,

Farshidi, M., Moludi, J., Mohebbi, A., Ebrahimi, B. and Kamali Shojaei, Asa (2021). Determination of some pesticide residues in fresh fruits and vegetables using QuEChERS method followed by gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, [online] 4(1), pp.19–25. doi:<https://doi.org/10.22059/jfabe.2020.312165.1069>.

Fenik, J., Tankiewicz, M. and Biziuk, M. (2011). Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(6), pp.814–826. doi:<https://doi.org/10.1016/j.trac.2011.02.008>.

Ferrer CA, Lozano A, Agüera A, Jiménez Fernández AR (2011) Overcoming matrix effects using the dilution approach in multiresidue methods for fruits and vegetables. *J Chromatogr A* 1218:7634–7639

Firdoz, S., Ma, F., Yue, X., Dai, Z., Kumar, A. & Jiang, B. (2010). A novel amperometric biosensor based on single walled carbon nanotubes with acetylcholine esterase for the detection of carbaryl pesticide in water. *Talanta*, 83, 269–273. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2010.09.028>

Fu, Y., Yang, T., Zhao, J., Zhang, L., Chen, R. and Wu, Y. (2017). Determination of eight pesticides in *Lycium barbarum* by LC-MS/MS and dietary risk assessment. *Food Chemistry*, 218, pp.192–198. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.014>.

Ge, S., Wang, Y., Qingmei, S., Chen, L., Hu, D. and Hu, D. (2020). Determination of nitenpyram dissipation and residue in kiwifruit by LC-MS/MS. 37(6), pp.955–962. doi:<https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1741693>.

Giles, E. (2022). *Liquid Chromatography – Including HPLC, UHPLC and LCxLC*. [online] Available at: <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/liquid-chromatography-including-hplc-uhplc-and-lcxlc-344048>.

Gormez, E., Golge, O. and Kabak, B. (2021). Quantification of fosetyl-aluminium/phosphonic acid and other highly polar residues in pomegranates using Quick Polar Pesticides method involving liquid chromatography-tandem mass spectrometry measurement. *Journal of Chromatography A*, 1642, p.462038. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.462038>.

Grimalt, S., Dehouck, P. (2016). Review of analytical methods for the determination of pesticide residues in grapes. *Journal of Chromatography A*, 1433, pp.1–23. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.076>.

- Grimalt, S., Sancho, J.V., Pozo, Ó.J. and Hernández, F. (2010). Quantification, confirmation and screening capability of UHPLC coupled to triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, p.n/a-n/a. doi:<https://doi.org/10.1002/jms.1728>.
- Hager, J.W., Le Blanc, J.C.Y. (2003). High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument. *Journal of chromatography. A*, [online] 1020(1), pp.3–9. doi:[https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00426-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00426-6).
- Hakme E., Lozano A., Ferrer C., Díaz-Galiano F. J., & Fernández-Alba A. R. (2018). *Analysis of pesticide residues in olive oil and other vegetable oils*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 100, 167–179. doi:10.1016/j.trac.2017.12.
- Harris, C., Gaston, C.P. (2004). Effects of refining predicted chronic dietary intakes of pesticide residues: A case study using glyphosate. *Food Addit. Contam.*, 21, 857–864.
- Hoffmann, E., Stroobant, V. (2007). Mass spectrometry: principles and applications, 3rd edition, John Wiley & Sons, West Sussex, p. 43-55.
- Kamanyire, R., Karalliedde, L. (2004). Organophosphate toxicity and occupational exposure, *Occup. Med.*, 54,69-75. <https://doi.org/10.1093/occmed/kqh018>
- Kemmerich, M., Demarco, M., Bernardi, G., Prestes, O.D., Adaime, M.B., Zanella, R. (2020). Balls-in-tube matrix solid phase dispersion (BiT-MSPD): An innovative and simplified technique for multiresidue determination of pesticides in fruit samples. 1612, pp.460640–460640. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460640>.
- Kim L., Lee D., Cho H.-K., & Choi S.-D. (2019). *Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals*. Trends in Environmental Analytical Chemistry, 22, e00063. doi:10.1016/j.teac.2019.e00063.
- Klimczak, I., Gliszczyńska-Świgło, A. (2015). Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C. *Food Chemistry*, [online] 175, pp.100–105. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.104>.
- Köck-Schulmeyer M, Olmos M, López de Alda M, Barceló D. (2013). Development of a 692 multiresidue method for analysis of pesticides in sediments based on isotope dilution 693 and liquid chromatography-electrospray–tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 694 2013;1305:176-87.
- Kolpin, D.W., Furlong, E.T., Meyer, M.T., Thurman, E.M., Zaugg, S.D., Barber, L.B. and Buxton, H.T. (2002). Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance. *Environmental Science & Technology*, 36(6), pp.1202–1211. doi:<https://doi.org/10.1021/es011055j>.

