

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ**  
**ΠΜΣ «ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΑ»**  
**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**



**ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ  
ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ**

**«ΠΟΙΟΤΙΚΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ  
ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΡΥΠΑΝΤΩΝ ΚΑΙ  
ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΣΕ ΜΕΛΙΣΣΕΣ ΚΑΙ  
ΜΕΛΙΣΣΟΚΟΜΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΜΕΣΩ  
LC-ESI-MS/MS»**

---

***Παναγιώτα Κουρούμαλου-Λιαρούση***

***Επιβλέπων Καθηγητής: Κωνσταντίνος Κασιώτης***

***Μέλη τριμελούς επιτροπής:***

***Κωνσταντίνος Κασιώτης***

***Δημήτριος Κουρέτας***

***Ζωή-Βασιλική Σκαπέρδα***

***Λάρισα 2023***

**UNIVERSITY OF THESSALY**  
**DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY**  
**MASTER «TOXICOLOGY»**  
**MASTER THESIS**



**ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ  
ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ  
ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ**

**«QUALITATIVE AND QUANTITATIVE ANALYSIS  
OF ORGANIC POLLUTANTS AND METABOLITES  
ON BEES AND OTHER APICULTURE  
SUBSTRATES BY LC-ESI-MS/MS»**

---

***Panagiota Kouroumalou-Liarousi***

***Master Thesis Supervisor: Konstantinos Kasiotis***

***Members of Committee:***

***Konstantinos Kasiotis***

***Dimitrios Kouretas***

***Zoe-Vasiliki Skaperda***

***Larissa 2023***

*This page intentionally left blank.*

## ***Ευχαριστίες***

*Με το πέρας της διπλωματικής μου εργασίας, θα ήθελα, καταρχάς, να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, Κωνσταντίνο Κασιώτη για την εμπιστοσύνη και τη σημαντική καθοδήγηση που μου παρείχε καθόλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου εργασίας καθώς και τα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία και την βοήθεια όποτε την χρειαζόμουν. Τέλος, αφιερώνω την παρούσα εργασία στην αγαπημένη μου οικογένεια, που πίστεψε σε εμένα από την αρχή και που με βοήθησε να γίνω ο άνθρωπος που είμαι.*

## Περιεχόμενα

1. Περίληψη.....	7
2. Σκοπός.....	9
3. Εισαγωγή.....	10
3.1 Μέλισσες.....	10
3.1.1 Βιολογικός κύκλος και διαφοροποίηση.....	11
3.1.2 Μέλισσες και επικοινωνία.....	12
3.1.3 Άγριες Μέλισσες ή <i>Wild bees</i> .....	14
3.1.4 Βομβίνος ή <i>Bumble bee</i> .....	16
3.2 Προϊόντα κυψέλης.....	17
3.2.1 Μέλι.....	17
3.2.2 Κερί .....	18
3.2.3 Γύρη .....	19
3.2.4 Βασιλικός πολτός .....	19
3.2.5 Πρόπολη.....	20
3.2.6 Δηλητήριο .....	20
3.3 Γεωργικά Φάρμακα.....	21
3.3.1 Οργανοχλωριούχα Γεωργικά Φάρμακα.....	23
3.3.2 Οργανοφωσφορικά Γεωργικά Φάρμακα.....	25
3.3.3 Καρβαμιδικά Γεωργικά Φάρμακα.....	27
3.3.4 Πυρεθροειδή Γεωργικά Φάρμακα.....	28
3.3.5 Νεονικοτινοειδή Γεωργικά Φάρμακα.....	29
3.3.6 Οφέλη & Επιπτώσεις Γεωργικών Φαρμάκων.....	31
3.3.7 Δηλητηριάσεις μελισσών από γεωργικά φάρμακα.....	32
3.3.8 Τοξικότητα γεωργικών φαρμάκων .....	34
3.4 Χρωματογραφία.....	35
3.4.1 Υγρή Χρωματογραφία.....	36
3.4.1.1 Σύστημα δοχείων κινητής φάσης.....	37
3.4.1.2 Βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών.....	37
3.4.1.3 Σύστημα έγχυσης δείγματος.....	37

3.4.1.4 Αντλία.....	37
3.4.1.5 Προστατευτική Στήλη.....	38
3.4.1.6 Στήλη.....	38
3.4.1.7 Ανιχνευτής.....	38
3.5 Φασματομετρία Μαζών.....	39
3.5.1 Πηγές ιόντων.....	40
3.5.2 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό.....	42
3.5.3 Αναλυτές μαζών.....	44
3.5.4 Σύστημα μεταφοράς ιόντων.....	45
3.5.5 Τετραπολική παγίδα ιόντων.....	46
3.5.6 Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας ή Φασματομετρία Μαζών «σε σειρά» ( <i>tandem mass spectrometry</i> ).....	48
3.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συζευγμένη με Ιοντισμό Ηλεκτροψεκασμού Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας ( <i>LC-MS</i> ).....	50
3.7 Μεθοδολογία <i>QuEChERS</i> .....	52
4. Πειραματικό μέρος.....	54
4.1 Οργανολογία και Αντιδραστήρια.....	54
4.2 Πειραματική διαδικασία.....	54
5. Ανάλυση Αποτελεσμάτων.....	62
5.1 Δείγμα Μελισσών.....	62
5.2 Δείγμα Μελιού.....	70
5.3 Δείγμα Κηρήθρας.....	82
5.4 Δείγμα Γύρης.....	97
6. Συμπεράσματα.....	105
7. Βιβλιογραφία.....	108
8. Παράρτημα.....	109

## 1. Περίληψη

Στην συγκεκριμένη ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε ποιοτική και ποσοτική χημική ανάλυση διαφόρων ειδών μελισσοκομικών δειγμάτων με τη μέθοδο *Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης* συζευγμένης με *Ιοντισμό Ηλεκτροψεκασμού Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας (LC-ESI-MS/MS)*. Πιο συγκεκριμένα, αναλύθηκαν συνολικά 22 δείγματα ελληνικής προέλευσης, από τα οποία 7 ήταν μελισσών, 5 ήταν μελιού, 7 ήταν κηρήθρας και 3 ήταν γύρης. Η κατεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με τη μεθοδολογία QuEChERS και η εισαγωγή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο όργανο *Agilent Technologies 6410 Series Triple Quad LC/MS, Model: G6410B*. Επίσης πραγματοποιήθηκε περαιτέρω θραυσματοποίηση ώστε να γίνει η ταυτοποίηση των διαφόρων πιθανών ευρημάτων με την αντίστοιχη αναζήτηση θραυσμάτων που είχε οριστεί στη τρέχουσα μέθοδο του οργάνου και πραγματοποιήθηκε εξαγωγή των φασμάτων. Η καταγραφή και επεξεργασία αυτών πραγματοποιήθηκε στο λογισμικό *MassHunter Workstation Software*.

Για την επίτευξη της συγκεκριμένης ανάλυσης, επιλέχθηκαν κινητές φάσεις, A: H<sub>2</sub>O/ 0.1% φορμικό οξύ/ 0.02% ACN/ 314 mg Φορμικό Αμμώνιο και B: Μεθανόλη/ 0.1% φορμικό οξύ/ 314 mg Φορμικό Αμμώνιο, ενώ επιλέχτηκε βαθμιδωτή έκλυση, και ρύθμιση παραμέτρων όπως της ροής του διαλύτη στα 0.28mL/min (πίεση 160-180 bar).

Κατά την ανάλυση των δειγμάτων προσδιορίστηκαν και ταυτοποιήθηκαν αρκετά φυτοφάρμακα όπως το *Acetamiprid*, το *Carbendazim*, το *Thiacloprid* και άλλα, με εντάσεις σημάτων 10<sup>3</sup> με 10<sup>5</sup> και χρόνους κατακράτησης όπως αναγράφονται και βιβλιογραφικά, με αποτέλεσμα η ταυτοποίηση να γίνεται με βεβαιότητα και ακρίβεια. Υπάρχουν δυνατότητες βελτίωσης στα χρωματογραφικά χαρακτηριστικά προκειμένου να υπάρχουν περισσότερο οξείες κορυφές με αξιοσημείωτες εντάσεις σημάτων ενώ προτάσεις βελτιστοποίησης για ένα πιο ολοκληρωμένο αναλυτικό αποτέλεσμα θα μπορούσε να είναι η ανάλυση των ίδιων μελισσοκομικών υποστρωμάτων με αντίστοιχη οργανολογία Αέριας Χρωματογραφίας για τη πιθανή ανίχνευση ουσιών συμβατών με αυτή.

## ***1. Abstract***

In this research master thesis, a qualitative and quantitative chemical analysis of various types of beekeeping samples was performed using the method of *High Performance Liquid Chromatography* coupled with *Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry (LC-ESI-MS/MS)*. More specifically, a total of 22 samples of Greek origin were analyzed, of which 7 were bees, 5 were honey, 7 were wax and 3 were pollen. The sample preparation was carried out with the QuEChERS technique and the insertion of the samples was held into the instrument *Agilent Technologies 6410 Series Triple Quad LC/MS, Model: G6410B*. Further fragmentation was performed in order to identify the various potential components of each sample according to existing multiple reaction monitoring transitions of the instrument and the spectra were extracted. The recording and processing of these were completed in the *MassHunter Workstation Software*.

To conduct this specific analysis, the following mobile phase was chosen, A: H<sub>2</sub>O/ 0.1% Formic acid/ 0.02% ACN/ 314 mg Ammonium formate and B: Methanol/ 0.1% Formic acid/ 314 mg Ammonium formate, while applying a gradient elution with a flow rate at 0.28 mL/min (initial pressure at 160-180 bar).

During the analysis of the samples, several pesticides such as Acetamiprid, Carbendazim, Thiacloprid and others were identified and determined, with concentrations ranging from the low nanogram scale to 150 ng per g of matrix. The exported spectra from all of the samples are characterized efficient, nevertheless there are capabilities of improvement so that there are more sharp peaks with remarkably peak signal intensities, while optimization suggestions for a more complete result of the analysis process could be the insertion and verification of the beekeeping samples in a corresponding organology of Gas Chromatography.

## 2. Σκοπός

Σύμφωνα με την ανάπτυξη της τεχνολογίας, αλλά και των επιστημών τις τελευταίες δεκαετίες, η αναλυτική χημεία ως κλάδος της επιστημονικής έρευνας έρχεται ολοένα και περισσότερο στο επίκεντρο των επιστημών, μιας και δημιουργείται μία επιτακτική ανάγκη από την ανθρωπότητα για ανάπτυξη νέων, πρωτοπόρων, αποδοτικότερων, αλλά και αμεσότερων μεθόδων ενόργανης χημικής ανάλυσης. Συνδιαστικά και με την εφαρμογή της στη σύγχρονη γεωργία, χρησιμοποιείται προκειμένου να ανιχνεύεται μεγάλο πλήθος γεωργικών φαρμάκων με στόχο την αύξηση της γεωργικής παραγωγής και της ποιότητας των αγροτικών προϊόντων, που με λανθασμένη χρήση αυτών οδηγεί σε ευρέας κλίμακας συσσώρευση υπολειμμάτων στα φυτά και δημιουργεί δυσμενείς επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στην ανθρώπινη υγεία.

Στη συγκεκριμένη εργασία παρουσιάζεται ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός γεωργικών φαρμάκων σε διαφόρων ειδών μελισσοκομικά δείγματα με τη μέθοδο της *Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης συζευγμένης με Ιοντισμό Ηλεκτροψεκασμού Φασματομετρίας Μάζας (Liquid-Chromatography-Electrospray-Ionization-Mass-Spectrometry, LC-ESI-MS/MS)*. Η συγκεκριμένη μεθοδολογία υπερτερεί έναντι άλλων, καθώς συνδιάζει την δυνατότητα φυσικού διαχωρισμού της υγρής χρωματογραφίας με την δυνατότητα ανάλυσης μάζας της φασματομετρίας μάζας, κατέχοντας μεγάλη ακρίβεια, αποτελεσματικότητα, ευελιξία, ευαισθησία και επιλεκτικότητα, δημιουργώντας γρήγορα, αξιόπιστα και ολοκληρωμένα δεδομένα ανάλυσης. Για τη προεργασία των δειγμάτων επισημαίνεται ότι ακολουθήθηκε η μεθοδολογία QuEChERS, ακόμα μία αναπτυσσόμενη και αποδοτική μεθοδολογία προεργασίας με αρκετά γρήγορη και εύκολη εκτέλεση καθιστώντας την ελάχιστα επιρρεπή σε σφάλματα και παρέχοντας υψηλές ανακτήσεις για ένα πολύ ευρύ φάσμα γεωργικών φαρμάκων. Σκοπός λοιπόν της διπλωματικής εργασίας είναι η μελέτη και εφαρμογή της ανάλυσης διαφόρων δειγμάτων μελισσοκομικών υποστρωμάτων, με τη χρήση της συγκεκριμένης αναλυτικής τεχνικής.

### 3. Εισαγωγή

#### 3.1 Μέλισσες

Η μέλισσα αποτελεί έναν οργανισμό με αξιοσημείωτη σπουδαιότητα τόσο για τον άνθρωπο όσο και για την φύση και το περιβάλλον μέσα στο οποίο αναπτύσσεται. Συγκεκριμένα, οι μέλισσες είναι υπεύθυνες για το 60-70% της γονιμοποίησης των φυτών και η συνεχής μείωση του πληθυσμού τους έχει απασχολήσει σε μεγάλο βαθμό τους επιστήμονες για αρκετές δεκαετίες, καθώς η εξαφάνισή τους θα συνιστούσε απειλή για μεγάλο μέρος της ζωής στον πλανήτη. Αποτελούν επίσης αξιοσημείωτο παράγοντα στην επικονίαση των καλλιεργειών καθώς επίσης χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα στην περιβαλλοντική παρακολούθηση συμπεριλαμβανομένων των επιπέδων φυτοφαρμάκων σε αυτές.



Εικόνα 1. Μέλισσα

Η κοινή μέλισσα *Apis mellifera* είναι έντομο που ζει σε κυψέλες και η συστηματική κατάταξή της παρουσιάζεται στον πίνακα 1.

Πίνακας 1. Συστηματική κατάταξη της μέλισσας.

<b>Βασίλειο</b>	Ζώα ( <i>Animalia</i> )
<b>Φύλο</b>	Αρθρόποδα ( <i>Arthropoda</i> )
<b>Κλάση</b>	Έντομα ( <i>Insecta</i> )
<b>Τάξη</b>	Υμενόπτερα ( <i>Hymenoptera</i> )
<b>Οικογένεια</b>	Μέλισσες ( <i>Apidae</i> )
<b>Γένος</b>	<i>Apis</i>
<b>Είδος</b>	<i>mellifera</i> Linnaeus

Από όλες τις παραπάνω συστηματικές ομάδες η πιο βασική είναι του είδους, που βασίζεται στην αναπαραγωγική απομόνωση και λιγότερο στα μορφολογικά χαρακτηριστικά.

Σύμφωνα με τον Otis (1991), στο γένος *Apis* υπάρχουν τα εξής 9 είδη:

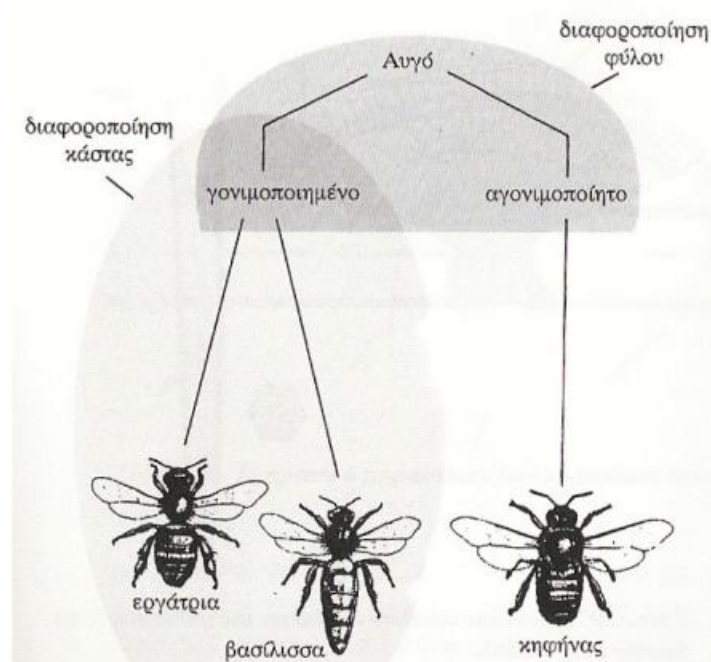
1. *Apis dorsata Fabricius* (γιγαντιαία μέλισσα)
2. *Apis laboriosa F.Smith* (γιγαντιαία μέλισσα)
3. *Apis binghami Cockerell* (γιγαντιαία μέλισσα)

4. *Apis breviligula* Maa (γιγαντιαία μέλισσα)
5. *Apis mellifera* L. (κοινή ή δυτική μέλισσα)
6. *Apis cerana* (ή *A.indica*) Fabricius (ινδική μέλισσα)
7. *Apis koschevnikovi* Buttel-Reepen (κόκκινη μέλισσα)
8. *Apis florea* Fabricius (νάνος μέλισσα)
9. *Apis adreniformis* Smith (νάνος μέλισσα)

Επιπλέον, για την κατάταξη της μέλισσας στις διάφορες φυλές (υποείδη) έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα κριτήρια όπως μορφολογικά γνωρίσματα, μιτοχονδριακό DNA, ή χαρακτηριστικά συμπεριφοράς. Μερικά από τα γνωρίσματα που χρησιμοποιούνται είναι το μέγεθος του σώματος, το χρώμα, το μήκος της κεραίας, το μέγεθος των φτερών, η τριχοφυΐα αλλά και η επιθετικότητα, η ταχύτητα ανάπτυξης του πληθυσμού, η παραγωγή μελιού και άλλα.

### 3.1.1. Βιολογικός κύκλος και Διαφοροποίηση

Σύμφωνα με τον βιολογικό κύκλο, κάθε μέλισσα για να ολοκληρώσει την ανάπτυξή της και να γίνει ενήλικη διέρχεται πρώτα από τρία άλλα στάδια: το αυγό, τη προνύμφη και τη νύμφη. Ανάλογα με την διαφοροποίηση που πραγματοποιείται κατά το στάδιο γονιμοποίησης ή μη του αυγού προκύπτει η «κοινωνία» των μελισσών που αποτελείται από τις εργάτριες, τις βασίλισσες και τους κηφήνες.



Εικόνα 2. Η διαφοροποίηση του φύλλου των μελισσών (βιβλιογραφική αναφορά 21).

Η βασίλισσα έχει σαν μοναδική αποστολή, να εξασφαλίζει τον πολλαπλασιασμό της οικογένειας, και σημειώνεται ότι καθημερινά εναποθέτει περίπου 1500 αυγά, συνεχόμενα, επί δύο έως πέντε έτη. Η ηλικία της βασίλισσας αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη δυναμική του πληθυσμού του μελισσιού και της παραγωγής μελιού και έτσι η μακροβιότητά της μπορεί πολλές φορές να χρησιμοποιηθεί σαν δείκτης της ποιότητάς της.

Ο κηφήνας αποτελεί το μοναδικό αρσενικό της οικογένειας των μελισσών, μόλις το 10% του πληθυσμού της κυψέλης, με μέσο όρο διάρκεια ζωής τις 20-30 ημέρες αναλόγως και την ανθοφορία. Στόχος του κηφήνα αποτελεί η γονιμοποίηση της βασίλισσας για μια φορά και μόνο, η παραγωγή θερμότητας που συμβάλλει στη θερμορύθμιση της γονοφωλιάς, καθώς και η παραλαβή του νέκταρ από τις εργάτριες και η ωρίμανση του μελιού. Μετά της ολοκλήρωσης της διαδικασίας της γονιμοποίησης και επειδή τα γεννητικά όργανα αποκολλώνται, οι κηφήνες αποθνήσκουν.

Τέλος, κάθε οικογένεια αποτελείται από μερικές χιλιάδες θηλυκές μέλισσες, οι οποίες στην πλειοψηφία τους είναι στείρες και λέγονται "εργάτριες". Κατά κανόνα η διάρκεια ζωής τους είναι 35-40 ημέρες την άνοιξη το καλοκαίρι και το φθινόπωρο, ενώ 4-5 μήνες το χειμώνα. Οι εργάτριες, που αποτελούν και το βασικό πληθυσμό, έχουν πολλές και σύνθετες αποστολές, αρχίζοντας από τη δημιουργία των αποθεμάτων τροφών, τον καθαρισμό της κυψέλης, τη φροντίδα και περιποίηση των προνυμφών, τη φροντίδα της βασίλισσας, το κτίσιμο των κελιών, τη συλλογή νερού, τροφής, νέκταρος, γύρης, πρόπολης, μέχρι και τη φύλαξη της κυψέλης.

### ***3.1.2 Μέλισσες και Επικονίαση***

Μία από τις βασικές λειτουργίες των μελισσών είναι η συλλογή του νέκταρος και της γύρης από τα άνθη, με σκοπό την χρησιμοποίησή τους ως τροφή των ίδιων αλλά και για την εκτροφή του γόνου. Ταυτόχρονα λοιπόν με την συλλογή της τροφής από τα άνθη, πραγματοποιείται και η επικονίαση πολλών διαφορετικών ειδών φυτών, η μεταφορά δηλαδή της γύρης από τον ανθήρα ενός άνθους στο στίγμα του ίδιου ή άλλου άνθους, δημιουργώντας με αυτόν τον τρόπο μια αμοιβαία ευεργετική σχέση μεταξύ μελισσών και ανθών. Η ωφέλεια που έχει ο άνθρωπος από την διαδικασία της επικονίασης δε μπορεί να υπολογισθεί επακριβώς αλλά αναφέρεται ότι είναι περίπου 150 φορές μεγαλύτερη από την αξία του μελιού και του κεριού που παράγει η μέλισσα. Ο αριθμός των μελισσών που απαιτείται για τη σωστή επικονίαση είναι ανάλογος

με το είδος της καλλιέργειας, τη πυκνότητα των φυτών, τον αριθμό των ανθέων και άλλα.

Επίσης, ενώ οι μέλισσες εξαρτώνται εξ ολοκλήρου από τα φυτά για τη συλλογή της τροφής τους για την επιβίωσή τους, όλα τα φυτά απεναντίας δεν έχουν την ίδια ανάγκη των μελισσών για επικονίαση. Συγκεκριμένα, πολλά από τα φυτά έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που άλλοτε αποκλείουν ανεπιθύμητες γονιμοποιήσεις και άλλοτε ενισχύουν την αυτογονιμοποίηση. Σαφώς, η μέλισσα δεν είναι το μόνο έντομο που συμβάλει στην επικονίαση, όμως αποτελεί το σημαντικότερο, καθώς συναντάται σε μεγάλους πληθυσμούς, είναι δραστήρια όλο το χρόνο, είναι πολύ καλά μελετημένη η βιολογία της και μπορεί ο άνθρωπος να την εκμεταλλευτεί προς όφελός του. Μπορεί ακόμα να μεταφερθεί σε μεγάλες αποστάσεις, έχει ανθική σταθερότητα, δηλαδή μεταφέρει γύρη μόνο από ένα είδος φυτών κάθε φορά όπου με αυτόν τον τρόπο μεγιστοποιεί την επικονίαση και τέλος αποτελεί έναν πολυτροπικό επικονιαστή.

Μερικά από τα καλλιεργούμενα φυτά που απαιτούν επικονίαση ή που επωφελούνται από την παρουσία της μέλισσας παρουσιάζονται στον πίνακα 2.

*Πίνακας 2. Καλλιεργούμενα φυτά που απαιτούν επικονίαση ή που επωφελούνται με την παρουσία της μέλισσας (βιβλιογραφική αναφορά 1).*

1. Μηδική	24. Μελιτζάνα
2. Διάφορα τριφύλλια	25. Πιπεριά
3. Βίκος	26. Τομάτα
4. Κτηνοτροφικά κουκιά	27. Καρότο
5. Φασόλια	28. Σέλινο
6. Ηλιάνθος	29. Μαϊντανός
7. Ζαχαρότευτλα	30. Γλυκοπατάτα
8. Σόγια	31. Μαρούλι
9. Βαμβάκι	32. Αμυγδαλιά
10. Σπαράγγι	33. Μηλιά
11. Σκόρδο	34. Βερυκοκκιά
12. Πράσσο	35. Αγγινάρα
13. Κρεμμύδι	36. Αβοκάντο
14. Μπάμια	37. Βατομουριά
15. Μπρόκολο	38. Κερασιά
16. Λάχανο Βρυξελλών	39. Εσπεριδοειδή
17. Λάχανο	40. Καστανιά
18. Γογγύλι	41. Ελιά
19. Ρεπανάκι	42. Ροδακινιά
20. Πεπόνι	43. Αχλαδιά

21. Κολοκύθι	44. Δαμασκηλιά
22. Αγγούρι	45. Λωτός
23. Καρπούζι	

### 3.1.3 Άγριες μέλισσες ή *Wild bees*

Οι άγριες μέλισσες ή αλλιώς *wild bees* περιλαμβάνουν πολλά και διαφορετικά είδη μελισσών της υπερκοινογένειας *Apoidea* και παρουσιάζουν διαφορές στην εμφάνιση και το μέγεθος σε σχέση με τις κοινές μέλισσες με τη μικρότερη να έχει μέγεθος μόλις 4 mm και η μεγαλύτερη να φτάνει τα 2,8 cm. Στην πλειονότητα των περιπτώσεων δεν παράγουν μέλι, δεν τσιμπούν και πετούν αρκετά νωρίς και σε αντίξοες συνθήκες.