Kostelac D., Anastassiades M. (2007). *QuEChERS Validation Method for Acidic Pesticides*. CRL Workshop, Valenda, Spain, pp. 34.

Lambropoulou D. & Albanis T. (2007). *Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography-mass spectrometry-based*. Techniques: a review. *Anal Bioanal Chem* 389:1663–1683 DOI 10.1007/s00216-007-1348-2.

Lawal, A., Wong, R.C.S., Tan, G.H., Abdulra'uf, L.B. and Alsharif, A.M.A. (2018). Recent Modifications and Validation of QuEChERS-dSPE Coupled to LC-MS and GC-MS Instruments for Determination of Pesticide/Agrochemical Residues in Fruits and Vegetables: Review. *Journal of Chromatographic Science*, [online] 56(7), pp.656–669. doi:<https://doi.org/10.1093/chromsci/bmy032>.

Lee J, Shin Y, Lee J, Lee J, Kim BJ, Kim J-H (2018) Simultaneous analysis of 310 pesticide multiresidues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach. *Chemosphere* 207:519–526. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.05.116>

Lehotay, S.J., Son, K.A., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., Hoh, E. and Leepitapiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), pp.2548–2560. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>.

Malhat, F., Saber, E.-S., Elsalam Shokr, S.A., Ahmed, M.T., El-Sayed Amin, A. (2019). Consumer safety evaluation of pyraclostrobin residues in strawberry using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS): An Egyptian profile. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 108, p.104450. doi:<https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2019.104450>.

Malik, AK., Blasco, C., Picó, Y. (2010). Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *J Chromatogr A* 1217:4018–4040.

Mebdoua, S., Lazali, M., Ounane, S. M., Tellah, S. & Nabi, F. (2017). Evaluation of pesticide residues in fruits and vegetables from Algeria. *Food Addit. Contam. Part B* 10, 91–98.

Medhe, S. (2018). Ionization Techniques in Mass Spectrometry: A Review. *Mass Spectrometry & Purification Techniques*. 4. 10.4172/2469-9861.1000126.

Mol HGJ, Zomer P, García López M, Fussell RJ, Scholten J, de Kok A (2015). Identification in residue analysis based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry: experimental evidence to update performance criteria. *Anal Chim Acta* 873:1–13

Musarurwa, H., Chimuka, L., Pakade, V. E., & Tavengwa, N. T. (2019). *Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis*. *Journal of Food Composition and Analysis*, 103314. doi:10.1016 / j.jfca.2019.103314.

Naik, R., Pallavi, M.S., Siva, M., A. Shwetha, M. Bheemanna and Ravindra Nidoni (2022). Simultaneous determination of pesticide residues in pomegranate whole fruit and arils using LC-MS/MS. 387, pp.132865–132865. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.132865>.

Nováková, L., Svoboda, P. and Pavlík, J. (2017). Ultra-high performance liquid chromatography. *Liquid Chromatography*, pp.719–769. doi:<https://doi.org/10.1016/b978-0-12-805393-5.00029-4>.

Ohki, A., Kuboyama, N., Koizumi, K., Tanaka, A., Sato, Y., Kohno, H., Boger, P. & Wakabayashi, K. (1999). Mode of action of novel 2-benzylamino-4-methyl-6-trifluoromethyl-1,3,5-triazine herbicides: Inhibition of photosynthetic electron transport and binding studies, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47,4398-4402. DOI: 10.1021/jf990216o

Ortiz-Hernandez, Laura & Enrique, Sanchez-Salinas & Castrejón-Godínez, María & Dantan, Edgar & Popoca, Elida. (2013). Mechanisms and strategies for pesticide biodegradation: Opportunity for waste, soils and water cleaning. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 29. 85-104.