Εικόνα 3. Άγρια μέλισσα ή *wild bee*

Η ανίχνευση των άγριων μελισσών είναι εύκολη αν σκεφτεί κανείς τα χαρακτηριστικά των μελισσών και ποιες είναι οι μεταξύ τους διαφορές. Συγκεκριμένα, οι μέλισσες έχουν σώμα τριών μερών, το κεφάλι τους έχει δύο καθαρά ορατές, μακριές κεραιές, τα δύο ζεύγη φτερών των μελισσών είναι κεντραρισμένα προς τα πίσω και προσαρτημένα στο μεσαίο τμήμα του σώματος, έχουν συχνά μια ελαφριά εφηβεία και μπορούν να παρατηρηθούν στη συλλογή γύρης ή νέκταρος. Όσον αφορά τις διαφορές, στις κοινές μέλισσες, οι εργάτριες συνήθως έχουν προεξέχουσες τρίχες στα μεγάλα σύνθετα μάτια τους, σε αντίθεση με τις άγριες μέλισσες όπου αυτό συμβαίνει μόνο στις μέλισσες με κώνους. Επιπλέον, η μέλισσα δεν έχει την ώθηση στα πίσω πόδια της, εναντιθέσι με τις άγριες μέλισσες όπου η ώθηση είναι πάντα παρούσα.

Όσο διαφορετικά φαίνονται τα διάφορα είδη άγριων μελισσών, τόσο διαφορετικός είναι και ο τρόπος ζωής τους. Όσον αφορά τον τρόπο ζωής τους, διακρίνονται τέσσερα διαφορετικά είδη άγριων μελισσών: 1) οι μοναχικές μέλισσες, 2) οι κοινωνικές μέλισσες, 3) οι κοινές άγριες μέλισσες και 4) οι μέλισσες κούκου.

Αναλυτικότερα, οι μοναχικές μέλισσες, χτίζουν τις φωλιές τους χωρίς τη βοήθεια ομοειδών και φροντίζουν μόνες τους τον γόνο τους. Οι κοινωνικές μέλισσες, από την άλλη, θυμίζουν περισσότερο τον κλασικό τρόπο ζωής των κοινών μελισσών όπου ζουν μαζί σε κοινότητες και έχουν στενή σχέση μεταξύ τους. Ανάλογα με το είδος της άγριας μέλισσας, αυτές οι κοινότητες μπορεί να έχουν λίγες ή αρκετές χιλιάδες μέλισσες και μπορεί να έχουν μια ιεραρχία

ποικίλης αυστηρότητας. Στο μέσον μεταξύ των μοναχικών και κοινωνικών μελισσών βρίσκονται οι κοινές άγριες μέλισσες. Εδώ, δύο ή περισσότερα θηλυκά της ίδιας γενιάς συχνά ζουν μαζί σε μια φωλιά αλλά φροντίζουν αποκλειστικά τα δικά τους κύτταρα γόνου. Ο τελευταίος τρόπος ζωής έχουν οι μέλισσες κούκου όπου φωλιάζουν στις φωλιές ξένων μελισσών και κλέβουν τη τροφή αυτών.

Μερικά παραδείγματα μοναχικών άγριων μελισσών αποτελούν οι *xylocopa violacea*, οι *osmia careulescens*, οι *osmia bocornis*, οι *anthidium florentinum*, οι *megachile parientina*, οι *anthophora plumipes* και οι *hylaeus punctatus*. Μερικά παραδείγματα κοινωνικών άγριων μελισσών αποτελούν οι *bombus terrestris* και οι *lasioglossum malachurum*.

Πίνακας 3. Κατάταξη άγριων μελισσών (βιβλιογραφική αναφορά 1).

Άγριες μέλισσες	Τύπος	Διαστάσεις	Χαρακτηριστικά	Φωλιά
<i>xylocopa violacea</i>	Μοναχική	2.5-5cm	Μαύρο Μπλε	Μέσα σε νεκρό ξύλο
<i>osmia careulescens</i>	Μοναχική	10-11mm	Σκούρο μπλε-μαύρο ή πράσινο μεταλλικό Αραιό τρίχωμα	Μέσα σε υπάρχουσες κοιλότητες
<i>osmia bocornis</i>	Μοναχική	10-12mm 8-10mm	Τριχρωματική όρση	Τρύπες ή Μίσχους
<i>anthidium florentinum</i>	Μοναχική	18mm 12mm	Μαύρη κοιλιά με κίτρινες ζώνες	Έδαφος με ανθοφορία
<i>megachile parientina</i>	Μοναχική	-	Ευέλικτο σώμα πολύ τριχωτή κοιλιά	Σκληρές από λάσπη σε βραχώδεις περιοχές ή τοίχους
<i>anthophora plumipes</i>	Μοναχική	13-15mm	Τριχωτά πόδια	Κατακόρυφες κατατομές εδάφους ή άμμος
<i>hylaeus punctatus</i>	Μοναχική	1cm	Μαύρες Λευκές ή Κίτρινες ρίγες	Ξηρούς μίσχους Κοιλότητες φυτών
<i>bombus terrestris</i>	Κοινωνική	20-22mm 14-16 mm 11-17mm	Κίτρινο Μαύρο Πυκνό τρίχωμα	Υπογείως
<i>lasioglossum malachurum</i>	Κοινωνική	1cm	Ισχυρό κέλυφος	Σκληρό, Συμπαγές έδαφος

Όπως και οι μέλισσες, οι άγριες μέλισσες είναι επίσης απαραίτητες για τη βιοποικιλότητα καθώς παίζουν το ρόλο των επικονιαστών. Στην πραγματικότητα, οι άγριες μέλισσες είναι ακόμη πιο σημαντικές σε αυτόν τον ρόλο από τις μέλισσες. Λόγω της εξειδίκευσής τους σε ορισμένα είδη φυτών,

αποτελούν σημαντικό κλειδί για τη διατήρηση πολλών ιθαγενών φυτικών ειδών, καθώς έχουν προσαρμοστεί ακριβώς σε αυτά μέσω εξελικτικών διαδικασιών. Πολλές καλλιέργειες γονιμοποιούνται από μέλισσες, συμπεριλαμβανομένων των άγριων μελισσών και αυτό όχι μόνο διασφαλίζει τον πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών μας, αλλά έχει επίσης αντίκτυπο στην απόδοση των καλλιεργειών. Και εδώ, επίσης, υπάρχουν φυτά που μπορούν να επικονιαστούν μόνο από άγριες μέλισσες όπως για παράδειγμα οι ντομάτες.

### 3.1.4 Βομβίνος ή *Bumble bee*

Ο βομβίνος, γνωστός και ως βόμβος, μπάμπουρας, ντάβανος κατατάσσεται στις αγριομέλισσες του γένος *Bombus* με διάρκεια ζωής τις 28 ημέρες. Ο βομβίνος οφείλει την ονομασία του στην ελληνική λέξη βόμβος που σημαίνει θόρυβος, δηλαδή το χαρακτηριστικό "βόμβο" που παράγεται κατά την πτήση του. Αποτελεί επίσης υποκατηγορία των άγριων μελισσών όπως παρουσιάστηκε παραπάνω.



Εικόνα 4. Βομβίνος ή *bumble bee*

Είναι οι φυσικοί επικονιαστές για πολλά φυτά και ανήκουν στην κατηγορία των ωφέλιμων εντόμων. Ως έντομα, έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων για τη μελέτη της βιολογίας τους, της κοινωνικής τους συμπεριφοράς και δομής, της οικολογίας τους, της συστηματικής τους κατάταξης και άλλα.

Παγκοσμίως είναι γνωστά περίπου 250 είδη βομβίνων, με 38 περίπου υπογένη, και συγκεκριμένα στην Ευρώπη έχουν αναγνωριστεί περίπου 70 είδη, από τα οποία στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί έως τώρα 34.

Πίνακας 4. Συστηματική κατάταξη του βομβίνου.

<b>Βασίλειο</b>	Ζώα ( <i>Animalia</i> )
<b>Φύλο</b>	Αρθρόποδα ( <i>Arthropoda</i> )
<b>Κλάση</b>	Έντομα ( <i>Insecta</i> )
<b>Τάξη</b>	Υμενόπτερα ( <i>Hymenoptera</i> )
<b>Οικογένεια</b>	Μέλισσες ( <i>Apidae</i> )
<b>Γένος</b>	Βόμβος <i>Latreille 1802</i>

Ο βιολογικός κύκλος των βομβίνων είναι τυπικός των κοινωνικών υμενοπτέρων, όπου οι αποικίες είναι ετήσιες και αναπτύσσονται σε φωλιές που

ανάλογα με το είδος είναι επιφανειακές ή υπόγειες. Οι βομβίνοι ποικίλλουν σε εμφάνιση, αλλά είναι γενικά μεγαλύτεροι, πιο φαρδιοί και εύσωμοι σε σχέση με τις κοινές μέλισσες με αρκετά πιο πυκνό τρίχωμα. Πολλά είδη έχουν ευρείες χρωματικές ζώνες, τα σχέδια των οποίων βοηθούν στη διάκριση των διαφορετικών ειδών. Οι περισσότεροι βομβίνοι είναι κοινωνικά έντομα που σχηματίζουν αποικίες με μία βασίλισσα. Οι αποικίες αυτών μάλιστα είναι μικρότερες από αυτές των μελισσών, και φτάνουν σε μόλις 50 στελέχη ανά φωλιά.

Όπως οι μέλισσες έτσι και οι βομβίνοι τρέφονται με νέκταρ, το εναποθέτουν στις αποθήκες στη φωλιά τους και γύρη για να ταΐσουν τα μικρά τους. Αναζητούν τροφή χρησιμοποιώντας το χρώμα και τις χωρικές σχέσεις για να αναγνωρίσουν τα λουλούδια από τα οποία θα τραφούν. Η μείωση που έχει προκληθεί στον πληθυσμό τους οφείλεται στην απώλεια οικοτόπων-ενδιαιτημάτων, τη μηχανοποίηση της γεωργίας και σε κάποιες περιπτώσεις στην μη ορθολογική χρήση των γεωργικών φαρμάκων.

### **3.2 Προϊόντα κυψέλης**

Η μέλισσα παράγει έξι θαυμάσια προϊόντα που χρησιμοποιεί ο άνθρωπος: μέλι, πρόπολη, γύρη, κερί, βασιλικό πολτό και δηλητήριο. Για τα τρία πρώτα χρησιμοποιεί πρώτες ύλες από την φύση τις οποίες και συλλέγει, ενώ για τα υπόλοιπα καταναλώνει τις πρώτες ύλες και παράγει τα προϊόντα από τους αδένες του σώματός της. Καθένα από τα προϊόντα είναι μοναδικό στη σύστασή, στις ιδιότητες και στη βιολογική του αξία, ενώ κατέχει ιδιαίτερη αξία στη διατροφή και στην υγεία του ανθρώπου.

#### **3.2.1. Μέλι**

Το μέλι είναι το τρόφιμο που συλλέγουν οι μέλισσες από τα ζωντανά μέρη των φυτών ή από εκκρίσεις εντόμων, που μεταφέρουν στη κυψέλη τους, μεταποιούν, εμπλουτίζουν με δικές τους ουσίες και αποθηκεύουν στις κηρήθρες τους, μέχρι να ωριμάσει. Οι μέλισσες

παράγουν επίσης το μέλι από το νέκταρ που συλλέγουν, το οποίο υπόκειται σε διεργασίες όπως η χημική αλλαγή των σακχάρων από τα οποία αποτελείται, η απομάκρυνση του νερού καθώς και ο εμπλουτισμός ουσιών από τις ίδιες τις μέλισσες. Το μέλι επίσης ταξινομείται με πολλούς τρόπους σύμφωνα με τη



*Εικόνα 5. Μέλι*

βοτανική ή γεωγραφική του προέλευση, την εποχή και την περιοχή της συλλογής και τη φυσική του κατάσταση.

Το μέλι αποτελεί γνωστό ότι έχει μεγάλη διατροφική αξία σε σχέση με άλλες γλυκαντικές ουσίες. Αποτελείται από απλά σάκχαρα όπως η γλυκόζη και η φρουκτόζη, που αφομοιώνονται εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό και αποτελούν άμεση πηγή ενέργειας. Είναι πλούσιο σε ανόργανα συστατικά, ένζυμα, οργανικά οξέα και ρυθμιστικές ουσίες που επηρεάζουν τις λειτουργίες των διαφόρων οργάνων, καθώς επίσης και αρωματικές, χρωστικές ουσίες και βιταμίνες που βοηθούν στην απορρόφηση των σακχάρων.

Χαρακτηρίζεται επίσης από μικροβιοκτόνο δράση που βοηθά στην αντιμετώπιση πολλών παθήσεων και γενικότερα συμβάλλει στην υγεία του ανθρώπου.

### 3.2.2. Κερί

Το κερί είναι το προϊόν που παράγουν οι νεαρές εργάτριες μέλισσες. Συγκεκριμένα, οι μέλισσες συνθέτουν το κερί καταναλώνοντας σιρόπι ή μέλι και μία μικρή ποσότητα πρωτεϊνών. Οι τελευταίες πιθανόν χρειάζονται για τη παραγωγή ενζύμων που καταλύουν τις διάφορες χημικές αντιδράσεις κατά τη σύνθεση του κεριού μέσα στο σώμα της μέλισσας. Για να παραχθεί 1 κιλό κερί, πραγματοποιείται κατά μέσο όρο κατανάλωση 8,5 κιλών μελιού. Το καθαρό κερί έχει ακόμα χρώμα λευκό, ενώ το κίτρινο χρώμα του στις κηρήθρες οφείλεται στα λιποδιαλυτά καροτινοειδή που εμπεριέχονται στην γύρη. Όσον αφορά την χημική σύνθεσή του, το κερί αποτελείται από ένα πολύπλοκο μίγμα ουσιών και κατά μέσο όρο περιέχει 16% υδρογονάνθρακες, 31% μονοϋδρικές αλκοόλες, 31% λιπαρά οξέα, 13% υδροξυοξέα, 3% διόλες και 6% άλλες ουσίες όπως χρωστικές, πρόπολη και άλλα. Έχει χαρακτηριστική λεπτή γεύση και μυρωδιά, είναι αδιάλυτο στο νερό αλλά διαλυτό σε αρκετούς οργανικούς διαλύτες και είναι εξαιρετικά σταθερό υλικό.



Εικόνα 6. Κερί

Το κερί μπορεί να προέλθει είτε από παλιές κηρήθρες είτε από απολείσματα κηρηθρών του τρύγου είτε από κομμάτια κηρηθρών αποσπασμένα από τα πλαίσια ή τα τοιχώματα της κυψέλης.

Όσον αφορά την χρησιμότητά του έχει πολλές πρακτικές εφαρμογές. Οι σπουδαιότερες χρήσεις του είναι στην παρασκευή καλλυντικών, στην

κατασκευή λαμπάδων και κεριών, στην κατασκευή φύλλων κηρήθρας, στην φαρμακοβιομηχανία για αλοιφές, επίχρισμα χαπιών, στη ζωγραφική τέχνη και άλλα.

### 3.2.3. Γύρη

Η γύρη είναι οι αρσενικοί γαμέτες των ανθέων, παράγεται στους ανθήρες και έχει μεγάλη σημασία στην επικονίαση των φυτών. Λόγω του ότι η γύρη προέρχεται από μεγάλη ποικιλία φυτών, η χημική της σύσταση είναι φυσικό να παρουσιάζει αρκετά μεγάλη διακύμανση και διαφοροποίηση. Φημίζεται κυρίως για τα ανόργανα συστατικά και τις βιταμίνες που περιέχει και μερικά από τα ιχνοστοιχεία που περιλαμβάνει είναι το Αργίλιο, το Βόριο, το Χλώριο, το Ιώδιο, το Νάτριο, το Νικέλιο, το Πυρίτιο, το Τιτάνιο, το Θείο, το Μολυβδαίνιο και άλλα, με αποτέλεσμα η θρεπτική αξία αυτής να είναι αξιοσημείωτη τόσο για τις ίδιες τις μέλισσες όσο και για τον ίδιο τον άνθρωπο.



Εικόνα 7. Γύρη

Όσον αφορά την χρησιμότητά της, η γύρη μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε προγράμματα βελτίωσης φυτών, στην επικονίαση φρούτων και λαχανικών, στην έρευνα για τις αλλεργίες, στην κατασκευή υποκατάστατων γύρης για τη διατροφή των μελισσών, στην διατροφή του ανθρώπου και κατοικιδίων ζώων, στην βιομηχανία καλλυντικών καθώς και στην φαρμακοβιομηχανία.

### 3.2.4. Βασιλικός πολτός

Ο Βασιλικός πολτός παράγεται στους υποφαρυγγικούς αδένες των νεαρών εργατριών μελισσών και τοποθετείται στα βασιλικά κελιά ως τροφή για τις προνύμφες των βασιλισσών. Ονομάζεται βασιλικός πολτός γιατί είναι η μοναδική τροφή των προνυμφών της βασιλισσας μέλισσας, σε αντίθεση με την τροφή των εργατριών και των κηφηνών, που καλείται εργατικός πολτός, με τη διαφορά ότι ο τελευταίος τροποποιείται μετά την τρίτη μέρα παρασκευής του, με τη προσθήκη μελιού και γύρης. Είναι λευκός, με κρεμώδη υφή, ισχυρά όξινος με ιδιάζουσα οσμή και υπόπικρη γεύση και πρόκειται για αρκετά πλούσια, πρωτεϊνούχος ουσία. Έχει επίσης αρκετά πολύπλοκη χημική σύνθεση με μεγάλη ποσότητα ιχνοστοιχείων και βιταμινών.



Εικόνα 8. Βασιλικός πολτός

Χαρακτηρίζεται ως «θαυματουργή» ουσία καθώς έχει τη δυνατότητα να μετατρέπει την μικρή προνύμφη της εργάτριας σε γόνιμη βασίλισσα με μεγαλύτερη διάρκεια ζωής σε σχέση με τη κοινή μέλισσα. Η βιολογική αξία του βασιλικού πολτού είναι αξιοσημείωτης σημασίας με ευεργετικές επιδράσεις στην υγεία του ανθρώπου και πρόκειται για ένα προϊόν χωρίς τοξικότητα, με ισχυρά αντιβακτηριακή και αντιμυκητιακή δράση συνεπώς η χρήση του στη παρασκευή καλλυντικών και στη θεραπεία πολλών ασθενειών είναι ύψιστης σημασίας.

### **3.2.5. Πρόπολη**

Η πρόπολη ή αλλιώς bee-glue είναι μία κολλώδης ουσία που παράγουν οι μέλισσες, η οποία προκύπτει από την συλλογή ρητινωδών εκκρίσεων και κόμμεων από τους φλοιούς των φυτών, όπου εμπλουτίζεται με κερί, γύρη, ένζυμα και άλλες ουσίες και η οποία



*Εικόνα 9. Πρόπολη*

χρησιμοποιείται εν τέλει στις κυψέλες με σκοπό την στεγανοποίηση, την απολύμανση, την άμυνα και την προστασία από εξωγενείς παράγοντες. Το χρώμα της πρόπολης ποικίλει από καφέ-πράσινο έως καφέ-κόκκινο και εξαρτάται από το φυτό προέλευσής της, από τις προσμείξεις κεριού και γύρης αλλά και από τον χρόνο παραμονής της μέσα στην κυψέλη. Όσον αφορά τη χημική σύνθεσή της, αποτελείται από 30% κερί, 55% ρητίνες και βάλσαμα, 10% αιθέρια έλαια και 5% γύρη. Επιπροσθέτως, έχει πολλές φαρμακολογικές και θεραπευτικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται στην φαρμακευτική βιομηχανία καθώς και στην βιομηχανία καλλυντικών.

### **3.2.6. Δηλητήριο**

Το δηλητήριο της μέλισσας παράγεται στον αδένα του δηλητηρίου, αποθηκεύεται στο σάκο ή αλλιώς στη κύστη του δηλητηρίου και πρόκειται για ένα διαυγές υγρό με χαρακτηριστικό άρωμα και έντονη πικρή γεύση. Η παραγωγή αυτού αρχίζει λίγο πριν ή κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης της εργάτριας μέλισσας και η ποσότητα αυτού έχει αυξητική τάση έως ότου



*Εικόνα 10. Τσίμπημα μέλισσας με κεντρί.*

παραχθεί συνολική ποσότητα ίση με 0,3mg. Σημειώνεται επίσης, πως σε περίπτωση χρησιμοποίησής του από την ίδια την μέλισσα, δεν υπάρχει δυνατότητα ανανέωσης αυτού.

Το κυριότερο συστατικό του είναι το πεπτίδιο μελιτίνη, το οποίο όταν εισέρχεται μέσα σε έναν ζωντανό οργανισμό, απελευθερώνει ισταμίνη από τα μαστικά κύτταρα και αιμολύει τα ερυθρά αιμοσφαίρια προκαλώντας έντονο άλγος και οίδημα. Άλλα συστατικά αποτελούν τα ενεργά πεπτίδια απαμίνη, ντοπαμίνη και το πεπτίδιο καταστροφής κυττάρων (MCD-peptide), καθώς και το ένζυμο φωσφολιπάση A<sub>2</sub>, που αποτελεί το σημαντικότερο αλλεργιογόνο παράγοντα, το ένζυμο υαλουρονιδάση καθώς και άλλοι μονοσακχαρίτες και λιπίδια.

Χρησιμοποιείται ακόμα στην θεραπεία πολλών παθήσεων του ανθρώπου όπως για παράδειγμα στην αντιμετώπιση της ρευματοειδούς αρθρίτιδας ή ακόμα και σε παθήσεις όπως φυματίωση, λύκος ή ακόμα και στην θεραπεία της σκλήρυνσης κατά πλάκας. Η θεραπεία τέλος πραγματοποιείται με επιθέματα πάγου και με χορήγηση αδρεναλίνης, αντιισταμινικών και κορτικοστεροειδών για την αντιμετώπιση των αλλεργικών αντιδράσεων.

### 3.3 Γεωργικά Φάρμακα

Τα γεωργικά φάρμακα ονομάζονται όλες οι χημικές ουσίες ή οι βιολογικοί παράγοντες που προορίζονται για τον έλεγχο παρασίτων, συμπεριλαμβανομένων των ζιζανίων, και στοχεύουν στην καταστολή, εξουδετέρωση, απομάκρυνση ή και θάνατο αυτών. Τα στοχευόμενα παράσιτα μπορεί να είναι έντομα, φυτικά παθογόνα, ζιζάνια, μαλάκια, πουλιά, θηλαστικά, ψάρια, νηματώδη, τερμίτες, βακτήρια και μύκητες και κύριος στόχος των φυτοφαρμάκων αποτελεί η προστασία των φυτών και των καλλιεργειών από αυτά.



Εικόνα 11. Ψεκάσμος καλλιέργειας.

Σύμφωνα με τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας (ΟΤΓ), «κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή ή τον έλεγχο τυχόν επιβλαβών οργανισμών, ορίζεται ως γεωργικό φάρμακο».

Τα γεωργικά φάρμακα έρχονται σε διαφορετικές συνθέσεις όπως σκόνες (D), διαβρέξιμες σκόνες (WP), διαλυτές σκόνες (SP), γαλακτωματοποιήσιμα

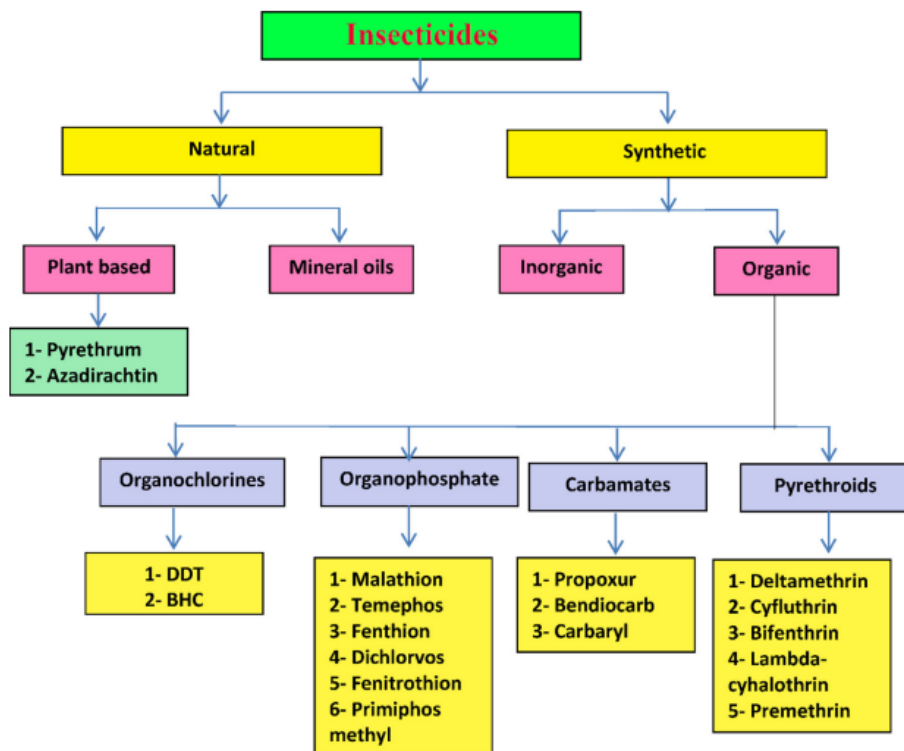
συμπυκνώματα (EC), λύσεις (LS) και κόκκοι (g) και συχνά κατηγοριοποιούνται βάσει:

- του οργανισμού-στόχου,
- την χημική δομή και,
- τη φυσική κατάσταση.

Πιο συγκεκριμένα, ανάλογα με το ποιος είναι οργανισμός-στόχος του εκάστοτε γεωργικού φαρμάκου, παίρνει την ονομασία του από αυτόν, όπως για παράδειγμα το εντομοκτόνο όπου οργανισμός-στόχος θεωρείται οποιοδήποτε έντομο, το ζιζανιοκτόνο όπου οργανισμός-στόχος θεωρείται οποιοδήποτε ζιζάνιο κ.ο.κ. Ανάλογα με την χημική δομή του γεωργικού φαρμάκου υπάρχει και η αντίστοιχη κατηγοριοποίηση, αν είναι για παράδειγμα οργανικό ή ανόργανο, χημικό-συνθετικό ή βιολογικό και όσον αφορά την φυσική κατάσταση, τα γεωργικά φάρμακα κατηγοριοποιούνται σε υγρά ή αέρια.

Στα *βιολογικά* γεωργικά φάρμακα συμπεριλαμβάνονται τα βιοπαρασιτοκτόνα τα οποία είναι φυσικά υλικά ή υλικά που προέρχονται από τη φύση ή από ζωντανούς οργανισμούς όπως φυτά, μύκητες, βακτήρια και τα οποία διακρίνονται σε βιοχημικά, μικροβιακά και φυτικά ενσωματωμένα προστατευτικά γεωργικά φάρμακα.

Τα *συνθετικά* γεωργικά φάρμακα αποτελούν ανθρωπογείς χημικές ουσίες όπου δεν υπάρχουν στη φύση και ταξινομούνται με βάση τη χρήση τους, τη χημική δομή τους, τον τρόπο εισαγωγής και τη δράση τους. Διακρίνονται ακόμα σε *οργανικά* και *ανόργανα*, από τα οποία τα *οργανικά*, με βάση τη χημική τους δομή διακρίνονται επιπλέον σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες, τα *οργανοχλωριωμένα*, τα *οργανοφωσφορικά*, τα *καρβαμιδικά* και τα *πυρεθροειδή*. Λοιπές κατηγορίες γεωργικών φαρμάκων αποτελούν και οι *Φορμαμίδνες*, οι *Δινιτροφαινόλες*, τα *Νεονικοτινοειδή*, οι *Πυρρόλες*, οι *Πυραζόλες*, οι *Πυριδαζιμόνες*, οι *Κιναζολίνες* και τέλος οι *Βενζοϋλουρίες*.



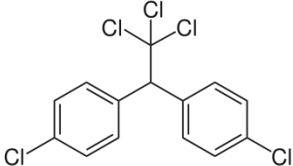
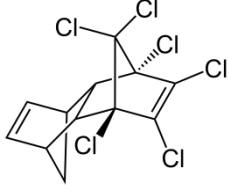
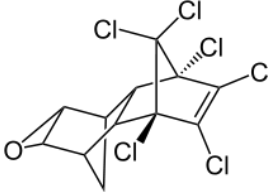
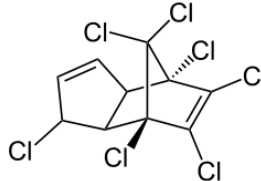
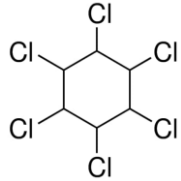
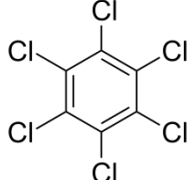
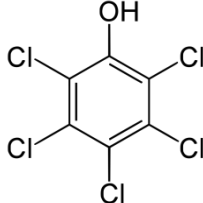
Εικόνα 12. Κατάταξη γεωργικών φαρμάκων σε κατηγορίες (βιβλιογραφική αναφορά 12).

### 3.3.1 Οργανοχλωριωμένα Γεωργικά Φάρμακα

Τα οργανοχλωριωμένα γεωργικά φάρμακα είναι ουσιαστικά χλωριωμένοι κυκλικοί υδρογονάνθρακες όπου διακρίνονται περαιτέρω σε διχλωροδифαινυλαιθάνια, ενώσεις κυκλοδιενίου, και άλλες συγγενείς ενώσεις. Η δράση τους στους οργανισμούς-στόχους τους είναι ως δηλητήριο επαφής, δηλαδή πραγματοποιείται εισχώρηση μέσω του εξωτερικού περιβλήματος και πρόκληση παράλυσης του νευρικού συστήματος, με τη διαφορά ότι ενώσεις όπως είναι το DDT (διχλωρο-δифαινυλο-τριχλωραιθάνιο) δρουν στο Περιφερικό Νευρικό Σύστημα (ΠΝΣ), ενώ ενώσεις κυκλοδιενίων δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα (ΚΝΣ). Οι πρώτες προκαλούν διατάραξη της ισορροπίας μεταξύ των καναλιών νατρίου και καλίου των νευρικών ιών, με αποτέλεσμα να δημιουργείται διαρροή ιόντων νατρίου και να επάγεται διαρκής διέγερση των νευρών, προκαλώντας επαναλαμβανόμενες εκκενώσεις στον νευρώνα είτε αυθόρμητα είτε μετά από ένα μόνο ερέθισμα. Από την άλλη μεριά, τα χλωριωμένα κυκλοδιενία περιλαμβάνουν τα: αλδρίνη, διελδρίνη, ενδρίνη, επταχλώριο, chlordane και endosulfan και όσον αφορά την δράση τους λειτουργούν ως ανταγωνιστές του συμπλόκου GABA (γ-αμινοβουτυρικό οξύ), το οποίο αναστέλλει την ροή χλωρίου στο εκάστοτε νεύρο με

αποτέλεσμα να δημιουργείται υποδιέγερση του νεύρου, τρόμος έως και ένα σύνολο από επιληπτικές κρίσεις.

Πίνακας 5. Οργανοχλωριωμένα γεωργικά φάρμακα.

N/N	ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ			
	Όνομασία	Χημικός τύπος	Χημική Δομή	Οργανισμός-Στόχος
1	DDT	$C_{14}H_9Cl_5$		Κουνούπια Έντομα
2	Aldrin	$C_{12}H_8Cl_6$		Μυρμήγκια Έντομα Τερμίτες
3	Dieldrin	$C_{12}H_8Cl_6O$		
4	Heptachlor	$C_{10}H_5Cl_7$		
5	HCH	$C_6H_6Cl_6$		Ψείρες Σκώρος Μυρμήγκια Κατσαρίδες Έντομα
6	HCB	$C_6Cl_6$		Παράσιτα Έντομα
7	PCP	$C_6HCl_5O$		Μύκητες

### 3.3.2 Οργανοφωσφορικά Γεωργικά Φάρμακα

Τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα αποτελούν φάρμακα τα οποία είναι ουσιαστικά εστέρες, αμίδια ή θειολικά παράγωγα του φωσφορικού, φωσφονικού, θειοφωσφορικού ή τριφωσφορικού οξέος. Πιο συγκεκριμένα, περιέχουν μια πλευρική αλυσίδα φωσφορικού εστέρα, αποτελούμενη από ένα κεντρικό άτομο φωσφόρου συνδεδεμένο με διπλό δεσμό είτε με άτομο οξυγόνου είτε με άτομο θείου και μονό δεσμό σε δύο ομάδες μεθοξύ- ( $-\text{OCH}_3$ ) ή αιθοξύ- ( $-\text{OCH}_2\text{CH}_3$ ). Σε αντίθεση με τα οργανοχλωριωμένα γεωργικά φάρμακα, διασπώνται βιολογικά και δεν αποθηκεύονται εντός ή εκτός των οργανισμών, είναι αρκετά πτητικά και μερικά από αυτά σε μεγάλο βαθμό τοξικά. Χρησιμοποιούνται ως παρασιτοκτόνα επαφής, προστατευτικά φυτών και μυκητοκτόνα.

Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης, ορισμένα νεύρα λειτουργούν απελευθερώνοντας μια χημική ουσία που ονομάζεται ακετυλοχολίνη (ACh) στον ενδοκυτταρικό χώρο, στη σύναψη δηλαδή, όπου ένα νευρικό κύτταρο έρχεται σε επαφή με ένα μυϊκό κύτταρο (ή ένα άλλο νευρικό κύτταρο). Η ACh προκαλεί συστολή του μυϊκού κυττάρου, η οποία διακόπτεται από ένα ένζυμο που ονομάζεται ακετυλχολινεστεράση (AChE), όπου καταστρέφει τα απελευθερωμένα μόρια σήματος ACh. Τα οργανοφωσφορικά λοιπόν γεωργικά φάρμακα συνδέονται χημικά με το ένζυμο AChE, με τέτοιο τρόπο που καταστέλλεται η λειτουργία του συγκεκριμένου ενζύμου για καταστροφή της ACh, και έτσι πραγματοποιείται μία κατάσταση παρατεταμένης συστολής των μυών και παρατεταμένης διέγερσης του νευρικού συστήματος. Το ένζυμο επίσης υφίσταται μη αναστρέψιμη καταστολή και δεν επανενεργοποιείται ούτε αυτόματα αλλά ούτε με αντίδοτο *Obidoxim*.

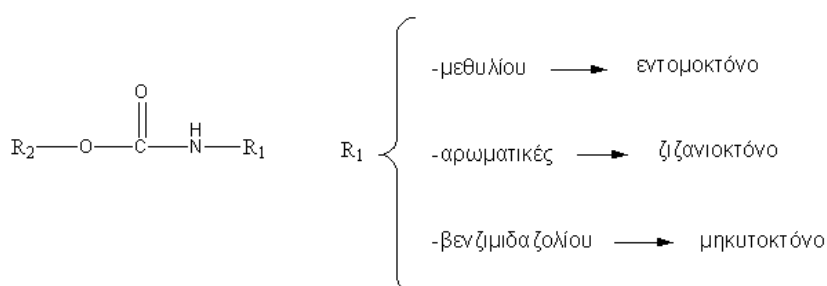
Πίνακας 6. Οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα (βιβλιογραφική αναφορά 30).

<b>ΟΡΓΑΝΟΦΩΣΦΟΡΙΚΑ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ</b>	
Acephate	Isazofos
Azamethiphos	Isofenphos
Azinphos ethyl	Isothioate
Azinphos methyl	Isoxathion
Bromophos	Jodfenphos
Bromophos ethyl	Leptophos
Cadusofos	Malathion
Carbophenylthion	Menazon
Chlormephos	

Chlorphoxim	Mephosfolan
Chlorpyrifos	Methacrifos
Chlorpyrifos-methyl	Methamidophos
Chlorthiophos	Methidathion
Chlorvinohos	Mevinphos
Coumaphos	Monocrotophos
Crotoxyphos	
Crufomate	Naled
Cyanofenphos	
Cyanophos	Omethoate
Demephron -O and -S	Oxydemeton-methyl
Demeton -O and -S	
Demeton-S-methyl	Parathion
Demeton-S-methylsulphon	Parathion-methyl
Dialifos	Phenthoate
Diazinon	Phorate
Dichlofenthion	Phosalone
Dichlorvos	Phosmet
Dicrotophos	Phosphamidon
Dimefox	Phospholan
Dimethoate	Phoxim
Dioxabenzophos	Pirimiphos-ethyl
Dioxathion	Pirimiphos-methyl
Disulfoton	Profenofos
Ditalmifos	Propaphos
	Propetamphos
Edifenphos	Prothiofos
EPBP	Prothoate
EPN	Pyraclofos
ESP	Pyridaphenthion
Ethion	
Ethopropos	Quinlphos
Etrimfos	
	Schradan
Famphur	Sulfotep
Fenamiphos	Sulprofos
Fenclorphos	
Fenitrothion	Temephos
Fensulfothion	TEPP
Fenthion	Terbufos
Fonofos	Tetrachlorvinphos
Formothion	Thiometon
Fosmethilan	Thionazin
	Triazophos
Heptenophos	Trichlorfon
	Vamidothion

### 3.3.3 Καρβαμιδικά Γεωργικά Φάρμακα

Τα καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα είναι ουσιαστικά εστέρες του καρβαμιδικού οξέος, δηλαδή N-μέθυλ (ή N,N-διμέθυλ-) εστέρες καρβαμικού οξέος είτε με φαινόλη (για παράδειγμα carbaryl ή pirimicarb) είτε με οξίμη (για παράδειγμα aldicarb ή methomyl). Πρόκειται για μια κατηγορία εντομοκτόνων δομικά και μηχανιστικά παρόμοια με τα οργανοφωσφορικά (OPs) εντομοκτόνα, όπου προκαλούν καρβαμυλίωση της AChE σε νευρωνικές συνάψεις και νευρομυϊκές συνδέσεις. Σύμφωνα με τον μηχανισμό δράσης, τα οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα προκαλούν μη αναστρέψιμη φωσφορυλίωση της AChE ενώ, τα καρβαμικά γεωργικά φάρμακα συνδέονται αναστρέψιμα με αυτήν. Χρησιμοποιούνται ως εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και ως μηκυτοκτόνα.



Εικόνα 13. Χημικές δομές Καρβαμιδικών γεωργικών φαρμάκων.

Τέλος, είναι αρκετά τοξικές ουσίες, με διάρκεια τοξικότητας να είναι συνήθως μικρότερη από 24 ώρες, και σε περιπτώσεις δηλητηρίασης, συνίσταται η χορήγηση ατροπίνης.

Πίνακας 7. Καρβαμιδικά Γεωργικά Φάρμακα (βιβλιογραφική αναφορά 30).

<b>Καρβαμιδικά Γεωργικά Φάρμακα</b>	
Aldicarb Aminocarb	Methiocarb Methomyl Metolcarb Mexacarbate
Bendiocarb Butocarboxim	Oxamyl
Carbaryl Carbofuran Carbosulfan M-Cumenyl methylcarbamate	Pirimicarb Promecarb Propoxur
Dimetilan	Thiofanox

Ethiofencarb	
Fenobucarb	
Fenoxycarb	
Formetanate	
Formparanate	

### 3.3.4 Πυρεθροειδή Γεωργικά Φάρμακα

Τα πυρεθροειδή γεωργικά φάρμακα είναι ουσιαστικά συνθετικές ενώσεις, παρόμοιες των πυρεθρινών που συναντώνται στα χρυσάνθεμα όπου είναι εστέρες του χρυσανθεμικού οξέος, του πυρεθρινικού οξέος και διαφόρων κετο-αλκοολών. Βάσει των χαρακτηριστικών της δράσης τους, διακρίνονται σε δύο τύπους, τα *πυρεθροειδή τύπου I* και τα *πυρεθροειδή τύπου II* ή *κυανοπυρηθροειδή*. Η βασική τους διαφορά έγκειται στη παρουσία ή μη μιας α-κυανό-ομάδας στη βασική τους δομή. Πρόκειται για γεωργικά φάρμακα με χαμηλή τοξικότητα και γρήγορη αποδόμηση, συνεπώς είναι λιγότερο τοξικά για τον άνθρωπο και το περιβάλλον. Όπως τα οργανοφωσφορικά και τα καρβαμιδικά, έτσι και τα πυρεθροειδή, κύριος όργανο-στόχος της τοξικότητάς τους αποτελεί το νευρικό σύστημα, μιας και αυτά με τη σειρά τους δημιουργούν ανισορροπίες στα κανάλια Na και εν τέλει έχουν ποικίλες νευροτοξικές μη-αναστρέψιμες δράσεις.

Πίνακας 8. Πυρεθροειδή Γεωργικά Φάρμακα (βιβλιογραφική αναφορά 30).

<b>Πυρεθροειδή Γεωργικά Φάρμακα</b>	
Allethrin	Imiprothrin lambda-Cyhalothrin
Bifenthrin	Metofluthrin
Cyfluthrin Cypermethrin Cyphenothrin	Permethrin Phenothrin (Sumithrin) Prallethrin
Deltamethrin Dimefluthrin	Resmethrin
Esfenvalerate Etofenprox	Silafluofen
Fenpropathrin Fenvalerate Flucythrinate	tau-Fluvalinate Tefluthrin Tetramethrin Tralomethrin Transfluthrin

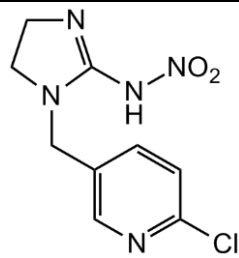
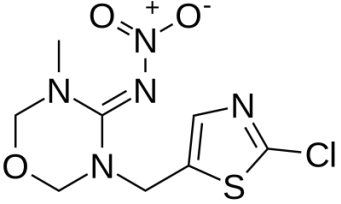
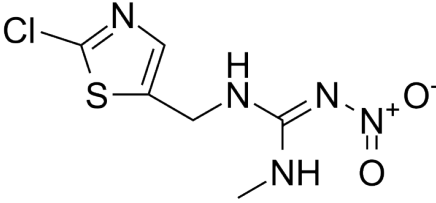
Flumethrin	
------------	--

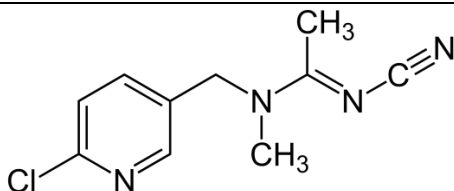
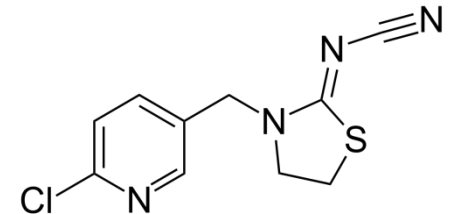
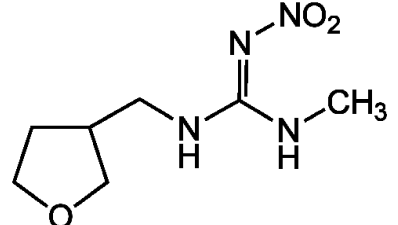
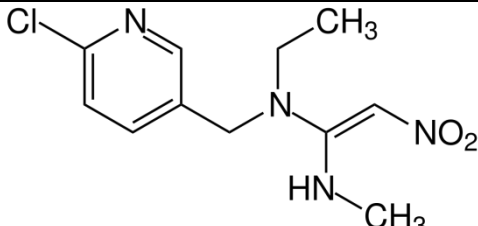
### 3.3.5 Νεονικοτινοειδή Γεωργικά Φάρμακα

Τα νεονικοτινοειδή αποτελούν νέας τεχνολογίας γεωργικά φάρμακα με αρκετά ευρεία εφαρμογή στην καταπολέμηση των παρασίτων και των εντόμων. Παρά την θετική εφαρμογή τους, έχουν συνδεθεί με αρνητικές επιπτώσεις σε πολλούς οργανισμούς, ιδιαίτερα σε αποικίες μελισσών. Η ανάπτυξή τους ξεκίνησε τη δεκαετία του 1980, αλλά χρησιμοποιήθηκαν ευρέως μόλις τη δεκαετία του 1990.

Το όνομα «νεονικοτινοειδή» προέρχεται από την ομοιότητά τους όσον αφορά τη χημική δομή με τη νικοτίνη, το γνωστό διεγερτικό που χρησιμοποιείται στα τσιγάρα. Πρόκειται για μια οικογένεια ενώσεων, με τις τρεις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες να είναι το *Imidacloprid*, η *Thiamethoxam* και η *Clothianidin* ενώ κυκλοφορούν επίσης και τα *Acetamiprid*, *Thiacloprid*, *Dinotefuran* και *Nitenpyram*.

Πίνακας 9. Νεονικοτινοειδή Γεωργικά Φάρμακα.

N/N	ΝΕΟΝΙΚΟΤΙΝΟΕΙΔΗ ΓΕΩΡΓΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ		
	Όνομασία	Χημικός τύπος	Χημική Δομή
1	<i>Imidacloprid</i>	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>	
2	<i>Thiamethoxam</i>	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S	
3	<i>Clothianidin</i>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> S	

4	<i>Acetamiprid</i>	$C_{10}H_{11}ClN_4$	
5	<i>Thiacloprid</i>	$C_{10}H_9ClN_4S$	
6	<i>Dinotefuran</i>	$C_7H_{14}N_4O_3$	
7	<i>Nitenpyram</i>	$C_{11}H_{15}ClN_4O_2$	

Από την αρχική τους χρήση τη δεκαετία του 1990, τα νεονικοτινοειδή έγιναν τα πιο χρησιμοποιούμενα εντομοκτόνα παγκοσμίως. Το συνολικό τους μερίδιο στην παγκόσμια αγορά εντομοκτόνων το 2007 ήταν 24%. Το *Imidacloprid*, που κυκλοφόρησε για πρώτη φορά το 1991, αντιπροσώπευε σχεδόν το 42% αυτού του μεριδίου αγοράς και είναι το εντομοκτόνο με τις μεγαλύτερες πωλήσεις στον κόσμο. Η δημοτικότητά τους, καθώς και η αποτελεσματικότητά τους, είναι συνέπεια του εύρους του πεδίου και τρόπου εφαρμογών τους. Τα περισσότερα από τα επτά εγκεκριμένα νεονικοτινοειδή μπορούν να εφαρμοστούν ως ψεκαστικά φάρμακα στους σπόρους των καλλιεργειών είτε του εδάφους.

Επιπλέον, πρόκειται για συστηματικά γεωργικά φάρμακα, δηλαδή είναι υδατοδιαλυτά και μπορούν να απορροφηθούν από τα φυτά και να διανεμηθούν μέσω των ιστών τους. Όσον αφορά τον μηχανισμό δράσης τους, τα συγκεκριμένα γεωργικά φάρμακα συνδέονται και μπλοκάρουν τους νικοτινικούς υποδοχείς του νευροδιαβιβαστή Ach του ΚΝΣ, με αποτέλεσμα τον αποκλεισμό του συγκεκριμένου νευροδιαβιβαστή και την πρόκληση υπερδιέγερσης που οδηγεί σε παράλυση και σε τελικό στάδιο την θανάτωση του οργανισμού. Είναι σημαντικό να αναφερθεί πως ένα έντομο δεν

χρειάζεται να καταπιεί μεγάλη ποσότητα νεονικοτινοειδούς γεωργικού φαρμάκου για να ασκήσει τη θανατηφόρα επίδρασή του, αλλά ο ακριβής αριθμός είναι, φυσικά, μεταβλητός, ανάλογα με το συγκεκριμένο είδος εντόμου. Η μέση θανατηφόρος δόση κυμαίνεται μεταξύ 1 έως 90 νανογραμμάρια ανά έντομο και απαιτείται αρκετά μικρότερη ποσότητα προκειμένου να παρουσιαστούν τοξικές ιδιότητες σε σχέση με άλλες κατηγορίες φαρμάκων, οπότε για το λόγο αυτό έχει χαρακτηριστεί αρκετά επικίνδυνο για την υγεία και τοξικό γεωργικό φάρμακο συνεπώς η διαχείριση και χρήση του πρέπει να γίνεται με προσοχή.

### ***3.3.5 Οφέλη & Επιπτώσεις Γεωργικών Φαρμάκων***

Λόγω του ότι τα έντομα αποτελούν πολλές φορές φορείς διαφόρων ασθενειών, η εφαρμογή των φυτοφαρμάκων έχει προστατευτικό ρόλο και ενισχύει στη μη μετάδοση και εξάπλωση των διαφόρων ασθενειών. Ακόμα, η εμφάνιση και σύνθεσή τους, είχε ως στόχο τον πιο αποτελεσματικό έλεγχο των εντόμων με ευρύτερο σκοπό της αύξηση της γεωργικής παραγωγής, την βελτίωση της ποιότητας των παραγόμενων προϊόντων καθώς και την μείωση του κόστους παραγωγής της εκάστοτε συνολικής καλλιέργειας.