Park, B.K., Kwon, S.H., Yeom, M.S. *et al.* (2022). Detection of pesticide residues and risk assessment from the local fruits and vegetables in Incheon, Korea. *Sci Rep* **12**, 9613. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-13576-5>

Pesticides Database. Available at: <https://food.ec.europa.eu/plant/pesticides/eu-pesticides-%C2%A0data%20base/public/?event=pesticide.residue.selection&language=EN>

Peti, A. P. F., G. A. Locachevic, M. K. B. Prado, L. A. B. de Moraes, and L. H. Faccioli (2018). High-resolution multiple reaction monitoring method for quantification of steroidal hormones in plasma. *Journal of Mass Spectrometry* 53 (5):423–31. doi:[10.1002/jms.4075](https://doi.org/10.1002/jms.4075).

Qi, P, Wang, Z, Yang G, Shang, C, Xu H, Wang, X, Wang, X. (2015). Removal of acidic interferences in multi-pesticides residue analysis of fruits using modified magnetic nanoparticles prior to determination via ultra-HPLC-MS/MS. *Microchim Acta*. 182:2521–2528. doi:10.1007/s00604-015-1615-4.

Rajski, Ł., Gómez-Ramos, M. del M. and Fernández-Alba, A.R. (2014). Large pesticide multiresidue screening method by liquid chromatography-Orbitrap mass spectrometry in full scan mode applied to fruit and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 1360, pp.119–127. doi:<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.07.061>.

Romniou, S.E., Nana, K., Dasenaki, M., Komaitis, E. and Proestos, C. (2022). Development and Validation of Pesticide Residues Determination Method in Fruits and Vegetables through Liquid and Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS and GC-MS/MS) Employing Modified QuEChERS Method and a Centrifugal Vacuum Concentrator. *Agriculture*, 12(11), p.1936. doi:<https://doi.org/10.3390/agriculture12111936>.

SANCO/12571/2013 (2013) Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed

Sandín-España, P., Mateo-Miranda, M.M., López-Goti, C., Seris-Barrallo, E. and José Luis Alonso-Prados (2022). Analysis of Pesticide Residues by QuEChERS Method and LC-MS/MS for a New Extrapolation of Maximum Residue Levels in Persimmon Minor Crop. 27(5), pp.1517–1517. doi:<https://doi.org/10.3390/molecules27051517>.

Santana-Mayor A., Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A. V., & Rodríguez-Delgado M. A. (2019). *Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 116, 214–235. doi: 10.1016/j.trac.2019.04.018.

SANTE/11813/2017 (2017). Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.

SANTE/12682/2019 (2019) A guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. European commission.

Sharma, A, Kumar, V, Shahzad, B, et al. (2019). Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. *SN Applied Sciences*. 1:1446.

Shashirekha, M. N., Mallikarjuna, S. E. & Rajarathnam, S. (2015). Status of bioactive compounds in foods with focus on fruits and vegetables. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **55**, 1324–1339.

Shizuka, S., Nemoto, S., Teshima, R. and Akiyama, H. (2015). Quantitative analysis of pesticide residues in vegetables and fruits by liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. pp.1–9. doi:<https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1109714>.

Sivaperumal, P., Salauddin, A., Ramesh Kumar, A., Santhosh, K. and Rupal, T. (2017). Determination of Pesticide Residues in Mango Matrices by Ultra High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*, 10(7), pp.2346–2357. doi:<https://doi.org/10.1007/s12161-016-0779-9>.

Skoog, H.N., Holler, F.J., Crouch S.R. (2010). Αρχές ενόργανης ανάλυσης, 6η έκδοση, Εκδόσεις Κωσταράκη, σελ. 816-837.

Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., Asensio-Ramos, M., & Hernández-Borges, J. (2015). *Dispersive Solid-Phase Extraction. Analytical Separation Science*, 1525–1570.