Από την άλλη μεριά, όπως είναι φυσικό υπάρχουν και πολλές αρνητικές επιπτώσεις, τόσο στο περιβάλλον, σε οργανισμούς στόχους και μη στόχους, όσο και στην ανθρώπινη υγεία.

Αναλυτικότερα, η εμφάνιση τοξικών εκδηλώσεων στον οργανισμό εμφανίζεται να είναι οξεία ή χρόνια, με αρκετά συμπτώματα αντίδρασης λόγω έκθεσης σε αυτά να είναι, ο απλός ερεθισμός του δέρματος και των ματιών, οι σοβαρές νευρολογικές διαταραχές και οι ενδοκρινικές επιδράσεις που επηρεάζουν την αναπαραγωγική ικανότητα και έχουν τερατογόνο αλλά και καρκινογόνο δράση. Πολλές φορές υπάρχει ακόμα και η συσχέτιση με χρόνιες νευροψυχιατρικές διαταραχές, ηπατοτοξικότητα, νεφροτοξικότητα και γενετικές ανωμαλίες.

Όσον αφορά την επίδραση στο περιβάλλον έχει παρατηρηθεί ότι, όσα φυτοφάρμακα δεν καταλήγουν στο οργανισμό-στόχο τους, για παράδειγμα τα εντομοκτόνα στα έντομα, καταλήγουν εν τέλει, λόγω του κύκλου ανακύκλωσης που υπάρχει στη φύση, στην ίδια την ατμόσφαιρα, στο νερό και στο έδαφος, προκαλώντας με αυτόν τον τρόπο την αντίστοιχη περιβαλλοντική ρύπανση. Με τη χρήση ακόμα των γεωργικών φαρμάκων περιορίζεται η βιοποικιλότητα, μέσω μείωσης των επικονιαστών, πλήττονται τα οικοσυστήματα, αποτελώντας έτσι απειλή για τα είδη υπό εξαφάνιση. Ακόμα

ένα μειονέκτημα αποτελεί το γεγονός ότι μετά από κάποιο εύλογο χρονικό διάστημα υπάρχει η πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας, με αποτέλεσμα να απαιτείται όλο και περισσότερη ποσότητα/δόση φυτοφαρμάκων για την επίτευξη απομάκρυνσης των οργανισμών-στόχων από το εκάστοτε σύστημα ενδιαφέροντος όπως αποτελεί μία καλλιέργεια. Κάτι τέτοιο προϋποθέτει την συνεχή ανάπτυξη νέων φυτοπροστατευτικών προϊόντων και γεωργικών φαρμάκων.

Προκειμένου λοιπόν να μειωθούν οι αρνητικές επιπτώσεις, προτιμάται η δημιουργία και ανάπτυξη γεωργικών φαρμάκων, με δυνατότητα ταχείας αδρανοποίησής τους στο περιβάλλον και απώλεια της δραστηριότητας ή της τοξικότητας αυτών να οφείλεται σε έμφυτες χημικές ιδιότητες των ενώσεων ή σε περιβαλλοντικές διεργασίες και συνθήκες. Αν και υπάρχει προθυμία και πραγματοποιείται προσπάθεια για να επιτευχθεί το παραπάνω, πάντα υπάρχει έστω και μια μικρή ποσότητα υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων που παραμένουν και εμφανίζουν κάποια τοξική δράση, παρόλα αυτά περιορίζεται στο ελάχιστο με την ορθή γεωργική πρακτική.

### ***3.3.6 Δηλητηριάσεις μελισσών από γεωργικά φάρμακα***

Οι δηλητηριάσεις ή αλλιώς τοξικώσεις των μελισσών αποτελούν μία από τις αρκετές αιτίες απώλειας μελισσών. Ανάλογα με την προέλευσή τους ταξινομούνται σε χημικές και φυσικές. Πιο συγκεκριμένα, οι χημικές έχουν σχέση με τις διάφορες δραστηριότητες και παρεμβάσεις του ανθρώπου στη φύση, συμπεριλαμβάνοντας δηλητηριάσεις από γεωργικά φάρμακα, δηλητηριάσεις από λανθασμένη χρήση μελισσοφαρμάκων καθώς και δηλητηριάσεις από κατάλοιπα βιομηχανιών. Από την άλλη μεριά, οι φυτικές οφείλονται στη κατανάλωση γύρης, νέκταρος ή μελιτοεκκριμάτων ορισμένων φυτών, τα οποία παρουσιάζουν τοξικές ιδιότητες για τις μέλισσες. Ενώ η σχέση των μελισσών και των καλλιεργητών θα έπρεπε να είναι αμοιβαίας προσπάθειας και συνεργασίας για τη μέγιστη απόδοση και όφελος, οι καλλιεργητές/γεωργοί με τη χρήση πολλών γεωργικών φαρμάκων που εφαρμόζουν στις καλλιέργειές τους, σε αρκετές δε περιπτώσεις με τη μη ορθολογική χρήση τους, μπορούν να οδηγήσουν σε περιστατικά θανάτωσης των μελισσών. Οι δηλητηριάσεις αυτές συμβαίνουν είτε λόγω εφαρμογής εντομοκτόνων κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας, είτε μέσω μεταφοράς των εντομοκτόνων, λόγω ανέμου, σε ανθισμένες καλλιέργειες ή σε μελισσοκομεία, είτε λόγω ψεκάσμού της ανθισμένης άγριας βλάστησης που αναπτύσσεται κάτω από την καλλιέργεια, είτε λόγω επαφής των μελισσών με τα υπολείμματα

εντομοκτόνων που εμφανίζεται να υπάρχουν πάνω στα φυτά ή στο νερό, είτε, τέλος, λόγω συλλογής μολυσμένης γύρης και νέκταρος.



*Εικόνα 14. Επαφή μέλισσας με φυτοφάρμακο.*

Επιπρόσθετα, οι μέλισσες επηρεάζονται από τα γεωργικά φάρμακα όταν έρχονται σε άμεση επαφή με σταγονίδια στον αέρα ή όταν επικάθονται σε ψεκασμένη επιφάνεια. Ακόμα, τα γεωργικά φάρμακα μπορούν να εισέλθουν στο σώμα της μέλισσας είτε από το στόμα είτε από το αναπνευστικό σύστημα, επηρεάζοντας σε

δεύτερη φάση και το πεπτικό συστήμά της ώστε να μην μπορεί η ίδια να τραφεί αλλά και το νευρικό συστήμά της ώστε να μη πραγματοποιεί τις φυσιολογικές της λειτουργίες όπως το χτύπημα των φτερών και των ποδιών της και άλλα. Σε πολλές περιπτώσεις ο θάνατος είναι ακαριαίος, στη καλλιέργεια, αλλά δεν αποκλείεται να συμβεί και λίγο αργότερα, αφού έχει επιστρέψει στη κυψέλη της.

Σημειώνεται πως οι σκόνες και οι ψεκασμοί με βρέξιμες σκόνες γεωργικών φαρμάκων είναι συνήθως πιο τοξικές σε σχέση με τους ψεκασμούς με υγρά σκευάσματα όπως είναι για παράδειγμα τα γαλακτωματοποιήσιμα συμπυκνώματα, ενώ ακόμα τα κοκκώδη γεωργικά φάρμακα είναι λιγότερο επικίνδυνα, διότι η τοξική ουσία είναι εμποτισμένη μέσα στο εκάστοτε κόκκο του αδρανούς υλικού και δεν έρχεται σε άμεση επαφή με την ίδια τη μέλισσα.

Προκειμένου λοιπόν οι δηλητηριάσεις των μελισσών από γεωργικά φάρμακα να ελαχιστοποιούνται είναι αναγκαίο και αναγράφεται στην ετικέτα του προϊόντος, οι ψεκασμοί να πραγματοποιούνται αργά το βράδυ ή πολύ νωρίς το πρωί, καθώς η μέλισσα τις ώρες εκείνες βρίσκεται μέσα στη κυψέλη της και δεν πετάει στις καλλιέργειες. Επίσης, είναι χρήσιμο να παρασκευάζονται φυτοφάρμακα με μικρή υπολειμματική δράση, που διασπώνται γρήγορα και μεταβολίζονται σε αδρανή και μη τοξικά παραπροϊόντα. Η πρόληψη είναι σημαντικό κομμάτι της ζωής του ανθρώπου, συνεπώς η καλή εκπαίδευση και ενημέρωση σε ζητήματα προστασίας και σημαντικότητας της ίδιας της μέλισσας για τη ζωή και εξέλιξη του ανθρώπου, θα ενισχύσει την αποφυγή δηλητηριάσεων και θα δημιουργήσει πιο υγιή περιβάλλοντα με περισσότερα φυτοπροστατευτικά και μελισσοπροστατευτικά προϊόντα.

### 3.3.7 Τοξικότητα γεωργικών φαρμάκων

Η πραγματική βλάβη στους πληθυσμούς των μελισσών είναι συνάρτηση της τοξικότητας της ουσίας και της έκθεσης σε αυτή ή αυτές, σε συνδυασμό με τον τρόπο εφαρμογής των ουσιών. Η τοξικότητα των εντομοκτόνων μετράται γενικά χρησιμοποιώντας τιμές οξείας τοξικότητας δια επαφής ή δια στόματος (μέσες θανατηφόρες δόσεις)  $LD_{50}$ , το επίπεδο δηλαδή έκθεσης που προκαλεί θάνατο του 50% του πληθυσμού που εκτίθεται στη τοξική για αυτόν ουσία.

Τα όρια τοξικότητας, όσον αφορά τον πληθυσμό ενήλικων μελισσών, καθορίζονται γενικά στα εξής:

1. Υψηλή τοξικότητα (όπου  $LD_{50} < 2\mu\text{g}/\mu\text{μέλισσα}$ ),
2. Μέτρια τοξικότητα (όπου  $LD_{50} 2 - 10,99\mu\text{g}/\mu\text{μέλισσα}$ ),
3. Μικρή τοξικότητα (όπου  $LD_{50} 11 - 100\mu\text{g}/\mu\text{μέλισσα}$ ) και,
4. Μη τοξική (όπου  $LD_{50} > 100\mu\text{g}/\mu\text{μέλισσα}$ ).

Επιπλέον, η οξεία τοξικότητα των γεωργικών φαρμάκων προκαλεί μια σειρά από διαφορετικές επιπτώσεις στις μέλισσες, οι οποίες μπορεί να περιλαμβάνουν διέγερση, έμετο, παράλυση των πτερυγίων, ασπίδα της κοιλιάς παρόμοια με αντανάκλαστικό τσίμπημα και ασυντόνιστη κίνηση. Η οξεία τοξικότητα μπορεί ακόμα να εξαρτάται από τον τρόπο έκθεσης, για παράδειγμα, πολλά γεωργικά φάρμακα προκαλούν τοξικές επιδράσεις με την επαφή, ενώ τα νεονικοτινοειδή είναι πιο τοξικά όταν καταναλώνονται από το στόμα. Τέλος, η οξεία τοξικότητα, αν και πιο θανατηφόρα, είναι λιγότερο συχνή από την υποθανατηφόρα τοξικότητα ή τις σωρευτικές επιδράσεις.

Όσον αφορά τις υποθανατηφόρες και χρόνιες επιδράσεις, η έκθεση σε γεωργικά φάρμακα, ειδικά σε σχέση με τα νεονικοτινοειδή, μπορεί να οδηγήσει σε πολλαπλές φυσιολογικές ή/και συμπεριφορικές υποθανατηφόρες επιδράσεις στις εκτεθειμένες μέλισσες και μπορεί να περιλαμβάνουν διαταραχές στις συμπεριφορικές και κινητικές λειτουργίες, μειωμένη ανοσία και καθυστερημένη ανάπτυξη.

Αξιοσημείωτος παράγοντας αποτελεί και το μέγιστο όριο υπολειμμάτων (*Maximum Residue Limit, MRL*) που είναι η μέγιστη ποσότητα υπολείμματος φυτοπροστατευτικού που επιτρέπεται σε τρόφιμα ή ζωοτροφές, εκφραζόμενη σε χιλιοστόγραμμα ανά χιλιόγραμμο. Λαμβάνεται υπόψη σε περιπτώσεις μελισσοκομικών υποστρωμάτων πλην της μέλισσας.

### 3.4 Χρωματογραφία

Η χρωματογραφία είναι μία ισχυρή τεχνική διαχωρισμού, η οποία βρίσκει εφαρμογή σε κάθε κλάδο της επιστήμης. Οι εφαρμογές της παρουσίασαν αυξητική τάση με «εκρηκτικό ρυθμό» τις τελευταίες δεκαετίες, και αυτό δεν οφείλεται μόνο στην ανάπτυξη νέων τύπων χρωματογραφικών τεχνικών, αλλά και στη συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση από τους επιστήμονες καλύτερων μεθόδων για τον χαρακτηρισμό πολύπλοκων μιγμάτων. Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μία σημαντική ομάδα ποικίλων μεθόδων που βοηθούν τον επιστήμονα να διαχωρίσει ουσίες με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μίγματα. Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, το δείγμα διαλύεται σε μία κινητή φάση (mobile phase), η οποία μπορεί να είναι ένα αέριο, ένα υγρό ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια, η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας στατικής φάσης (stationary phase), η οποία είναι καθηλωμένη σε μία στήλη ή σε μία στερεή επιφάνεια. Σημειώνεται πως οι δύο αυτές φάσεις επιλέγονται με τέτοιο τρόπο ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ αυτών σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά που κατακρατώνται ισχυρότερα στην στατική φάση, κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης, ενώ όσα κατακρατώνται ασθενέστερα, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται, καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες και στη συνέχεια, τα συστατικά αυτά μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά και ποσοτικά. Η ταξινόμηση που πραγματοποιείται παρουσιάζεται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 10. Ταξινόμηση μεθόδων χρωματογραφικών διαχωρισμών (βιβλιογραφική αναφορά 2).

<i>N/N</i>	<i>Γενική ταξινόμηση</i>	<i>Ειδική τεχνική</i>	<i>Στατική φάση</i>	<i>Τύπος ισορροπίας</i>
1.	<i>Αέρια Χρωματογραφία (GC)</i>	Αερίου-Υγρού (GLC)	Υγρό προσροφημένο ή συνδεδεμένο σε επιφάνεια στερεού	Κατανομή μεταξύ αερίου και υγρού
		Αερίου-Στερεού (GSC)	Στερεό	Προσρόφηση
2.	<i>Υγρή Χρωματογραφία (LC)</i>	Υγρού-Υγρού ή Κατανομής	Υγρό προσροφημένο ή συνδεδεμένο σε στερεή επιφάνεια	Κατανομή μεταξύ δύο μη αναμίξιμων υγρών

		Υγρού-Στερεού ή Προσρόφησης	Στερεό	Προσρόφηση
		Ιοντοανταλλαγή	Ιοντοανταλλακτική ρητίνη	Ιοντοανταλλαγή
		Αποκλεισμός μεγέθους	Υγρό στα διακενά ενός στερεού πολυμερούς	Κατανομή/ Κοσκίνισμα
		Συγγένεια	Υγρό ειδικό για μια ομάδα, συνδεδεμένο σε μία επιφάνεια στερεού	Κατανομή μεταξύ επιφάνειας υγρού και κινητού υγρού
3.	<i>Χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού (SFC)</i>		Οργανικά μόρια συνδεδεμένα χημικώς σε στερεή επιφάνεια	Κατανομή μεταξύ υπερκρίσιμου ρευστού και συνδεδεμένης επιφάνειας

### 3.4.1 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC ή αλλιώς High Performance Liquid Chromatography) ανήκει στις μεθόδους υγρής χρωματογραφίας κατά την οποία η κινητή υγρή φάση (mobile phase), υπό την επίδραση υψηλής πίεσης, διέρχεται μέσα από μία στήλη που περιέχει τη στατική φάση (stationary phase), και η οποία μπορεί να είναι στερεή ή υγρή. Θεωρείται ως μία μέθοδος υψηλής διαχωριστικής ικανότητας και ποσοτικού προσδιορισμού διαφόρων χημικών ενώσεων με υψηλή ακρίβεια και ευελιξία και είναι η πιο διαδεδομένη από όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού και χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία, εύκολη προσαρμογή σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, καταλληλότητα για διαχωρισμούς μη πτητικών και θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως από την δυνατότητα εφαρμογής της σε προσδιορισμούς μεγάλου βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Το σύστημα της HPLC αποτελείται από ένα σύστημα παραλαβής του διαλύτη, τη βαλβίδα ανάμιξης των διαλυτών, τη βαλβίδα έγχυσης δείγματος, την αντλία υψηλής πίεσης, την προστήλη (αν υπάρχει), την στήλη, τον ανιχνευτή και τον καταγραφέα/υπολογιστή. Στα σύγχρονα συστήματα υπάρχει και ο αυτόματος δειγματολήπτης.

### **3.4.1.1 Σύστημα δοχείων κινητής φάσης**

Το σύστημα διαλυτών ουσιαστικά αποτελείται από γυάλινα δοχεία τα οποία έχουν πληρωθεί με τους αντίστοιχους διαλύτες, αποτελούν την υδατική και την οργανική φάση του συστήματος, και στα οποία πραγματοποιείται και η λεγόμενη απαέρωση προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν φυσαλίδες ή ακαθαρσίες ή σκόνη, που μπορεί να επηρεάσουν την σωστή ανάλυση του επιθυμητού δείγματος. Οι απαερωτές μπορεί να αποτελούνται και από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης, ένα σύστημα θέρμανσης και ανάδευσης και από ένα σύστημα εισαγωγής φυσαλίδων αδρανούς αερίου χαμηλής διαλυτότητας.

### **3.4.1.2 Βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών**

Η βαλβίδα ανάμιξης των διαλυτών είναι απαραίτητη προκειμένου να πραγματοποιείται η ανάμιξη των διαλυτών σε ποσοστό που ορίζεται κάθε φορά από τον αναλυτή και είναι απαραίτητη ώστε να υπάρχει μία διαδοχική αλλαγή κατά την διάρκεια της ανάλυσης των αναλογιών των διαλυτών, ή αλλιώς βαθμιδωτή έκλυση, ώστε να επιτυγχάνεται και ο καλύτερος διαχωρισμός των ουσιών του δείγματος.

### **3.4.1.3 Σύστημα έγχυσης δείγματος**

Η βαλβίδα έγχυσης ή αλλιώς εισαγωγής του δείγματος είναι ένας βαθμονομημένος βρόγχος και είναι απαραίτητος προκειμένου να υπάρχει σταθερός και επαναλήψιμος όγκος δείγματος κάθε φορά με τη χρήση της σύριγγας.

### **3.4.1.4 Αντλία**

Η αντλία είναι από τα πιο σημαντικά κομμάτια της υγρής χρωματογραφίας μιας και παράγει την απαιτούμενη υψηλή πίεση, έως 6000 psi, που εφαρμόζεται στην κινητή φάση του συστήματος για την διέλευσή της από την στήλη με ικανοποιητική ταχύτητα, ροή έως 10 mL/min για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός. Η επαναληψιμότητα της ροής είναι κριτήριο για την κατάσταση του συστήματος για την ανίχνευση διαρροών ενώ η διακύμανσή της επιφέρει πολλά προβλήματα. Κατασκευάζεται είτε από υψηλής ποιότητας ανοξείδωτο

χάλυβα είτε από αδρανή πολυμερή ώστε να μην προσβάλλονται από την κινητή φάση.

#### **3.4.1.5 Προστατευτική στήλη**

Η προστήλη ή αλλιώς προστατευτική στήλη, λειτουργεί ως χημικό φίλτρο απομακρύνοντας ισχυρώς κατακρατούμενες ενώσεις που είναι δυνατόν να κορέσουν την αναλυτική στήλη και ελαττώνουν την διάρκεια ζωής της. Συγκεκριμένα, απομακρύνει όχι μόνο αιωρούμενα σωματίδια, προσμίξεις διαλύτη αλλά και συστατικά του δείγματος που συνδέονται με τη στήλη με μη αντιστρεπτό τρόπο. Τοποθετείται πριν την αναλυτική στήλη και έχει ακριβώς το ίδιο πληρωτικό υλικό με αυτήν.

#### **3.4.1.6 Στήλη**

Η στήλη κατασκευάζεται από υψηλής ποιότητας ανοξείδωτο χάλυβα και περιλαμβάνει το υλικό πλήρωσης ή αλλιώς την στατική φάση του συστήματος. Η επιλογή αυτού του υλικού καθορίζει το φυσικοχημικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα στους διαχωρισμούς (κατανομή, ιοντοανταλλαγή, προσρόφηση, μοριακού αποκλεισμού, συγγένεια) και συνεπώς και το είδος της χρωματογραφίας. Το μέγεθος των σωματιδίων είναι περίπου 3-5 $\mu$ m, με όσο μικρότερο μέγεθος αυτών τόσο καλύτερο διαχωρισμό, μεγαλύτερη αποδοτικότητα, μικρότερους χρόνους και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης. Το πιο διαδεδομένο υλικό πλήρωσης είναι η σίλικα ή αλλιώς τα πορώδη σωματίδια πυριτίας και αποτελείται από πολλαπλές ομάδες σιλανόλης SiOH. Αναλόγως το αν η στατική φάση είναι περισσότερο ή λιγότερο πολική από την κινητή φάση του συστήματος, έχουμε χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal phase) ή χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reverse phase).

#### **3.4.1.7 Ανιχνευτής**

Ο ανιχνευτής παράγει ένα ενισχυμένο ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της ποσότητας της ουσίας που εκκλύεται κάθε φορά, είναι ευαίσθητος σε χαμηλές συγκεντρώσεις κάθε αναλύτη, έχει γραμμική απόκριση και δεν προκαλεί διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών, ενώ σημαντικό είναι ότι δεν είναι ευαίσθητος σε μεταβολές της θερμοκρασίας και της σύστασης τους διαλύτη. Οι πιο σημαντικοί ανιχνευτές που συναντώνται στην υγρή χρωματογραφία παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 11. Σύγκριση ανιχνευτών HPLC (βιβλιογραφική αναφορά 2).

Ανιχνευτής	Όριο ανίχνευσης κατα προσέγγιση (ng)	Βαθμιδωτή έκλυση
Υπεριώδους	0,1-1	ΝΑΙ
Δείκτη διάθλασης	100-1000	ΟΧΙ
Ψεκασμού σκέδασης φωτός	0,1-1	ΝΑΙ
Ηλεκτροχημικός	0,01-1	ΟΧΙ
Φθορισμού	0,001-0,01	ΝΑΙ
Αγωγιμότητας	0,5-1	ΟΧΙ
Φασματόμετρο μάζας	0,1-1	ΝΑΙ
Υπέρυθρου	1000	ΝΑΙ

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης με χρωματογραφική στήλη στατικής ανάστροφης φάσης C<sub>18</sub> και ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας.

### 3.5 Φασματομετρία Μαζών

Η φασματομετρία μαζών είναι η αναλυτική τεχνική που μπορεί να βρει την μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών σε σχέση με όλες τις άλλες αναλυτικές τεχνικές που είναι διαθέσιμες σήμερα. Πρόκειται για μια ευέλικτη τεχνική, η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με την στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τις δομές των ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική αλλά και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων, την δομή καθώς και την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε ποίκιλα δείγματα. Επίσης, είναι μία αρκετά ευαίσθητη τεχνική, όπου απαιτεί ελάχιστη ποσότητα δείγματος και μπορεί να παρέχει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες, ενώ καθιστάται απαραίτητη για την διερεύνηση δειγμάτων στα οποία οι αναλύτες είναι παρόντες σε αρκετά χαμηλές συγκεντρώσεις.

Για την λήψη του εκάστοτε φάσματος μάζας με τη συγκεκριμένη αναλυτική τεχνική, ο αναλύτης, το μόριο δηλαδή για τη λήψη πληροφοριών της δομής του, βομβαρδίζεται με ρεύμα ηλεκτρονίων, με σκοπό την απόσπαση ενός ηλεκτρονίου από τα μόριά του και εν τέλει τον σχηματισμό του μοριακού ιόντος M<sup>+</sup>. Αξίζει να τονιστεί πως η σύγκρουση μεταξύ των δραστικών ηλεκτρονίων και των μορίων του αναλύτη μεταφέρει αρκετή ενέργεια στα μόρια, ώστε να τα αφήσει σε διεγερμένη κατάσταση. Τα θετικά ή αρνητικά ιόντα που παράγονται από την πρόσκρουση με τα ηλεκτρόνια, έλκονται μέσω της σχισμής του φασματόμετρου μάζας, όπου διαχωρίζονται ανάλογα με τον λόγο, μάζας-προς-φορτίο (m/z) και παρουσιάζονται ως φάσμα μαζών, με την

μεγαλύτερη κορυφή να αντιστοιχεί στην βασική κορυφή (base peak) του φάσματος με αυθαίρετη τιμή 100, ενώ οι υπόλοιπες δευτερεύοντες κορυφές να μετρούνται ως το % ποσοστό του ύψους της βασικής κορυφής.