Ssemugabo, C, Bradman ,A, Ssempebwa, JC, Sillé, F, Guwatudde, D. (2022). Pesticide Residues in Fresh Fruit and Vegetables from Farm to Fork in the Kampala Metropolitan Area, Uganda. *Environ Health Insights*.16:11786302221111866. doi:10.1177/11786302221111866

- Stachniuk, A., Fornal, E. (2016). Liquid chromatography – mass spectrometry in the analysis of pesticide residue in food. *Food Anal. Method.* 9, 1654–1665.
- Storm, J., Rozman, K. & Doull, J. (2000). Occupational exposure limits for 30 organophosphate pesticides based on inhibition of red blood cell acetylcholinesterase, *Toxicology*, 150, 1-29. doi:10.1016/s0300-483x(00)00219-5
- Suganthi, A., Nikita, S.A., Kousika, J., Bhuvaneswari, K. and Sridharan, S. (2018). Determination of thiamethoxam residues in banana stem and fruit through LC-MS/MS. *Environmental Monitoring and Assessment*, 190(5). doi:https://doi.org/10.1007/s10661-018-6655-x.
- Tadeo, J.L. (2008). *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, 2nd Edition, New York : CRC Press.
- Tu, F.-Q, Yang, M. (2021). Determination of Pesticides in Apples by High-Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (HPLC–MS) with High-Resolution Multiple Reaction Monitoring. 55(3), pp.438–448. doi:https://doi.org/10.1080/00032719.2021.1938594.
- Wang X, Wang S, Cai Z (2013) The latest developments and applications of mass spectrometry in food-safety and quality analysis. *Trends Anal Chem* 52:170–185
- Wang, H., Ping, H., Liu, Q., Han, P. and Guo, X. (2021). Determination of Pesticide Residues in Strawberries by Ultra-performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. 15(1), pp.85–95. doi:https://doi.org/10.1007/s12161-021-02102-4.
- Watson, T., Sparkman, D. (2007). *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*, 4th Edition, Wiley.
- www.efsa.europa.eu. (n.d.). *Pesticides* | EFSA. [online] Available at: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/pesticides>.
- XING, L., WANG, Y., LUO, R., LI, X. and ZOU, L. (2022). Determination of 31 pesticide residues in wolfberry by LC-MS/MS and dietary risk assessment of wolfberry consumption. *Food Science and Technology*, 42. doi:https://doi.org/10.1590/fst.61921.
- Yang, X., Luo, J., Duan, Y., Li, S. and Liu, C. (2018). Simultaneous analysis of multiple pesticide residues in minor fruits by ultrahigh-performance liquid chromatography/hybrid quadrupole time-of-flight mass spectrometry. 241, pp.188–198. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.102.
- Yanofsky, C.M., Kearney, R.E., Souad Lesimple, John J.M. Bergeron, Boismenu, D., Carrillo, B. and Alexander Graham Bell (2008). A Bayesian approach to peptide identification using Accurate Mass and Time tags from LC-FTICR-MS proteomics experiments. doi:https://doi.org/10.1109/iembs.2008.4650030.

Yuan, X., Kim, C.J., Lee, R., Kim, M., Shin, H.J., Kim, L., Jeong, W.T., Shin, Y., Kyung, K.S. and Noh, H.H. (2022). Validation of a Multi-Residue Analysis Method for 287 Pesticides in Citrus Fruits Mandarin Orange and Grapefruit Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Foods (Basel, Switzerland)*, [online] 11(21), p.3522. doi:<https://doi.org/10.3390/foods11213522>.

Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A., & Chen, F. (2012). *A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods*. *Open Chemistry*, 10 (3). doi:10.2478/s11532-012-0034-1.

Zhang, Y., Si, W., Chen, L., Shen, G., Bai, B. and Zhou, C. (2021). Determination and dietary risk assessment of 284 pesticide residues in local fruit cultivars in Shanghai, China. *Scientific Reports*, [online] 11(1), p.9681. doi:<https://doi.org/10.1038/s41598-021-89204-5>.

Zhu, J., Goodall, D., Wren, S. (2005). *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and Its Applications*, LCGC, London, pp. 54-72

Žuvela, P., Skoczylas, M., Liu, J.J., Bączek, T., Kaliszan, R., Wong, M.W., Buszewski, B. and Héberger, K. (2019). Addition: Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*, 119(7), pp.4818–4818. doi:<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.9b00167>.

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.