Γενικά λοιπόν το φάσμα μάζας δείχνει την απόκριση του ανιχνευτή ως προς το  $m/z$ . Μεγάλο ενδιαφέρον στα φάσματα μαζών αποτελούν οι κορυφές σε μάζες μεγαλύτερες από αυτήν του μοριακού ιόντος, κορυφές που αποδίδονται σε ιόντα που έχουν τον ίδιο χημικό τύπο, αλλά διαφορετική ισοτοπική αναλογία. Το μέγεθος των διαφόρων κορυφών εξαρτάται από τη φυσική αφθονία των ισοτόπων.

Τα κύρια επιμέρους τμήματα ενός φασματομέτρου μάζας είναι τα εξής: το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, η πηγή ιόντων, ο αναλυτής μαζών, ο ανιχνευτής και ο επεξεργαστής του σήματος. Όσον αφορά το σύστημα εισαγωγής, σκοπός του είναι να αφήνει μικρή ποσότητα δείγματος να εισέρχεται στο φασματομέτρο μαζών, όπου τα συστατικά του μετατρέπονται σε ιόντα σε αεριώδη κατάσταση. Συχνά περιλαμβάνει και ένα σύστημα εξαέρωσης στερεών ή υγρών δειγμάτων. Οι πηγές ιόντων μετατρέπουν τα συστατικά του δείγματος σε ιόντα και η έξοδος είναι ένα ρεύμα ιόντων τα οποία επιταχύνονται προς τον αναλύτη μαζών. Η λειτουργία του αναλυτή μαζών είναι ανάλογη με αυτή του φράγματος περίθλασης σε ένα οπτικό φασματομέτρο, ωστόσο στο πρώτο η διασπορά βασίζεται στο λόγο μάζας-προς-φορτίο ( $m/z$ ) των ιόντων της ουσίας και όχι στο μήκος κύματος των φωτονίων. Ένας σωστός αναλυτής μαζών πρέπει να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους καθώς και να επιτρέπει την διέλευση αρκετών ιόντων προκειμένου να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Η λειτουργία του μεταλλάκτη του φασματομέτρου μάζας είναι να μετατρέπει την δέσμη των ιόντων σε ηλεκτρικό σήμα, το οποίο ύστερα υπόκειται σε επεξεργασία και αποθήκευση στην μνήμη του υπολογιστή. Επίσης, απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για να διατηρείται χαμηλή η πίεση του συστήματος ( $10^{-4}$  έως  $10^{-8}$  Torr) εκτός του τμήματος επεξεργασίας του σήματος και του οργάνου παρουσίασης των ενδείξεων. Παρακάτω παρουσιάζεται η αναλυτική περιγραφή μερικών τμημάτων του φασματομέτρου μάζας.

### **3.5.1 Πηγές Ιόντων**

Το αρχικό στάδιο σε μία μέτρηση με φασματομετρία μάζας είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αερίου αναλύτη, διαδικασία καθοριστική για τους στόχους της μέτρησης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι πηγές

χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources) και πηγές εκρόφησης (desorption sources). Στις πηγές αέριας φάσης, το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται και συνήθως περιορίζονται σε θερμικώς σταθερές ενώσεις, συνήθως με σημεία ζέσεως μικρότερα από περίπου 500 °C, με αποτέλεσμα να δημιουργείται αυθαίρετα και περιορισμός και στα μοριακά βάρη των ενώσεων (μικρότερα από περίπου 103 Da). Αντίθετα, στις πηγές εκρόφησης το δείγμα, σε στερεά ή υγρή κατάσταση, μετατρέπεται απευθείας σε αεριώδη ιόντα και συνήθως εφαρμόζονται και σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα, δεν απαιτείται εξάτμιση των μορίων του αναλύτη και τα μοριακά βάρη των ενώσεων μπορεί να είναι μέχρι και 105 Da. Άλλη μία σημαντική διάκριση για τις πηγές ιόντων είναι η «σκληρότητα» ή «μαλακότητα». Συγκεκριμένα, οι σκληρές πηγές μεταδίδουν στα μόρια του αναλύτη αρκετή ενέργεια, ώστε να παραμείνουν σε έντονα διεγερμένη ενεργειακή κατάσταση, και επιπλέον η αποδιέγερση περιλαμβάνει επιπλέον σπάσιμο δεσμών και παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων με λόγους m/z μικρότερους από του μοριακού ιόντος. Αντίθετα, οι μαλακές πηγές προκαλούν περιορισμένο κατακερματισμό, με αποτέλεσμα το λαμβανόμενο φάσμα μαζών να αποτελείται από την κορυφή του μοριακού ιόντος και λίγες ακόμα επιπλέον κορυφές. Στον παρακάτω Πίνακα 8 παρουσιάζονται πολλές από τις βασικές πηγές ιοντισμού.

**Πίνακας 12. Βασικές πηγές ιοντισμού.**

<b>Πηγές Ιοντισμού</b>	
<b>Αέριας φάσης</b>	<b>Εκρόφησης</b>
<i>Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact, EI)</i>	<i>Εκρόφησης πεδίου (field desorption, FD)</i>
<i>Χημικού ιοντισμού (chemical ionization, CI)</i>	<i>Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI)</i>
<i>Χημικού Ιοντισμού Ατμοσφαιρικής Πίεσης (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)</i>	<i>Ιοντισμός με εκρόφηση ηλεκτροψεκασμού (Desorption Electrospray Ionization, DESI)</i>
<i>Ιοντισμού πεδίου (field ionization, FI)</i>	<i>Ιοντισμός εκρόφησης με βοήθεια υλικού μήτρας (matrix-assisted laser desorption/ionization, MALDI)</i>
	<i>Εκρόφηση πλάσματος (plasma desorption, PD)</i>
	<i>Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (fast atom bombardment, FAB)</i>
	<i>Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (secondary ion mass spectroscopy, SIMS)</i>
	<i>Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (thermospray ionization, TS)</i>
	<i>Ιοντισμός με υπερηχητική εκνέφωση (Sonic-Spray Ionization, SSI)</i>

	<p><i>Ιοντισμός με εκρόφηση υπερηχητικής εκνέφωσης (Desorption Sonic-Spray Ionization, DeSSI ή αλλιώς EASI)</i></p>
--	---

Λίγο πιο συγκεκριμένα για τις πηγές αέριας φάσης, πρόκειται για τεχνικές ιοντισμού, οι οποίες απαιτούν τα αντιδραστήρια ιοντισμού να δρουν σε δείγματα σε αέρια κατάσταση και επομένως δεν μπορούν να εφαρμοσθούν σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα. Ωστόσο τις τελευταίες δεκαετίες έχει αναπτυχθεί ένας μεγάλος αριθμός τεχνικών ιοντισμού με εκρόφηση (desorption ionization) ειδικά για δείγματα αυτού του είδους αλλά και μορίων με μοριακά βάρη >100.000Da, όπως βιομόρια για παράδειγμα πρωτεΐνες ή πολυπεπίδια κτλ. Στις τεχνικές εκρόφησης δεν περιλαμβάνεται η εξάτμιση που ακολουθείται από τον ιοντισμό των αερωδών μορίων του αναλύτη, αντιθέτως παρέχεται στο στερεό ή υγρό δείγμα ενέργεια διαφόρων μορφών κατά τρόπο που να προκαλεί απευθείας σχηματισμό αέριων ιόντων, με αποτέλεσμα τα προκύπτοντα φάσματα να είναι απλά και να αποτελούνται μόνο από το μοριακό ιόν ή το πρωτονιωμένο μόριο.

### **3.5.2 Ιοντισμός με Ηλεκτροψεκασμό**

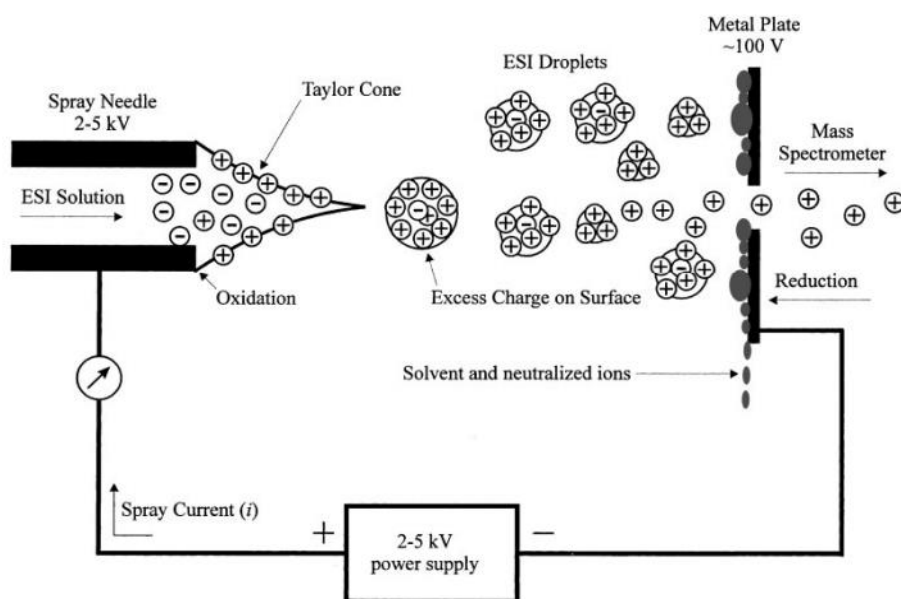
Η Φασματομετρία με Ιοντισμό με Ηλεκτροψεκασμό (*Electrospray Ionization / Mass Spectrometry, ESI-MS*) είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις βιομορίων, όπως πολυπεπίδια, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια με μοριακά βάρη  $\geq 100000$  Da, που χρησιμοποιείται επίσης για τον χαρακτηρισμό ανόργανων ουσιών και συνθετικών πολυμερών. Ο ιοντισμός αυτός πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία, πραγματοποιείται καθόλου ή περιορισμένη θραύση μεγάλων και θερμικά ευπαθών βιομορίων. Επίσης τα παραγόμενα ιόντα των μεγάλων βιομορίων είναι πολλαπλά φορτισμένα, συνεπώς οι τιμές  $m/z$  είναι αρκετά μικρές και εύκολα ανιχνεύσιμες. Συγκεκριμένα, κατά τη διαδικασία το δείγμα εισάγεται σε ένα μεταλλικό τριχοειδή σωλήνα με σταθερή ταχύτητα ροής δείγματος (συνήθως κυμαίνεται από 0.1-10  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Μεταξύ του τριχοειδούς και ενός αντισταθμιστικού ηλεκτροδίου (είσοδος φασματομέτρου μάζας), εφαρμόζεται διαφορά δυναμικού από 2-5 kV, τιμή ικανή να παράγει το ηλεκτρικό πεδίο που επιδρά στα φορτία του διαλύματος, διαχωρίζοντάς τα και συσσωρεύοντας τα θετικά ή αρνητικά φορτία (ανάλογα με το πρόσημο της τάσης που εφαρμόζεται στον τριχοειδή) στην άκρη του τριχοειδούς σχηματίζοντας έτσι τον «κώνο του Taylor». Ο κώνος αυτός είναι τμήμα του διαλύματος που προεξέχει από τον τριχοειδή και φέρει συσσωρευμένο φορτίο ή αλλιώς περίσσεια φορτίου δηλαδή

το φορτίο που διαχωρίστηκε, στην επιφάνειά του. Καθώς το δυναμικό αυξάνει, το διάλυμα που σχηματίζει τον κώνο του Taylor, ξεπερνά το σημείο Rayleigh, το σημείο δηλαδή εκείνο όπου οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων να υπερνικούν την επιφανειακή τάση του διαλύματος με συνέπεια ο κώνος να υφίσταται σχάση και να παράγονται φορτισμένα σωματίδια. Τα παραγόμενα σταγονίδια φέρουν περίσσεια φορτίου στην επιφάνειά τους, δηλαδή την περίσσεια φορτίου που βρισκόταν στην επιφάνεια του κώνου και που περιλαμβάνει τα ιόντα που θα παραχθούν εν τέλει στην αέρια φάση.

Για αυτήν την διαδικασία έχουν προταθεί δύο βασικές θεωρίες. Σύμφωνα με την θεωρία σχάσης του Coulomb, τα σταγονίδια εξαιτίας της συνεχούς εξάτμισης του διαλύτη από αυτά, συρρικνώνονται αυξάνοντας έτσι τις απωστικές δυνάμεις μεταξύ των ιόντων τόσο ώστε να υφίστανται σχάση, παράγοντας έτσι μικρότερα σωματίδια, τα οποία συρρικνώνονται και υφίστανται περαιτέρω σχάση. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές έως το σημείο όπου το κάθε σταγονίδιο να περιέχει μόνο ένα ιόν και έτσι με την εξάτμιση και των τελευταίων μορίων του διαλύτη να παράγονται ιόντα στην αέρια φάση. Η εναλλακτική θεωρία εξάτμισης ιόντων υποστηρίζει ότι λόγω εξάτμισης του διαλύτη τα σταγονίδια υφίστανται σχάση μέχρι το σημείο όπου οι απωστικές δυνάμεις των ιόντων στην επιφάνεια της σταγόνας αυξάνουν τόσο ώστε ιόντα να απελευθερώνονται στην αέρια φάση. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί ότι η περίσσεια φορτίου που βρίσκεται στην επιφάνεια των παραγόμενων σταγονιδίων είναι αυτή που καταλήγει ως ιόντα στην αέρια φάση και διαφοροποιείται από τα αρνητικά και θετικά ιόντα που βρίσκονται στο εσωτερικό των σταγονιδίων και είναι εξουδετερωμένα από τα αντίστοιχα αντισταθμιστικά. Τα εξουδετερωμένα φορτία που βρίσκονται στο εσωτερικό των σταγονιδίων δεν φτάνουν στην αέρια φάση διότι για να γίνει κάτι τέτοιο απαιτείται να τους δοθεί ενέργεια υψηλότερη από την ελκτική ενέργεια Coulomb μεταξύ των ιόντων και των αντισταθμιστικών τους.

Κατά την διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού εκτός από τα ιόντα του αναλύτη παράγονται και ένα πλήθος άλλων ιόντων από συσσωματώματα ιόντων του αναλύτη με μόρια του διαλύτη αλλά και συσσωματώματα μορίων του διαλύτη. Αυτό γίνεται διότι στο άκρο του τριχοειδή λαμβάνει χώρα αδιαβατική εκτόνωση του διαλύματος κατά την σχάση του κώνου και η θερμοκρασία μειώνεται προκαλώντας την συσσωμάτωση ιόντων, ιόντων-μορίων και μορίων-μορίων. Για να γίνει αποδοτικότερος ο ιοντισμός έχουν αναπτυχθεί τεχνικές όπου με την βοήθεια αερίων διασπώνται τα συσσωματώματα. Έτσι υπάρχει αέριο άζωτο στην περιοχή γύρω από το τριχοειδή (βοηθητικό αέριο, auxiliary gas) που βοηθά στην εξάτμιση του διαλύτη και επίσης αέριο άζωτο υπό πίεση να απελευθερώνεται γύρω από την άκρη του τριχοειδούς

(εκνεφωτικό αέριο, sheath gas) βοηθώντας κατά αυτό τον τρόπο την σχάση του κώνου. Τα παραγόμενα ιόντα εν τέλει κατευθύνονται προς τον αναλυτή μάζας.

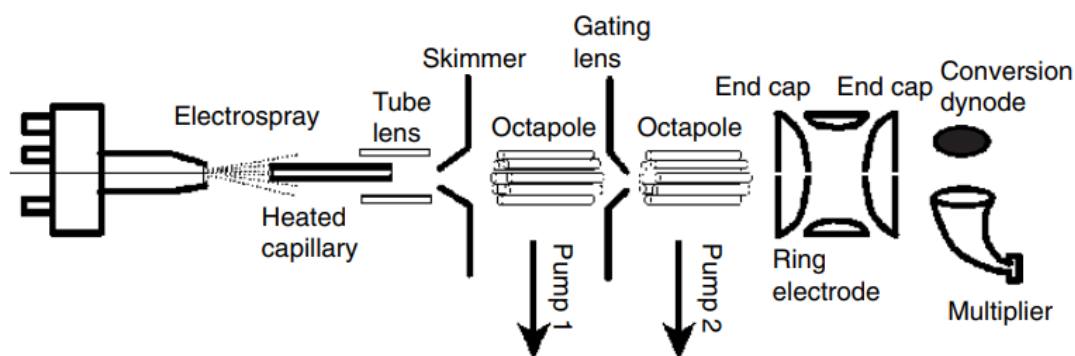


Εικόνα 15. Αναπαράσταση του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό για την παραγωγή θετικών ιόντων (βιβλιογραφική αναφορά 14).

### 3.5.3 Αναλυτές Μάζων

Με σκοπό τον διαχωρισμό των ιόντων με διαφορετικούς λόγους μάζας-προς-φορτίο ( $m/z$ ), τα φασματόμετρα μάζας διαθέτουν διάφορου τύπου διατάξεις ανάλυσης με κύρια χαρακτηριστικά αυτών να είναι η ευαισθησία, η επαναληψιμότητα, η διακριτική ισχύς, το εύρος γραμμικότητας, η ταχύτητα σάρωσης και φυσικά το κόστος. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, σε συνεχείς και σε παλμικούς αναλυτές μάζας, με τους πρώτους να πραγματοποιούν σάρωση για ξεχωριστό λόγο  $m/z$ , όπως για παράδειγμα αποτελεί το φασματόμετρο μάζας μαγνητικού τομέα ή ακόμη και τα τετράπολα. Εν αντιθέσει οι παλμικοί αναλυτές μάζας ανιχνεύουν όλους τους λόγους  $m/z$  ταυτόχρονα, όπως για παράδειγμα το φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης (TOF). Στην συγκεκριμένη εργασία ως αναλυτής μάζας χρησιμοποιήθηκε μια τετραπολική παγίδα ιόντων (quadrupole ion trap), η οποία βρίσκεται στο τέλος του συστήματος μεταφοράς ιόντων από την πηγή ιοντισμού και η λειτουργία της οποίας περιγράφεται και παρακάτω.

### 3.5.4 Σύστημα μεταφοράς ιόντων



Εικόνα 16. Σύστημα μεταφοράς ιόντων από την πηγή ιοντισμού στην ιοντική παγίδα φασματόμετρου μάζας (βιβλιογραφική αναφορά 6).

Όπως φαίνεται στο σχήμα τα παραγόμενα ιόντα περνούν από τέσσερις περιοχές διαφορετικής πίεσης πριν φτάσουν στην ιοντική παγίδα. Αυτή η σταδιακή μείωση της πίεσης (διαφορικό κενό) από την πηγή στον αναλυτή χρησιμοποιείται έτσι ώστε να γίνεται μια ομαλή μετάβαση από την ατμοσφαιρική πίεση σε πίεση υψηλού κενού. Πιο συγκεκριμένα το σύστημα μεταφοράς αποτελείται από τις εξής περιοχές:

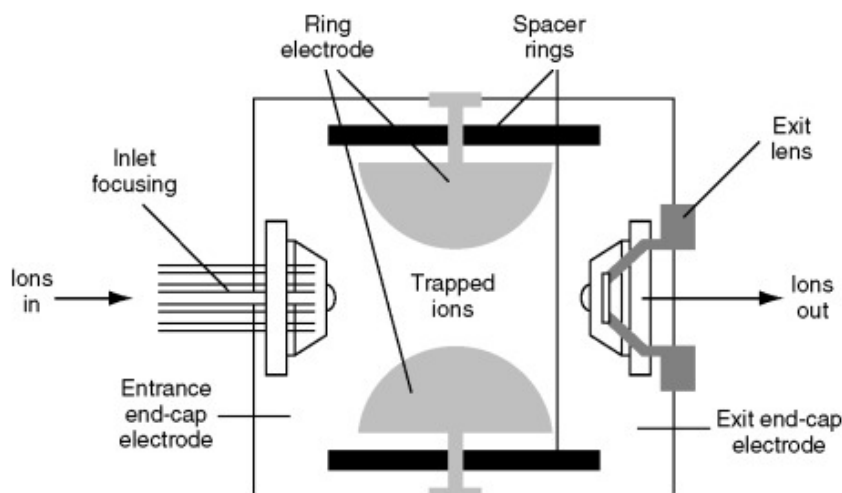
- ❖ Η περιοχή του θερμαινόμενου τριχοειδούς που είναι η δεύτερη περιοχή που φτάνουν τα ιόντα, και λειτουργεί σε πίεση 1.3 Torr. Αποτελείται από έναν θερμαινόμενο τριχοειδή που βοηθά τόσο την εξάτμιση του διαλύτη λόγω της θερμοκρασίας όσο και την διάσπαση των συσσωματωμάτων που παράγονται κατά τον ιοντισμό, αφού σε αυτόν εφαρμόζεται δυναμικό. Μετά τον τριχοειδή βρίσκονται ηλεκτρικοί φακοί που εστιάζουν τα ιόντα που βγαίνουν από τον θερμαινόμενο τριχοειδή και δεν επιτρέπουν την εκτόνωση της δέσμης των ιόντων και έτσι οδηγούνται στην επόμενη περιοχή. Τα ουδέτερα είδη που έχουν σχηματιστεί δεν εστιάζονται και απομακρύνονται μέσω της μηχανικής αντλίας που διατηρεί την πίεση στα 1.3 Torr. Αυτή η περιοχή διαχωρίζεται από την πρώτη περιοχή που βρίσκεται η πηγή ιοντισμού σε πίεση 760 Torr, μέσω ενός κώνου δειγματοληψίας (sampling cone), ο οποίος επιτρέπει την εισαγωγή ενός μικρού αριθμού ιόντων που παράγονται στην πηγή, στο φασματόμετρο.
- ❖ Η περιοχή του πρώτου οκταπόλου που λειτουργεί σε πίεση  $1.7 \times 10^{-3}$  Torr, και διαχωρίζεται από την προηγούμενη περιοχή μέσω ενός αποκορυφωτή (skimmer). Ο αποκορυφωτής είναι γειωμένος και έχει μια μικρή οπή από όπου περνάνε τα ιόντα ενώ τα ουδέτερα μόρια που μπορεί να έχουν φτάσει σε αυτή την περιοχή δεν περνάνε.

- ❖ Η περιοχή δεύτερου οκταπόλου που λειτουργεί σε πίεση  $2 \times 10^{-5}$  Torr, πίεση λειτουργίας και της ιοντικής παγίδας, και διαχωρίζεται από το πρώτο οκτάπολο μέσω ηλεκτρικών φακών που χρησιμοποιούνται για την εστίαση των ιόντων από το πρώτο οκτάπολο στο δεύτερο. Η χρήση των οκταπόλων γίνεται για την εστίαση των ιόντων πριν εισέλθουν στην ιοντική παγίδα. Ο λόγος που υπάρχουν δύο οκτάπολα αντί ενός είναι ότι έτσι υπάρχει διαφορετικό κενό στην περιοχή εστίασης και προκαλείται επιτάχυνση των ιόντων.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι η κίνηση των ιόντων από την πηγή στην ιοντική παγίδα γίνεται ηλεκτροστατικά, δηλαδή εξαιτίας της μεγάλης διαφοράς δυναμικού που υπάρχει μεταξύ της πηγής ηλεκτροψεκασμού (4kV) και του ανιχνευτή (- 15 kV) δίνοντας έτσι την δυνατότητα η πηγή να τοποθετηθεί ορθογώνια σε σχέση με το σύστημα μεταφοράς με σκοπό την εισαγωγή μόνο φορτισμένων σωματιδίων στο φασματομέτρο.

### **3.5.5 Τετραπολική παγίδα ιόντων**

Η τετραπολική παγίδα ιόντων ως αναλυτής μαζών έχει την δυνατότητα να παγιδεύει ταυτόχρονα ιόντα με διαφορετικό λόγο  $m/z$  και κατόπιν να τα εξάγει διαδοχικά προς τον ανιχνευτή, επιπλέον απομονώνει ιόντα συγκεκριμένης τιμής  $m/z$  και πραγματοποιεί εκλεκτική θραυσματοποίηση σε αυτά, παρέχοντας έτσι την δυνατότητα για πειράματα διαδοχικής θραυσματοποίησης, δηλαδή την θραύση ενός ιόντος, την απομόνωση κάποιου θραύσματος και την περαιτέρω θραυσματοποίηση αυτού. Η ιοντική παγίδα λοιπόν, πρόκειται για μία διάταξη, κατά την οποία δημιουργούνται ανιόντα ή κατιόντα σε αέρια κατάσταση, που περιορίζονται για αρκετό διάστημα με ένα ηλεκτρικό και μαγνητικό πεδίο. Συνήθως αποτελείται από ένα κεντρικό δακτυλοειδές ηλεκτρόδιο και δύο πλευρικά ηλεκτρόδια-κάλυπτρα.



*Εικόνα 17. Ιοντική παγίδα φασματόμετρου μάζας (βιβλιογραφική αναφορά 6).*

Στο δακτυλοειδές ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται ένα μεταβλητό δυναμικό ραδιοσυχνότητας, ενώ τα πλευρικά ηλεκτρόδια είναι γειωμένα, με αποτέλεσμα να παράγεται ένα τρισδιάστατο ηλεκτρικό πεδίο στο οποίο μπορούν να παγιδευτούν ιόντα. Όσον αφορά το ηλεκτρικό αυτό πεδίο που σχηματίζεται εντός της ιοντικής παγίδας, μπορεί να αναπαρασταθεί σαν ένα πηγάδι δυναμικού στο οποίο παγιδεύονται τα ιόντα με συγκεκριμένες τροχιές το καθένα. Σημαντικός παράγοντας για το πόσο αποδοτικά γίνεται η παγίδευση, είναι και η αρχική ορμή που έχουν τα ιόντα καθώς εισέρχονται στην παγίδα. Συγκεκριμένα, ιόντα με μεγάλη μάζα και συνεπώς με μεγάλη ορμή έχει σαν αποτέλεσμα το πηγάδι δυναμικού να μην είναι αποτελεσματικό στο να αλλάξει την τροχιά των ιόντων κατά  $180^\circ$ , δηλαδή να πραγματοποιηθεί η προαναφερόμενη κίνηση των ιόντων, με αποτέλεσμα τα ιόντα να χάνονται. Αντίθετα, τα ιόντα με μικρή μάζα παγιδεύονται ικανοποιητικά αλλά τα φάσματα μάζας τους χαρακτηρίζονται από μικρή διαχωριστική ικανότητα διότι οι τροχιές τους κατά την έξοδο δεν ελέγχονται σωστά και έτσι τα ιόντα διασπείρονται. Με την εισαγωγή αερίου ηλίου αυτά τα προβλήματα λύνονται καθώς άτομα ηλίου συγκρούονται με τα ιόντα με αποτέλεσμα μέρος της κινητικής ενέργειας τους να μετατρέπεται σε θερμική χωρίς όμως να διασπώνται τα ιόντα. Έτσι τα ιόντα «παγώνουν» ενεργειακά και οι τροχιές τους εντοπίζονται στο κέντρο της παγίδας.

Έτσι, όταν ιόντα κατάλληλης τιμής  $m/z$  περιστρέφονται σε σταθερή τροχιά μέσα στη κοιλότητα που περιβάλλεται από το δακτύλιο και με αύξηση του δυναμικού ραδιοσυχνότητας, συνεπάγεται οι τροχιές των βραδύτερων ιόντων να σταθεροποιούνται, ενώ αυτές των ελαφρύτερων ιόντων να αποσταθεροποιούνται και να προσκρούουν στα τοιχώματα του δακτυλοειδούς

ηλεκτροδίου. Επιπρόσθετα, ιόντα μεγάλου εύρους μαζών παγιδεύονται συγχρόνως, συχνά με αποθήκευση ιόντων για σχετικά μεγάλους χρόνους, και στη συνέχεια χρησιμοποιώντας την τεχνική που λέγεται «εκλεκτική εκτόξευση μάζας» (mass selective ejection), τα παγιδευμένα ιόντα διαδοχικά απομακρύνονται αναλόγως με την μάζα τους, με τα σταθεροποιημένα να προσπίπτουν εν τέλει στον μεταλλάκτη του συστήματος.

### 3.5.6 Διαδοχική Φασματομετρία Μάζας ή

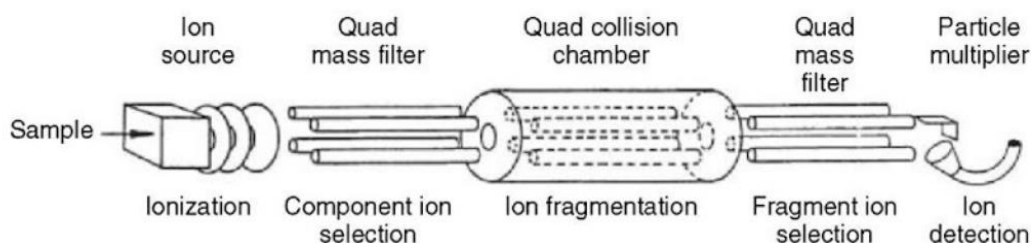
#### **Φασματομετρία μαζών «σε σειρά» (tandem mass spectrometry)**

Η Φασματομετρία Μαζών «σε σειρά» ή αλλιώς συζευγμένη φασματομετρία μάζας (*MS/MS*) είναι μία ιδιαίτερα επιλεκτική μέθοδος για τον αναλύτη που μελετάται κάθε φορά. Η μέθοδος αυτή, επιτρέπει την λήψη φάσματος μαζών προεπιλεγμένων ιοντικών θραυσμάτων.

Η βασική αρχή αυτής της μεθόδου είναι ότι αφού πραγματοποιηθεί διαχωρισμός του αναλύτη από τα υπόλοιπα συστατικά της μήτρας του δείγματος, ακολουθεί απομόνωση και στη συνέχεια διάσπαση στον αναλύτη μαζών. Η ανίχνευσή του στηρίζεται στην παρακολούθηση επιλεγμένων θυγατρικών του ιόντων με μια μεθοδολογία γνωστή ως παρακολούθηση επιλεγμένων αντιδράσεων (selected reaction monitoring: SRM), με χαρακτηριστική αυξημένη ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης μιας και ο χημικός θόρυβος υποβάθρου εμφανίζεται αισθητά μειωμένος. Επιπλέον επειδή κάθε ένωση διασπάται κατά συγκεκριμένο τρόπο, που εξαρτάται από την δομή της, τα δευτερεύοντα ιόντα που προκύπτουν είναι χαρακτηριστικά της κάθε ένωσης με συνέπεια να αυξάνεται σημαντικά και η εκλεκτικότητα της μεθόδου.

Ο αναλυτής μαζών που έχει χρησιμοποιηθεί για την επίτευξη της προαναφερόμενης μεθόδου είναι ο τριπλός τετραπολικός αναλυτής μαζών εξοπλισμένος με κυψελίδα σύγκρουσης. Αυτός ο αναλυτής μαζών αποτελείται από το πρώτο τετραπολικό αναλυτή μαζών ή αλλιώς το πρώτο τετράπολο (Q1), από την κυψελίδα αλληλεπίδρασης ή θάλαμο σύγκρουσης (Q2) που συνήθως περιέχει αδρανές αέριο και τέλος από το δεύτερο τετραπολικό αναλυτή μαζών (Q3). Συγκεκριμένα η διαδικασία που ακολουθείται είναι η εξής, συνήθως μία μαλακή πηγή ιόντων παράγει ιόντα και μερικά θραύσματα, τα οποία εισάγονται στον Q1, ο οποίος συλλέγει ένα συγκεκριμένο ιόν, «πρόδρομο ιόν» (precursor ion) και το στέλνει στον Q2, από όπου το ιόν αυτό θα διασπασθεί αυθόρμητα, θα αντιδράσει με ένα αέριο σύγκρουσης για παράδειγμα Αργό ή με δέσμη ακτινοβολίας λέιζερ μεγάλης έντασης και θα παράγει θραύσματα,

«προϊόντα ιόντα» (product ions), τα οποία αναλύονται από τον Q3, και ανιχνεύονται από έναν ανιχνευτή μαζών.



*Εικόνα 16. Τριπλός αναλυτής μαζών φασματομέτρου μάζας (βιβλιογραφική αναφορά 33).*

Έτσι, λαμβάνοντας υπόψη τα παραπάνω, με την διαδοχική φασματομετρίας μάζας ιοντικής παγίδας μπορεί να αποδοθεί ένα ολοκληρωμένο σχήμα θραυσματοποίησης του αναλύτη έτσι ώστε να είναι εφικτός και ο χαρακτηρισμός των ιόντων θραυσμάτων που εμφανίζονται στα φάσματα μάζας που λαμβάνονται με τριπλό τετραπολικό αναλυτή μάζας.

### **3.6 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συζευγμένη με Ιοντισμό Ηλεκτροψεκασμού Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας (LC-ESI-MS/MS)**

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συζευγμένη με Ιοντισμό Ηλεκτροψεκασμού Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας (LC-ESI-MS/MS) είναι μια αναλυτική τεχνική που περιλαμβάνει φυσικό διαχωρισμό των στοχευόμενων ενώσεων ή αναλυτών που ακολουθείται από την ανίχνευση με βάση τη μάζα τους. Πρόκειται για μία τεχνική με αξιοσημείωτη ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ακρίβεια, χαρακτηριστικά που την έχουν καταστήσει μια τεχνική εκλογής για την ανίχνευση ποσοτήτων μικρογραμμαρίων ή ακόμα και νανογραμμαρίων μιας ποικιλίας αναλυτών που κυμαίνονται από μεταβολίτες φαρμάκων, γεωργικά φάρμακα και νοθευτές τροφίμων έως εκχυλίσματα φυσικών προϊόντων. Είναι κατάλληλη για την ανάλυση αρκετών πολικών και μη ενώσεων, καθώς και αρκετών θερμοευαίσθητων μορίων και διακυμάνσεις αναλυτών από χαμηλής μοριακής μάζας με τιμές  $m/z < 1000$  Da, έως πρωτεΐνες πολύ υψηλής μοριακής μάζας με τιμές  $m/z > 100.000$  Da.

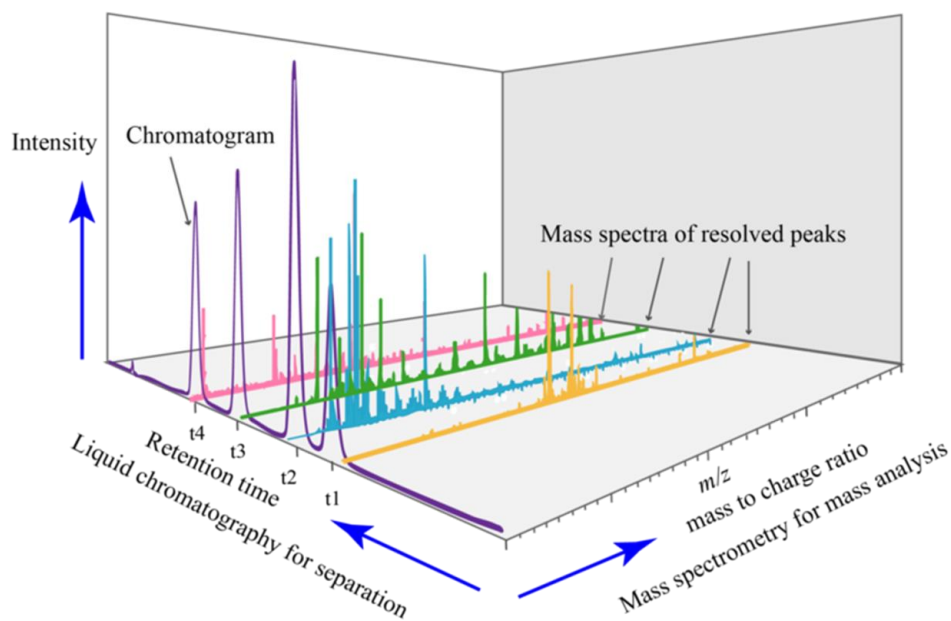
Το LC επιφέρει έναν φυσικό διαχωρισμό των αναλυτών σε ένα υγρό δείγμα ή ένα διάλυμα ενός στερεού δείγματος. Ορισμένες αναλυόμενες ουσίες αλληλεπιδρούν πιο έντονα με τη στατική φάση από άλλες, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους καθώς περνούν μέσα από τη στήλη. Συγκεκριμένα, οι αναλυόμενες ουσίες που έχουν τη μικρότερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση αναδύονται πρώτες, ενώ ακολουθούν οι υπόλοιπες που έχουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση και εκλούνται τελευταίες. Ο χρόνος που ξοδεύει μια συγκεκριμένη αναλυόμενη ουσία στη στήλη είναι χαρακτηριστικός αυτής της ουσίας και ονομάζεται χρόνος κατακράτησης (RT).

Η κινητή φάση που ρέει έξω από τη στήλη (διαλύτης έκλουσης) διέρχεται μέσω ενός ανιχνευτή που «ανταποκρίνεται» σε μια συγκεκριμένη φυσική ή χημική ιδιότητα, δημιουργώντας μία απόκριση η οποία αποτυπώνεται ως ένα σήμα, της οποίας η ένταση (εμβαδόν κορυφής ή ύψος κορυφής) αντιστοιχεί στην ποσότητα του συστατικού που υπάρχει στο δείγμα. Ο χρόνος κατά τον οποίο ο ανιχνευτής «βλέπει» την αναλυόμενη ουσία είναι η RT του.

Αξίζει να σημειωθεί ότι, ενώ το σύστημα LC λειτουργεί σε πιέσεις περιβάλλοντος, το φασματόμετρο μάζας λειτουργεί υπό κενό και τα δύο συνδέονται μέσω μιας διεπιφάνειας. Αναλυτικά, καθώς το υγρό έκλουσης στήλης ρέει στη διεπιφάνεια, ο διαλύτης εξατμίζεται με εφαρμογή θερμότητας και τα μόρια της αναλυόμενης ουσίας εξατμίζονται και ιονίζονται. Αυτό είναι ένα κρίσιμο βήμα καθώς το φασματόμετρο μάζας είναι ικανό μόνο να

ανιχνεύει και να μετράει τα ιόντα της αέριας φάσης. Καθώς τα ιόντα της αναλυόμενης ουσίας παράγονται σε ατμοσφαιρική πίεση στη διεπιφάνεια, η διαδικασία ονομάζεται ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (API) και η διεπαφή είναι γνωστή ως πηγή API. Ο ιονισμός ηλεκτροψεκασμού (ESI) και ο χημικός ιονισμός ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI) είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες πηγές ιοντισμού στην ανάλυση LC-MS.

Οι αφθονίες των ιόντων κατά την ανάλυση ενός δείγματος με LC-MS απεικονίζονται ως χρωματογράφημα ολικών ιόντων (TIC). Αυτή η γραφική παράσταση εμφανίζει τις μέγιστες εντάσεις των ιόντων της αναλυόμενης ουσίας έναντι της RT τους. Επιπλέον, κάθε σημείο στο χρωματογράφημα σχετίζεται με ένα φάσμα μάζας. Το φάσμα μάζας απεικονίζει την αφθονία ιόντων έναντι των μετρούμενων τιμών  $m/z$ .



**Εικόνα 19.** Ανάλυση γραφικής παράστασης LC-MS (βιβλιογραφική αναφορά 34).

### 3.7 Μεθοδολογία QuEChERS

Τα τελευταία χρόνια μία από τις σημαντικότερες και αξιοσημείωτες τεχνικές προετοιμασίας του δείγματος πριν την εισαγωγή του στο σύστημα χρωματογραφικής ανάλυσης και εξαγωγής αποτελεσμάτων αποτελεί η τεχνική QuEChERS. Η συγκεκριμένη τεχνική προκειται για μία μέθοδο γρήγορη (Quick), εύκολη (Easy), φθηνή (Cheap), αποτελεσματική (Effective), στιβαρή (Rugged) και αρκετά ασφαλή (Safe) και αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο επεξεργασίας σε σχέση για παράδειγμα με τη εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction, LLE) ή την εκχύλιση στερεής φάσης (Solid-phase Extraction, SPE). Χρησιμοποιείται ευρέως παγκοσμίως, με πλήθος ανιχνευτών, προσφέροντας επιλεκτικότητα, ευαισθησία και μεγάλη ακρίβεια, ενώ επιφέρει αποτελέσματα με μεγάλη ανάκτηση και επαναληψιμότητα. Μερικά από τα πλεονεκτήματα έναντι άλλων αντίστοιχων τεχνικών αποτελούν:

1. ο μικρότερος χρόνος ανάλυσης του δείγματος,
2. η μηδαμινή προετοιμασία/ προεργασία του δείγματος
3. η μικρότερη απαιτούμενη ποσότητα διαλύτη,
4. η απουσία αποβλήτων, καθιστώντας την πιο «πράσινη» και πιο οικολογική, και τέλος
5. η απουσία ανάγκης περαιτέρω εργαστηριακού εξοπλισμού.

Κύρια αρχή της μεθόδου αποτελεί η *ομογενοποίηση* του δείγματος, δηλαδή ο κατακερματισμός του αριθμού των σωματιδίων, η όμοια κατανομή και δημιουργία μεγαλύτερης επιφάνειας επαφής. Όσον αφορά την διαδικασία, υπάρχουν 3 στάδια, της εκχύλισης, της διασποράς και της ανάλυσης, καθένα από αυτά να είναι αξιοσημείωτης σημασίας.

Κατά το 1<sup>ο</sup> στάδιο, χρησιμοποιούνται άλατα με σκοπό τη ορθή και όσο το δυνατόν μεγαλύτερου ποσοστού εκχύλιση των επιθυμητών στοιχείων από τα εκάστοτε δείγματα προς ανάλυση, διατηρώντας το pH σε ισορροπία ώστε μεγάλες ανακτήσεις (>70%) και αυξημένης καθαρότητας.

Επίσης, προκειμένου να γίνεται η απαραίτητη σύγκριση, η παρασκευή των standard και των spike διαλυμάτων ήταν απαραίτητη. Στην πρώτη περίπτωση, μελετάται η αλληλεπίδραση της ουσίας με τον διαλύτη, ενώ στην δεύτερη μελετάται η αλληλεπίδραση της ουσίας με το εκάστοτε υπόστρωμα.

Κατά το 2<sup>ο</sup> στάδιο, χρησιμοποιούνται άλατα καθαρισμού τόσο για την απομάκρυνση της υπολειπόμενης υγρασίας από το εκάστοτε διάλυμα, όσο και για την απομάκρυνση οργανικών οξέων, λιπιδίων, χρωστικών από αυτό.

Σε κάθε περίπτωση, η χορήγηση των αλάτων γίνεται μαζικά προκειμένου να δρουν συνεταιριστικά, αυξάνοντας την απόδοση και την ποιότητα της επιθυμητής εκχύλισης και καθ'επέκταση του αποτελέσματος της εκάστοτε ανάλυσης.

Όσον αφορά τα πεδία εφαρμογών, η τεχνική QuEChERS χρησιμοποιείται σε ένα μεγάλο εύρος σε παγκόσμια κλίμακα τόσο για μελέτες περιβαλλοντικής φύσεως όσο και για μελέτες τροφικής κατανάλωσης όπου συνεπάγονται τοξικότητα άρα και άμεση ή/και έμμεση επαφή με τον άνθρωπο.

*\*Σημειώνεται πως στην συγκεκριμένη εργασία αναλύθηκαν όλα τα δείγματα μελισσών, μελιού, κεριού και γύρης με την συγκεκριμένη τεχνική προεργασίας δείγματος.*

## 4. Πειραματικό μέρος

### 4.1 Οργανολογία και Αντιδραστήρια

Πίνακας 13. Όργανα σκεύη και Αντιδραστήρια-Διαλύματα-Σκόνες.

Όργανα-Σκεύη	Σκόνες-Αντιδραστήρια
Ποτήρια ζέσεως	Υπερκάθαρο Νερό (H <sub>2</sub> O)
Ογκομετρικές φιάλες 50 mL	ACN
Falcon 15 mL, 50mL	MeOH
Γυάλινη ραβδος	Hexane
Σπάτουλα μεταλλική	ACN
Σύριγγα ογκομετρική 10 mL	Acetone
Φίλτρα σύριγγας	0.1% formic acid
Πιπέτες Gilson 10μL, 100μL, 1000μL	Ammonium formate
Πιπέτες Pasteur	MgSO <sub>4</sub>
Vials	NaCl
Αναλυτικός Ζυγός	Trisodium citrate dehydrate
Vortex Laboratory Mixer	sodium hydrogen citrate sesquihydrate
Σύστημα ανάδευσης Agytax	PSA
Σύστημα υπερήχων Elmasonic S (Elma)	C <sub>18</sub>
Φυγόκεντρος	Z-Sep
Rotavapor	
Καταψύκτης -80°C	
Agilent LC 1200 series	
Agilent Technologies 6410 series Triple Quad LC/MS, Model: G6410B	

### 4.2 Πειραματική διαδικασία

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, για την επίτευξη της συγκεκριμένης εργασίας πραγματοποιήθηκαν αναλύσεις σε δείγματα μελισσών και διαφόρων άλλων μελισσοκομικών υποστρωμάτων, συγκεκριμένα μελιού, κηρήθρας και γύρης, με σκοπό την ανίχνευση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε αυτά. Τα δείγματα αφορούν σε δείγματα που λαμβάνει, από σχετικούς φορείς, σε ετήσια βάση το Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου (ΜΦΙ) και τα οποία αναλύονται για υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων και μεταβολιτών τους. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε τόσο ποιοτικά, όσο και ποσοτικά. Συγκεκριμένα για τις μέλισσες, τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα τοξικότητας, *LD*<sub>50</sub> καθώς και *MRL*,

προκειμένου να προσδιοριστούν, κατά προσέγγιση, τα αίτια θανάτωσής τους. Σημειώνεται πως όλες οι μετρήσεις υγρής χρωματογραφίας πραγματοποιήθηκαν στο *Agilent LC-ESI-MS/MS* και το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε αποτελεί μία μορφή της μεθοδολογίας *QuEChERS*. Παρακάτω παρουσιάζεται εκτενέστερα η διαδικασία ανάλυσης καθώς και ο χειρισμός της αναφερόμενης μεθοδολογίας. Σημειώνεται πως μελετήθηκαν συνολικά 22 δείγματα, από τα οποία τα 7 ήταν μελισσών, 5 ήταν μελιού, 7 ήταν κηρήθρας και 3 ήταν γύρης. Τέλος, χρησιμοποιήθηκαν εσωτερικά πρότυπα διαλύματα ενώ παρασκευάστηκαν άλατα Α εκχύλισης, άλατα Β καθαρισμού, standard και spike διαλύματα των 5,50 και 500 ppm καθώς και κινητές φάσεις. Ο τρόπος παρασκευής τους παρουσιάζεται παρακάτω.

### **Ποσότητες Εσωτερικών Προτύπων (Internal Standards, I.S.)**

1. *Carbedazim d<sub>3</sub>*, από 2 ppm → 10 μL
2. *Imidacloprid d<sub>4</sub>*, από 5 ppm → 10 μL
3. *Chlorpyrifos d<sub>10</sub>*, από 10 ppm → 10 μL
4. *Dimethoate d<sub>6</sub>*, από 20 ppm → 5 μL
5. *Malathion d<sub>10</sub>*, από 1 ppm → 50 μL
6. *Dichlorvos d<sub>6</sub>*, από 1 ppm → 50 μL
7. *TPP*, από 10 ppm → 10 μL
8. *Deltamethrin d<sub>6</sub>*, από 10 ppm → 10 μL

### **Mix Διάλυμα 1 ppm**

Το συγκεκριμένο διάλυμα παρασκευάστηκε από ποσότητες διαλυμάτων που υπήρχαν σε χώρους αποθήκευσης του εργαστηρίου (ψυγείο ή κατάψυξη), στα οποία εμπεριέχεται ένας μεγάλος αριθμός γεωργικών φαρμάκων. Διαλύτης αποτέλεσε η ακετόνη. Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε επίσης ως διάλυμα τόσο στη παρασκευή των standard όσο και των spike διαλυμάτων.

### Πρότυπα διαλύματα (Standard solutions, std)

Τα standard διαλύματα αποτελούνται από MIX 1 ppm και εσωτερικά πρότυπα (I.S.). Τελικός όγκος θεωρούνται τα 2 mL και οι ακριβείς ποσότητες από το MIX διάλυμα που απαιτούνται για την παρασκευή τους υπολογίζονται παρακάτω.

5 ppm:  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \rightarrow 1 \text{ ppm} \times V_{5\text{ppm}} = 5 \text{ ppb} \times 2 \text{ mL} \rightarrow V_{5\text{ppb}} = 10 \text{ }\mu\text{L}$   
από το MIX 1 ppm

50 ppm:  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \rightarrow 1 \text{ ppm} \times V_{50\text{ppm}} = 50 \text{ ppb} \times 2 \text{ mL} \rightarrow V_{50\text{ppb}} = 100 \text{ }\mu\text{L}$   
από το MIX 1 ppm

500 ppm:  $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2 \rightarrow 1 \text{ ppm} \times V_{500\text{ppm}} = 500 \text{ ppb} \times 2 \text{ mL} \rightarrow V_{500\text{ppb}} = 1 \text{ mL}$   
από το MIX 1 ppm

Σημειώνεται ότι σε κάθε περίπτωση συμπληρώνεται ποσότητα ακετόνης έως ότου ο όγκος του διαλύματος να είναι 2 mL.

### Φορτισμένα διαλύματα (Spike solutions, spk)

Τα spike διαλύματα αποτελούνται από MIX 1 ppm, εσωτερικά πρότυπα (I.S.) και blank δείγμα ποσότητας 2 γραμμαρίων. Τελικός όγκος θεωρούνται τα 2 mL και οι ακριβείς ποσότητες από το MIX διάλυμα που απαιτούνται για την παρασκευή τους υπολογίζονται παρακάτω.

Έχουμε,  $1 \text{ ppm} \rightarrow 1000 \text{ ng} / \text{mL} \rightarrow 1000 \text{ ng} / 1000 \text{ }\mu\text{L}$  (1)

❖ Άρα, για τα 5 ppm  $\rightarrow 5 \text{ ng} / \text{g} \rightarrow 10 \text{ ng} / 2\text{g}$

Συνεπώς λαμβάνοντας υπόψιν και την (1), για τη παρασκευή των 5 ppm απαιτείται ποσότητα ίση με 10  $\mu\text{L}$ .

❖ Άρα, για τα 50 ppm  $\rightarrow 50 \text{ ng} / \text{g} \rightarrow 100 \text{ ng} / 2\text{g}$

Συνεπώς λαμβάνοντας υπόψιν και την (1), για τη παρασκευή των 50 ppm απαιτείται ποσότητα ίση με 100  $\mu\text{L}$ .

❖ Άρα, για τα 500 ppm  $\rightarrow 500 \text{ ng} / \text{g} \rightarrow 1000 \text{ ng} / 2\text{g}$

Συνεπώς λαμβάνοντας υπόψιν και την (1), για τη παρασκευή των 500 ppm απαιτείται ποσότητα ίση με 1000  $\mu\text{L}$  ή 1 mL.

Σημειώνεται ότι σε κάθε περίπτωση συμπληρώνεται ποσότητα ακετόνης έως ότου ο όγκος του διαλύματος να είναι 2 mL.

Με το τρόπο αυτό ελέγχεται ο τρόπος αλληλεπίδρασης της μήτρας ή αλλιώς του υποστρώματος με τον διαλύτη του συστήματος.

### Άλατα A (Citrate salts OuEChERS)

Τα συγκεκριμένα άλατα χρησιμοποιούνται μαζί ως άλατα εκχύλισης των επιθυμητών ουσιών και αποτελούν και ρυθμιστές του pH. Απαρτίζονται από:

- a. 0.8 g  $MgSO_4$
- b. 0.2 g  $NaOAc$
- c. 0.2 g *trisodium citrate dehydrate*
- d. 0.1 g *sodium hydrogen citrate sesquihydrate*

### Άλατα B (Clean up salts)

Τα συγκεκριμένα άλατα χρησιμοποιούνται μαζί ως άλατα περαιτέρω καθαρισμού των επιθυμητών ουσιών που έχουν εκχυλιστεί μετά τη χορήγηση των αλάτων Α. Απαρτίζονται από:

- a. 0.5 g  $MgSO_4$
- b. 50 mg *PSA*
- c. 50 mg  $C_{18}$
- d. 50 mg *Z-Sep*

### Προετοιμασία δειγμάτων

#### Δείγματα μελισσών

Αρχικά, παρασκευάστηκαν τα άλατα Α και Β και ζυγίστηκε ποσότητα δείγματος μελισσών ίση με 2 gr σε falcon 50 mL. Στη συνέχεια, προστέθηκαν ποσότητες από τα παρασκευαζόμενα εσωτερικά πρότυπα (I.S.), όπως παρουσιάστηκαν παραπάνω, 2 mL  $H_2O$  και με τη βοήθεια μιας γυάλινης ράβδου πραγματοποιήθηκε πολτοποίηση, ώστε να δημιουργηθεί ένα ομοιογενές μίγμα. Προστέθηκαν επιπλέον 4 mL ACN καθώς και τα άλατα Α,

γνωστά και ως άλατα εκχύλισης, και όλα τα δείγματα που παρασκευάστηκαν αναδεύτηκαν για 30'' στη συσκευή *Vortex* και για άλλα 300'' στην συσκευή *Agytax*, όπου στη τελευταία τα δείγματα τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά. Μετά το πέρας του χρονικού αυτού διαστήματος, τα δείγματα τοποθετήθηκαν αντιδιαμετρικά στην φυγόκεντρο, ρυθμίστηκαν οι κατάλληλες παράμετροι, στροφές  $\rho=4500\text{rpm}$ , θερμοκρασία  $T=10^{\circ}\text{C}$ , χρόνος  $t=5\text{min}$  και η φυγόκεντρος



*Εικόνα 20. Ανακινούμενη αυτόματη συσκευή εκχύλισης ή συσκευή Agytax.*



*Εικόνα 21. Φυγόκεντρος.*

τέθηκε σε λειτουργία. Τα δείγματα, στη συνέχεια, αφαιρέθηκαν από τη φυγόκεντρο και όλη η ποσότητα της οργανικής στοιβάδας του ACN, μεταφέρθηκε σε falcon 15 mL με βοήθεια της πιπέτας pasteur. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν στον καταψύκτη στους  $-80^{\circ}\text{C}$  για περίπου 3' ώστε να κατακρυσυνθούν υπολείμματα λιπιδίων με μεγάλες ανθρακικές αλυσίδες και τυχόν ανεπιθύμητες ακαθαρσίες.

Ύστερα, ποσότητα ίση με 2 mL μεταφέρθηκε εκ νέου σε falcon 15 mL με τη βοήθεια αυτόματης πιπέτας Gilson και πραγματοποιήθηκε προσθήκη της ποσότητας των αλάτων B, γνωστά και ως άλατα περαιτέρω καθαρισμού, σε αυτό. Τα δείγματα για ακόμη μια φορά ανακινήθηκαν για περίπου 30'' στη συσκευή *Vortex* και τοποθετήθηκαν στη φυγόκεντρο. Έπειτα, όλη η ποσότητα μεταφέρθηκε, με απόχυση, σε γυάλινη σύριγγα των 10 mL, στη άκρη της οποίας είχε εισαχθεί και φίλτρο, και ασκώντας την απαιτούμενη δύναμη τα δείγματα φιλτραρίστηκαν και αποχύθηκαν σε ογκομετρικές γυάλινες φιάλες, οι οποίες στη συνέχεια τοποθετήθηκαν η μία μετά την άλλη στο *rotavapor*, ώστε να πραγματοποιηθεί επι ξηρού περιστροφική εξάτμιση του διαλύτη. Μετά την εξάτμιση, πραγματοποιήθηκε ανασύσταση προκειμένου τα δείγματα να έχουν τον κατάλληλο διαλύτη πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα τόσο της υγρής χρωματογραφίας. Πιο συγκεκριμένα, προστέθηκε ποσότητα ίση με 2 mL διαλύτη  $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$  (75:25) και αναδεύτηκε η φιάλη έως ότου να διαλυθεί η ποσότητα του δείγματος σε αυτόν. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια γυάλινης πιπέτας, πάρθηκε ποσότητα ίση με 1.5 mL η οποία μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο που προοριζόταν για το σύστημα της



*Εικόνα 22. Rotavapor ή Περιστροφικός Εξάτμιστήρας.*

υγρής χρωματογραφίας. Με αυτόν τον τρόπο γεμίστηκαν όλα τα vials και τα δείγματα ήταν πλέον έτοιμα για εισαγωγή στο σύστημα της υγρής χρωματογραφίας για ανάλυση.

### **Δείγματα μελιού, κηρήθρας, γύρης**

*\*Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για τα παρασκευή των δειγμάτων του μελιού, της κηρήθρας και της γύρης ήταν παρόμοια, με τη διαφορά ότι δεν χρειάστηκε πολτοποίηση στο αρχικό στάδιο προεργασίας με γυάλινη ράβδο και ότι ο χρόνος στο vortex ήταν σαφώς μεγαλύτερος, ειδικά στη περίπτωση του κεριού.*

*\*Επιπλέον, επειδή η κηρήθρα θεωρείται πιο δύσκολο υλικό σε σχέση με τα υπόλοιπα μελισσοκομικά υποστρώματα, για επεξεργασία της, λόγω της μη διαλυτότητάς της σε νερό, χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλισή, 2 mL εξάνιο αντί 2 mL υπερκάθαρο νερό.*

*\* Σημειώνεται πως η συσκευή Agytax μειώνει την παραλλακτικότητα από το χέρι λόγω ανακίνησης καθώς προσφέρει επαναληψιμότητα κινήσεων για ομοιογενοποίηση.*

### **Κινητές Φάσεις Υγρής Χρωματογραφίας**

Μετά την προετοιμασία των δειγμάτων, παρασκευάστηκαν και οι κινητές φάσεις της υγρής χρωματογραφίας. Πιο συγκεκριμένα, έχουμε:

#### **Οργανική φάση**

MeOH, 0.1% Formic acid, 314 mg Ammonium formate

#### **Υδατική φάση**

H<sub>2</sub>O, 0.1% Formic acid, 0.02% ACN, 314 mg Ammonium formate

*\*Σημειώνεται, πως οι φάσεις τοποθετήθηκαν για απαέρωση σε σύστημα υπερήχων για περίπου 30' προτού τοποθετηθούν στο όργανο της υγρής χρωματογραφίας για εκκίνηση της ανάλυσης.*

## Προετοιμασία Υγρού Χρωματογράφου και Φασματομέτρου μάζας

Αρχικά, τοποθετήθηκαν στο κατάλληλο σημείο και με σωστό τρόπο, οι κινητές φάσεις της υγρής χρωματογραφίας, με τα αντίστοιχα σωληνάκια, Α και Β, να ακουμπούν στο πάτο των φιαλών. Στη συνέχεια, τοποθετήθηκαν όλα τα vials, standards, spikes, blank, δείγματα, και vials καθαρισμού της σύριγγας, στις κατάλληλες θέσεις του LC που όριζε η διαδικασία της sequence (αναφέρεται παρακάτω). Ύστερα, ανοίχτηκε το πρόγραμμα *Agilent MassHunter Workstation Data Acquisition* και πατώντας το κουμπί on, ενεργοποιήθηκαν όλα τα κομμάτια της οργανολογίας. Όταν όλα τα τμήματα από γκρι έγιναν πράσινα, ξεκίνησε η διαδικασία της απαέρωσης. Αναλυτικότερα, στο τμήμα του *MS QQQ(+)*, επιλέχθηκε το “Waste”, και η μαύρη βαλβίδα γυρίστηκε αριστερόστροφα, πραγματοποιώντας σύνδεση του βρόγχου με τα απόβλητα και όχι με το MS, ώστε να καθαρίζεται η στήλη και το σύστημα από τυχόν ακαθαρσίες από προηγούμενες αναλύσεις και να μη μολύνεται ο φασματογράφος μάζας. Η ροή ρυθμίστηκε στα 4 mL/min. Το σύστημα με διαλύτη Α σε ποσοστό 100% αφέθηκε για περίπου 10’ και αντίστοιχα συνέβη και για διαλύτη Β 100% και για Α:Β (50%:50%). Στη συνέχεια, η ροή του διαλύτη ρυθμίστηκε σε 0.28 mL/min με αναλογία εκκίνησης διαλυτών Α:Β (75%:25%), η βαλβίδα βιδώθηκε δεξιόστροφα και επιλέχθηκε πλέον το “MS” έναντι του “Waste”. Καθόλη τη διάρκεια της απαέρωσης, τυχόν φυσαλίδες κατακερματίστηκαν και εν τέλει επιτεύχθη ένα σταθερό σύστημα με μηδενικά σταγονίδια αέρα που τυχόν θα μπορούσαν να επηρεάσουν την συνολική ανάλυση των δειγμάτων, για παράδειγμα αυξομειώνοντας την πίεση διαταράσσοντας με αυτό τον τρόπο το ολικό σύστημα. Από το set solvent values πάνω στο τμήμα των διαλυτών ορίστηκαν ακόμα και οι πραγματικές τιμές όγκων των κινητών φάσεων.

Εφόσον ολοκληρώθηκε η διαδικασία τοποθέτησης, απαέρωσης και ρύθμισης των παραμέτρων και επιλογής της κατάλληλης μεθόδου ανάλυσης, πατήθηκε το “run” για την έναρξη της ανάλυσης. Περαιτέρω πληροφορίες για τη μέθοδο και την ανάλυση αποτελεσμάτων παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικόνα 23. Agilent LC-ESI-MS/MS

\*Σημειώνεται ότι καθόλη τη διάρκεια της απαέρωσης και πριν ξεκινήσει η ανάλυση, η παρατήρηση και καταγραφή της πίεσης του συστήματος ήταν αξιοσημείωτη.

\*Σημαντικό κομμάτι της διαδικασίας αποτέλεσε και η αλληλουχία των δειγμάτων στο όργανο ή αλλιώς η *sequence*, όπου δημιουργήθηκε το *batch* με την εξής ακολουθία:

*Methanol*

*Standard 5 ppb*

*Standard 50 ppb*

*Standard 500 ppb*

*Methanol*

*Blank*

*Sample<sub>1</sub>*

*Sample<sub>n</sub>*

*Methanol*

*Spike 5 ppb*

*Spike 50 ppb*

*Spike 500 ppb*

\*Συνθήκες λειτουργίας LC: Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των μελετούμενων αναλυτών πραγματοποιήθηκε με στήλη ανάστροφης φάσης *Eclipse XDB-C18* (*ZORBAX*<sup>®</sup>, *Agilent Technologies*) μήκους 150mm, διαμέτρου 2.1mm και διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 3.5μm. Ο όγκος έγχυσης δείγματος ήταν 10μL και η ροή της κινητής φάσης 0.28 mL/min. Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υδατική φάση σε ddH<sub>2</sub>O (φάση A) και οργανική φάση σε MeOH (φάση B) εφαρμόζοντας βαθμιδωτή έκλυση (*gradient elution*). Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφήματος ορίστηκε στα 35 min / ένεση, οπότε και το σύστημα επανέρχεται στις αρχικές συνθήκες. Η θερμοκρασία της στήλης παρέμεινε σταθερή, στους 30°C καθ' όλη τη διάρκεια της χημικής ανάλυσης.

\*Συνθήκες λειτουργίας ESI-MS/MS: Στο σύστημα ηλεκτροψεκασμού (*ESI*) εφαρμόστηκε θετικός ιοντισμός (+), με εφαρμογή δυναμικού +3000V στο γυάλινο τριχοειδές (*capillary*). Ως αέριο εκνέφωσης στην πηγή ιόντων και ως αέριο ξήρανσης χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο (*N<sub>2</sub>*) σε πίεση 30psi και σε θερμοκρασία 300°C και με ροή 9L/min αντίστοιχα. Επιπλέον το άζωτο χρησιμοποιήθηκε και ως αέριο σύγκρουσης στο τετράπολο q<sub>2</sub> (εν προκειμένω εξάπολο). Ο αναλυτής μάζας τριπλού τετραπόλου ρυθμίστηκε σε λειτουργία *MRM*.

## 5. Ανάλυση αποτελεσμάτων

Για την ανάλυση του εκάστοτε δείγματος σημειώνεται πως είχε δημιουργηθεί η απαιτούμενη μέθοδος σε προηγούμενη περίοδο αναλύσεων του εργαστηρίου, συνεπώς χρησιμοποιήθηκε αυτούσια χωρίς να πραγματοποιηθεί κάποια περαιτέρω αλλαγή. Η μέθοδος στηρίζεται σε βιβλιογραφική αναζήτηση που είχε προηγηθεί και τα δεδομένα σχετικά με τις εκάστοτε ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις καθίστανται αξιόπιστες και ακριβείς. Παρακάτω παρουσιάζονται και αναλύονται τα αποτελέσματα όλων των δειγμάτων που εισήχθησαν για χρωματογραφική ποιοτική και ποσοτική ανάλυση. Τα όρια ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification, LOQ) όλων των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στο πίνακα του παραρτήματος.

### 5.1 Δείγματα Μελισσών

Τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν με την προαναφέρουσα μέθοδο ήταν στο σύνολο 7 και τα γεωργικά φάρμακα τα οποία ταυτοποιήθηκαν ήταν τα εξής: *Acetamiprid*, *Carbendazim*, *Methomyl* και *Thiacloprid*. Στον πίνακα 15 παρουσιάζονται εκτενέστερα τα εύρηματα για τα συγκεκριμένα δείγματα.

Πίνακας 14. Αποτελέσματα ζυγίσεων δειγμάτων μελισσών.

N <sup>ο</sup> δείγματος	61-20	62-20	63-20	64-20	65-20	66-20	67-20
<i>Μάζα (m)</i>	2.083 g	2.008 g	2.013 g	1.264 g	0,969 g	2,036 g	2.028 g

Πίνακας 15. Ευρήματα γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα μελισσών 1-7.

N <sup>ο</sup> Δείγματος	<i>Acetamiprid</i>	<i>Carbendazim</i>	<i>Methomyl</i>	<i>Thiacloprid</i>
1 (61-20)	•	•	•	•
2 (62-20)		•	•	•
3 (63-20)		•		
4 (64-20)		•		
5 (65-20)				•
6 (66-20)		•		
7 (67-20)				

Πίνακας 16. Αποτελέσματα Acetamiprid στα δείγματα μελισσών.

Acetamiprid	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	11.883	20198	20.4	1789954	0.0113	
	Spike5ppb	11.883	115690	23.52	611388	0.1892	
	1 (61-20)	11.883	34978	28.1	398977	0.0877	2.32

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 1 σε Acetamiprid πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area/Area\ IS\ (\delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma) \times 5 / Area/Area\ IS\ (spk5ppb)$ .

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{61-20} = 1.1\ ppb$ .

### Acetamiprid

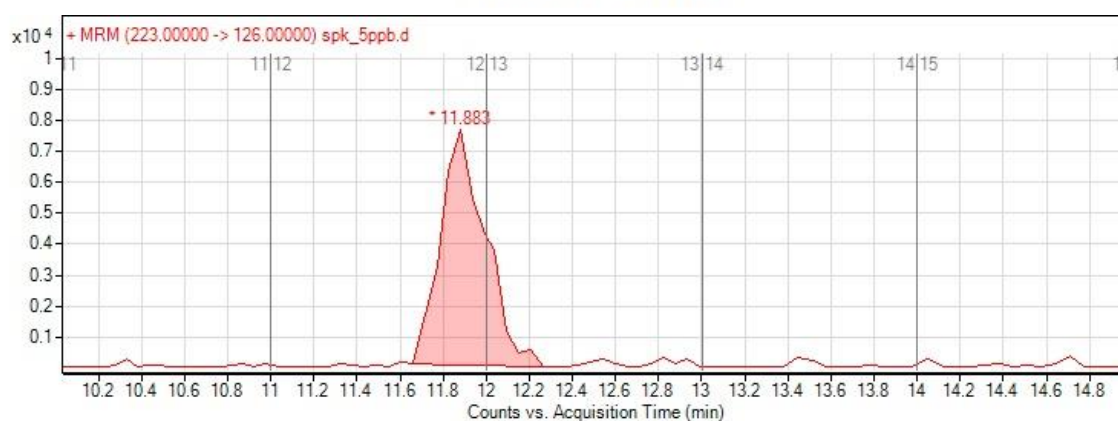
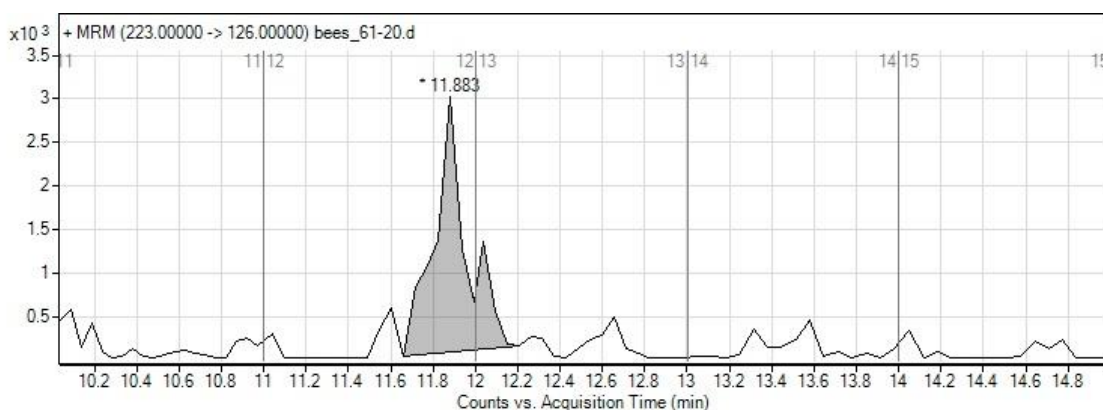
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

EXACT MASS = 222, MS [MH+] = 223

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 223 → 126 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

223 → 90 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

- $LD_{50, contact} = 8.09\ \mu g/bee$   
Αν 1 bee = 0.1g, τότε  $LD_{50, contact} = 80.9\ \mu g/g = 80.9\ mg/kg = 80.9\ ppm$
- $LD_{50, oral} = 14.53\ \mu g/bee$   
Αν 1 bee = 0.1g, τότε  $LD_{50, contact} = 145.3\ \mu g/g = 145.3\ mg/kg = 145.3\ ppm$



Εικόνα 24. Φάσμα MRM δείγματος 1 (61-20), blank bees και spk 5 ppb για Acetamiprid.

Πίνακας 17. Αποτελέσματα Carbendazim στα δείγματα μελισσών.

Carbendazim	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank		103163				
	Spike5ppb	6.14	274136	19.7	2215827	0.1237	
	Spike50ppb	6.491	2840069	15.8	1877563	1.5126	
	1 (61-20)	6.444	292774	20.3	1007028	0.290731	10.41
	2 (62-20)	6.233	288499	18	1043566	0.276455	9.95
	3 (63-20)	6.28	282453	18.3	916302	0.308253	10.98
	4 (64-20)	6.421	284073	21.3	874339	0.3249	11.52
	7 (67-20)	6.444	182338	21.2	638756	0.285458	10.24

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1, 2, 3, 4 και 7 σε Carbendazim πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb και ισούται με:

$$[50 \times [\text{Area/Area IS}_{(\text{δείματος})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{spk5ppb})}] + 5 \times [\text{Area/Area IS}_{(\text{spk50ppb})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{δείματος})}]] / [\text{Area/Area IS}_{(\text{spk50ppb})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{spk5ppb})}]$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{61-20} = 5.00 \text{ ppb}$ ,  $C_{62-20} = 4.96 \text{ ppb}$ ,  $C_{63-20} = 5.45 \text{ ppb}$ ,  $C_{64-20} = 9.11 \text{ ppb}$  και  $C_{67-20} = 5.05 \text{ ppb}$ .

### Carbendazim

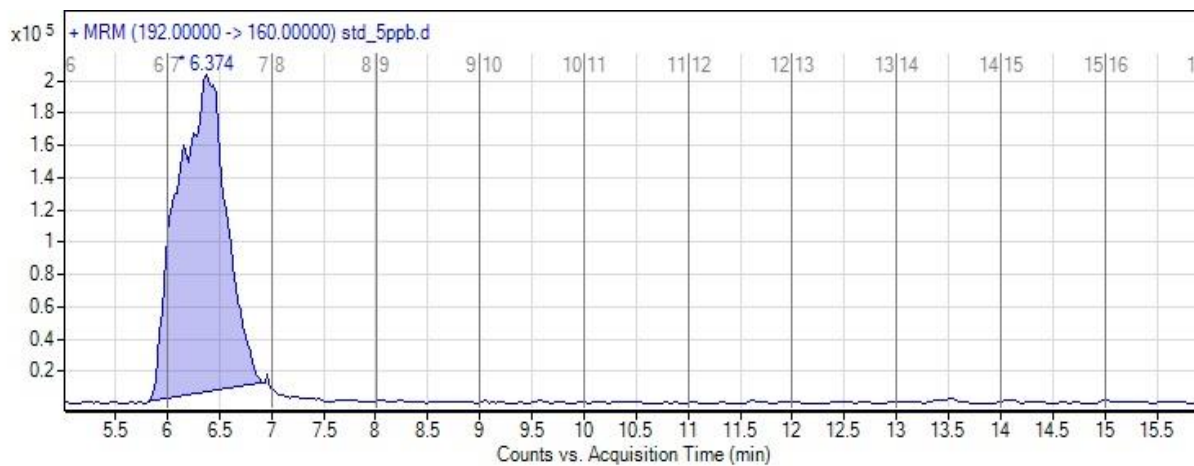
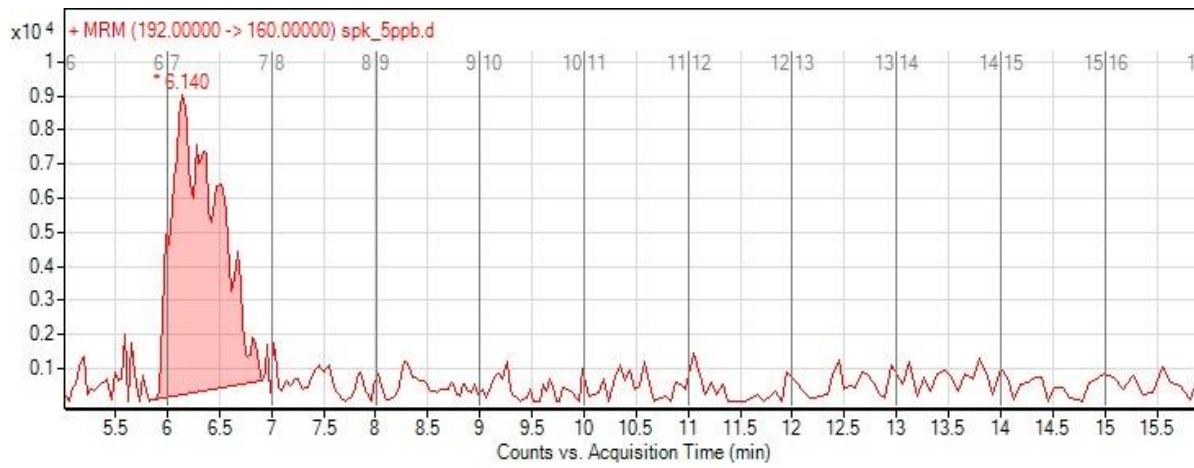
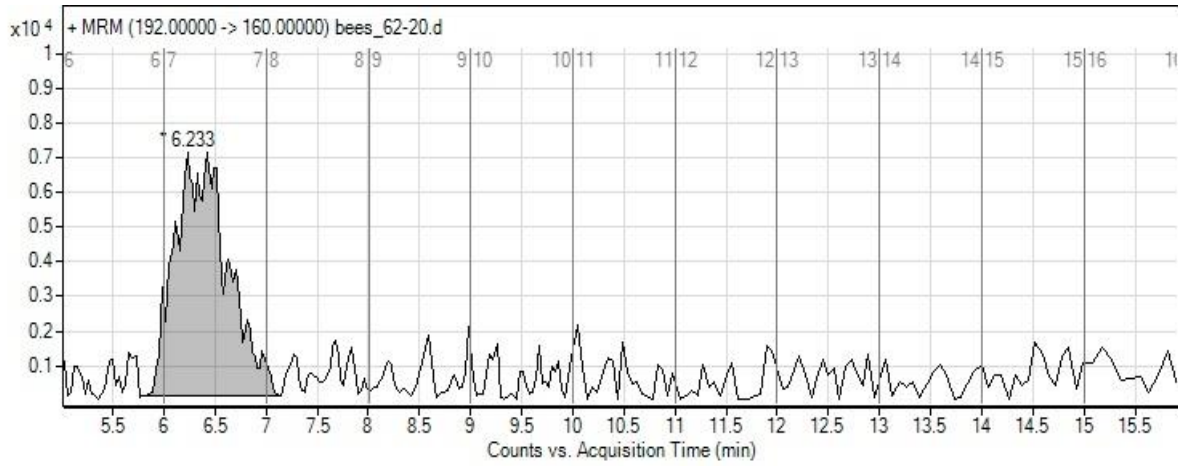
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

EXACT MASS = 191, MS [MH+] = 192

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 192 → 160 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

192 → 132 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

- $LD_{50, \text{contact}} > 50 \text{ } \mu\text{g}/\text{bee}$   
Αν 1 bee = 0.1g, τότε  $LD_{50, \text{contact}} > 500 \text{ } \mu\text{g}/\text{g} = 500 \text{ mg}/\text{kg} = 500 \text{ ppm}$
- $LD_{50, \text{oral}} > 100 \text{ } \mu\text{g}/\text{bee}$   
Αν 1 bee = 0.1g, τότε  $LD_{50, \text{oral}} > 1000 \text{ } \mu\text{g}/\text{g} = 1000 \text{ mg}/\text{kg} = 1000 \text{ ppm}$



**Εικόνα 25. Φάσμα MRM δείγματος 1 (62-20), *spk* 5 ppb και *std* 5 ppb για Carbendazim.**

Πίνακας 18. Αποτελέσματα Methomyl στα δείγματα μελισσών.

Methomyl	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank		1281				
	Spike5ppb	5.399	67159	100	1	67159	
	Spike50ppb	5.399	522608	109.5	1	522608	
	Spike50ppb	5.399	15503036	100.4	1	15503036	
	1 (61-20)	5.399	4023958	93.1	1	4023958	155
	4 (64-20)	5.399	343649	95.1	1	343649	32

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 1 σε Methomyl πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 50 ppb και spike 500 ppb και ισούται με:

$$[500 \times [Area/Area IS_{(δείγματος)} - Area/Area IS_{(spk50ppb)}] + 50 \times [Area/Area IS_{(spk500ppb)} - Area/Area IS_{(δείγματος)}]] / [Area/Area IS_{(spk500ppb)} - Area/Area IS_{(spk50ppb)}]$$

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 4 σε Methomyl πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb και ισούται με:

$$[50 \times [Area/Area IS_{(δείγματος)} - Area/Area IS_{(spk5ppb)}] + 5 \times [Area/Area IS_{(spk50ppb)} - Area/Area IS_{(δείγματος)}]] / [Area/Area IS_{(spk50ppb)} - Area/Area IS_{(spk5ppb)}]$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{61-20} = 74.41$  ppb και  $C_{64-20} = 25.32$  ppb.

### Methomyl

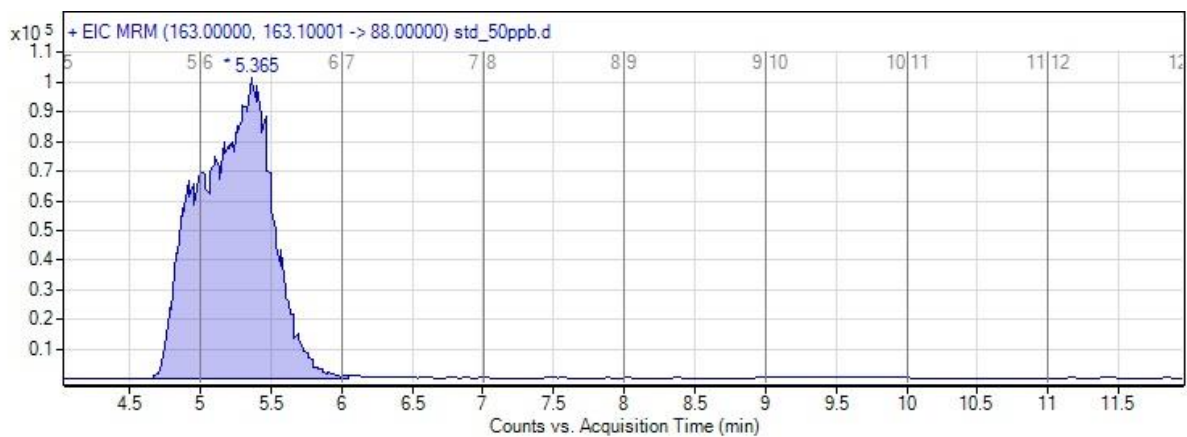
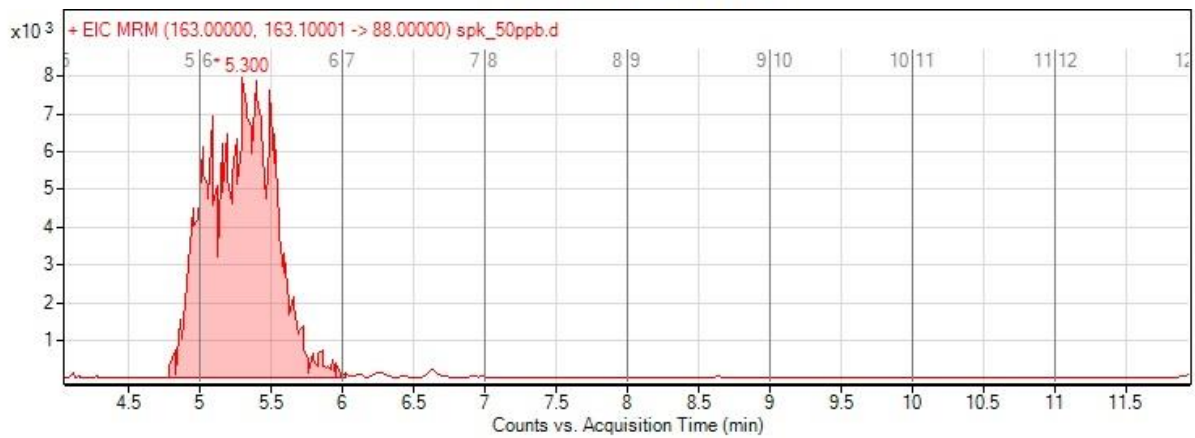
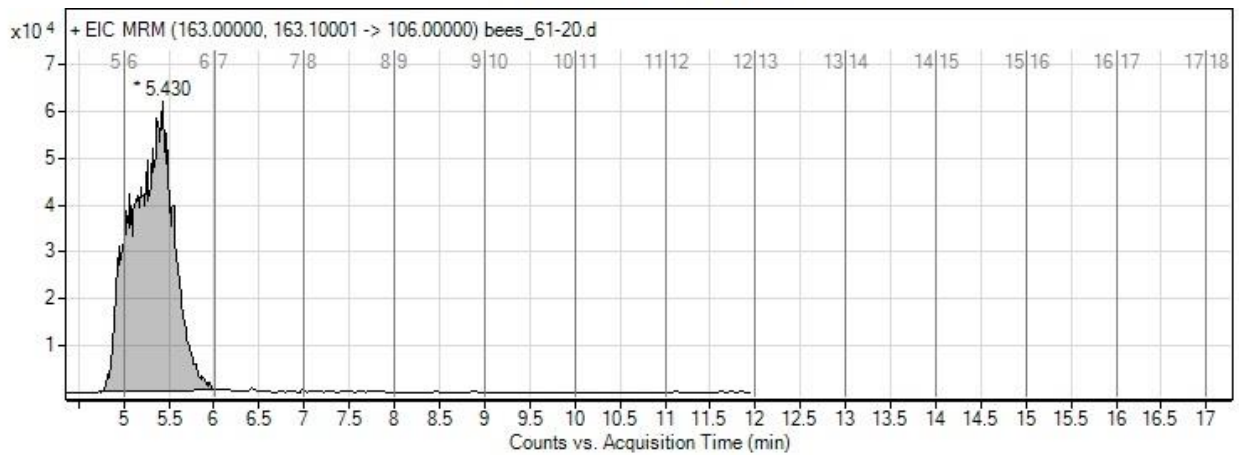
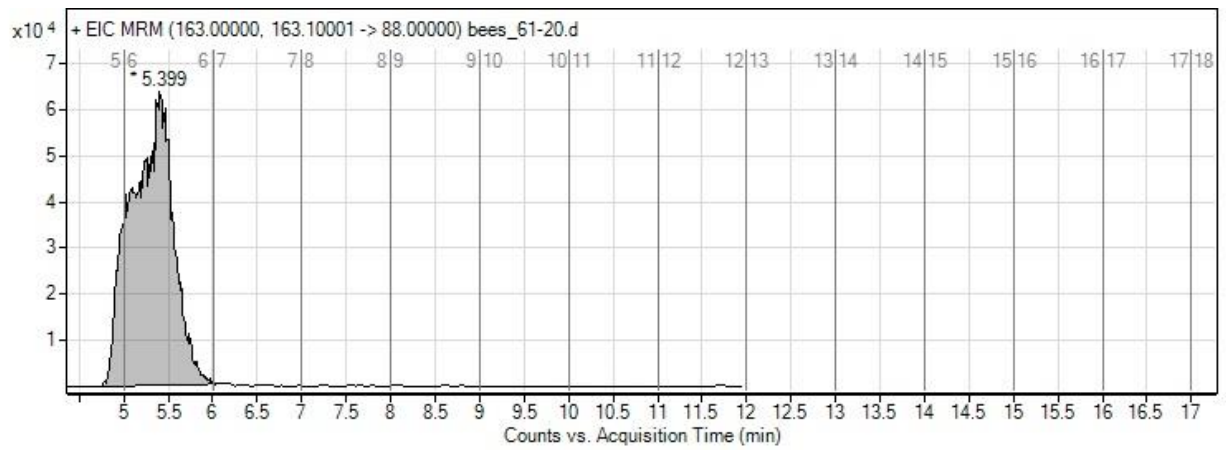
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

EXACT MASS = 162, MS [MH+] = 163

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 163 → 88 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

163 → 106 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

- $LD_{50, contact} = 0.16$  µg/bee  
Αν 1 bee = 0.1g, τότε  $LD_{50, contact} = 1.6$  µg/g = 1.6 mg/kg = 1.6 ppm
- $LD_{50, oral} = 0.28$  µg/bee  
Αν 1 bee = 0.1g, τότε  $LD_{50, oral} = 2.8$  µg/g 2.8 mg/kg = 2.8 ppm



**Εικόνα 26. Φάσμα MRM δείγματος 1 (61-20) 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> μετάπτωσης, spk 5 ppb και std 5 ppb για Methomyl.**

Πίνακας 19. Αποτελέσματα *Thiacloprid* στα δείγματα μελισσών.

Thiacloprid	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	13.495	43843	0.4	160.7559	272.7303	
	Spike5ppb	13.428	182793	0.7	611389	0.2990	
	Spike50ppb	13.428	2238051	1.4	557688	4.0131	
	Spike500ppb	13.495	57071539	1.1	1188121	48.0351	
	1 (61-20)	13.428	2320183	1.2	398977	5.81533	68.42
	2 (62-20)	13.428	1279959	1.6	405686	3.155048	39.60
	5 (65-20)	13.428	1186407	1.8	286291	4.14406	51.59

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1 σε *Thiacloprid* πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου *bracketing* μεταξύ των *spike 50 ppb* και *spike 500 ppb* και ισούται με:

$$[500 \times [Area/Area IS_{(δείγματος)} - Area/Area IS_{(spk50ppb)}] + 50 \times [Area/Area IS_{(spk500ppb)} - Area/Area IS_{(δείγματος)}]] / [Area/Area IS_{(spk500ppb)} - Area/Area IS_{(spk50ppb)}].$$

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 2 και 5 σε *Thiacloprid* πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου *bracketing* μεταξύ των *spike 5 ppb* και *spike 50 ppb* και ισούται με:

$$[50 \times [Area/Area IS_{(δείγματος)} - Area/Area IS_{(spk5ppb)}] + 5 \times [Area/Area IS_{(spk50ppb)} - Area/Area IS_{(δείγματος)}]] / [Area/Area IS_{(spk50ppb)} - Area/Area IS_{(spk5ppb)}].$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{61-20} = 32.85 \text{ ppb}$ ,  $C_{62-20} = 19.72 \text{ ppb}$  και  $C_{65-20} = 53.24 \text{ ppb}$ .

### Thiacloprid

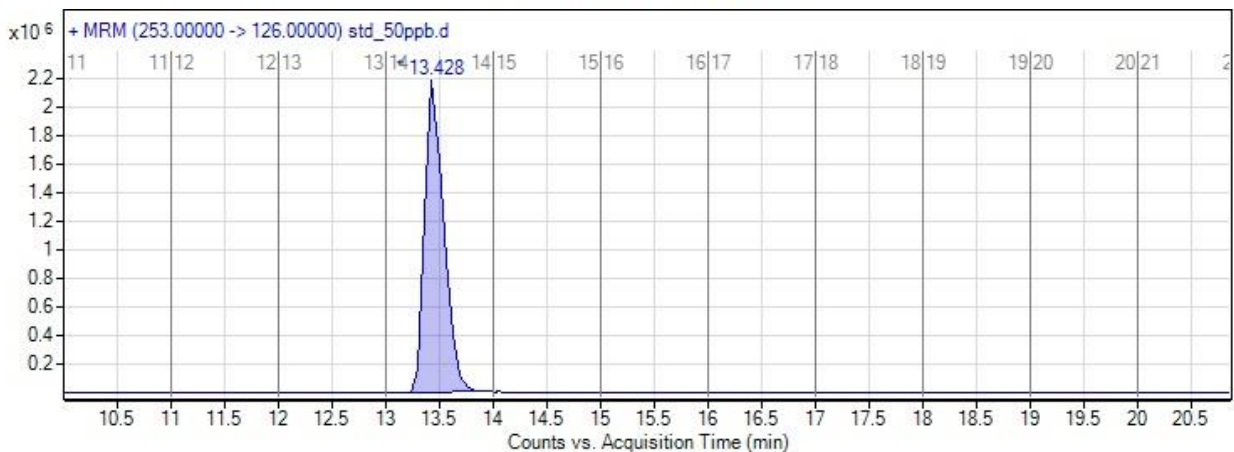
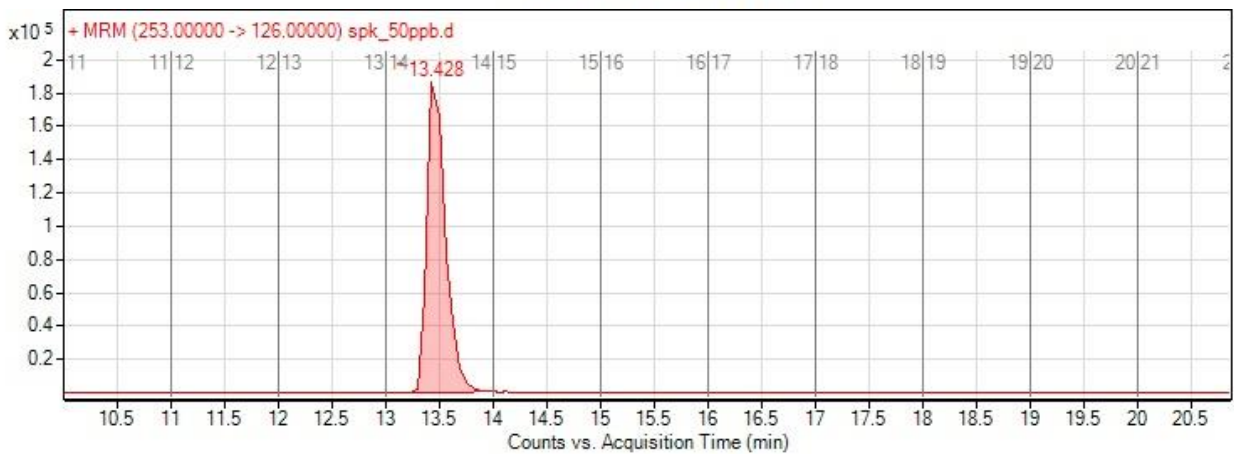
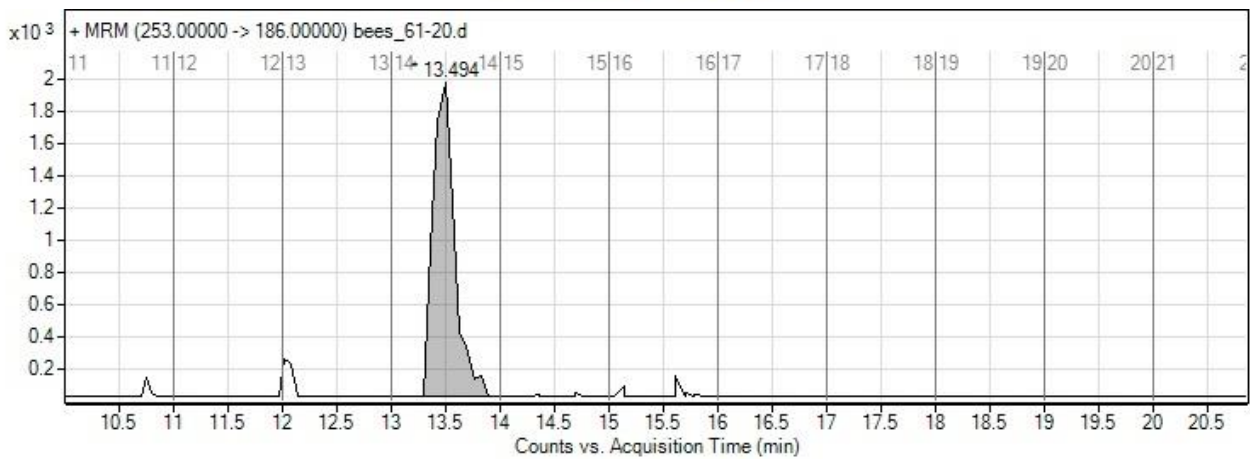
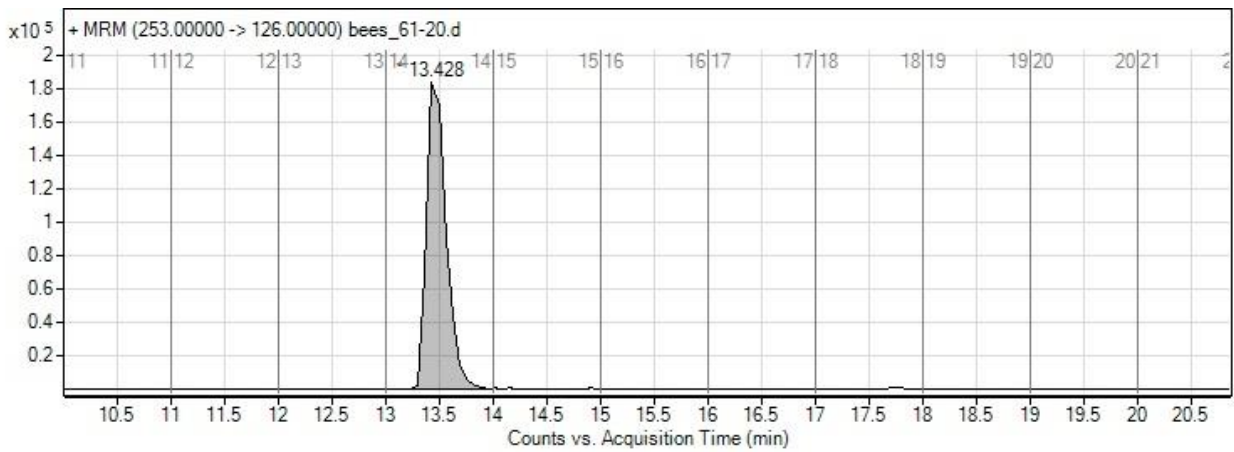
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

EXACT MASS = 252, MS [MH+] = 253

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 253 → 126 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

253 → 186 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

- $LD_{50, \text{contact}} = 38.82 \text{ } \mu\text{g/bee}$   
Αν 1 bee = 0.1g, τότε  $LD_{50, \text{contact}} = 388.2 \text{ } \mu\text{g/g} = 388.2 \text{ mg/kg} = 388.2 \text{ ppm}$
- $LD_{50, \text{oral}} = 17.32 \text{ } \mu\text{g/bee}$   
Αν 1 bee = 0.1g, τότε  $LD_{50, \text{oral}} = 173.2 \text{ } \mu\text{g/g} = 173.2 \text{ mg/kg} = 173.2 \text{ ppm}$



**Εικόνα 27. Φάσμα MRM δείγματος 1 (61-20) 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> μετάπτωσης, spk 50 ppb και std 50 ppb για Thiacloprid.**

## 5.2 Δείγματα Μελιού

Τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν με την προαναφέρουσα μέθοδο ήταν στο σύνολο 5 και τα γεωργικά φάρμακα τα οποία ταυτοποιήθηκαν ήταν τα εξής: *Acetamiprid*, *Carbendazim*, *Clothianidin*, *Malathion*, *Methomyl*, *Pendimethalin*, *Tebuconazole* και *Thiacloprid*. Στον πίνακα 20 παρουσιάζονται εκτενέστερα τα εύρηματα για τα συγκεκριμένα δείγματα.

Πίνακας 20. Αποτελέσματα ζυγίσεων δειγμάτων μελιού.

N <sup>ο</sup> δείγματος	71-20	72-20	73-20	74-20	75-20
Μάζα (m)	2.087 g	2.087 g	2.041 g	2.002 g	2.051 g

Πίνακας 21. Ευρήματα γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα μελιού 1-5.

N <sup>ο</sup> Δείγματος	<i>Acetamiprid</i>	<i>Carbendazim</i>	<i>Clothianidin</i>	<i>Malathion</i>	<i>Methomyl</i>
1 (71-20)		•		•	
2 (72-20)		•	•	•	•
3 (73-20)		•			
4 (74-20)	•	•			
5 (75-20)		•			
N <sup>ο</sup> Δείγματος	<i>Pendimethalin</i>	<i>Tebuconazole</i>	<i>Thiacloprid</i>		
1 (71-20)	•	•	•		
2 (72-20)	•	•	•		
3 (73-20)	•		•		
4 (74-20)	•		•		
5 (75-20)	•	•	•		

Πίνακας 22. Αποτελέσματα *Acetamiprid* στα δείγματα μελιού.

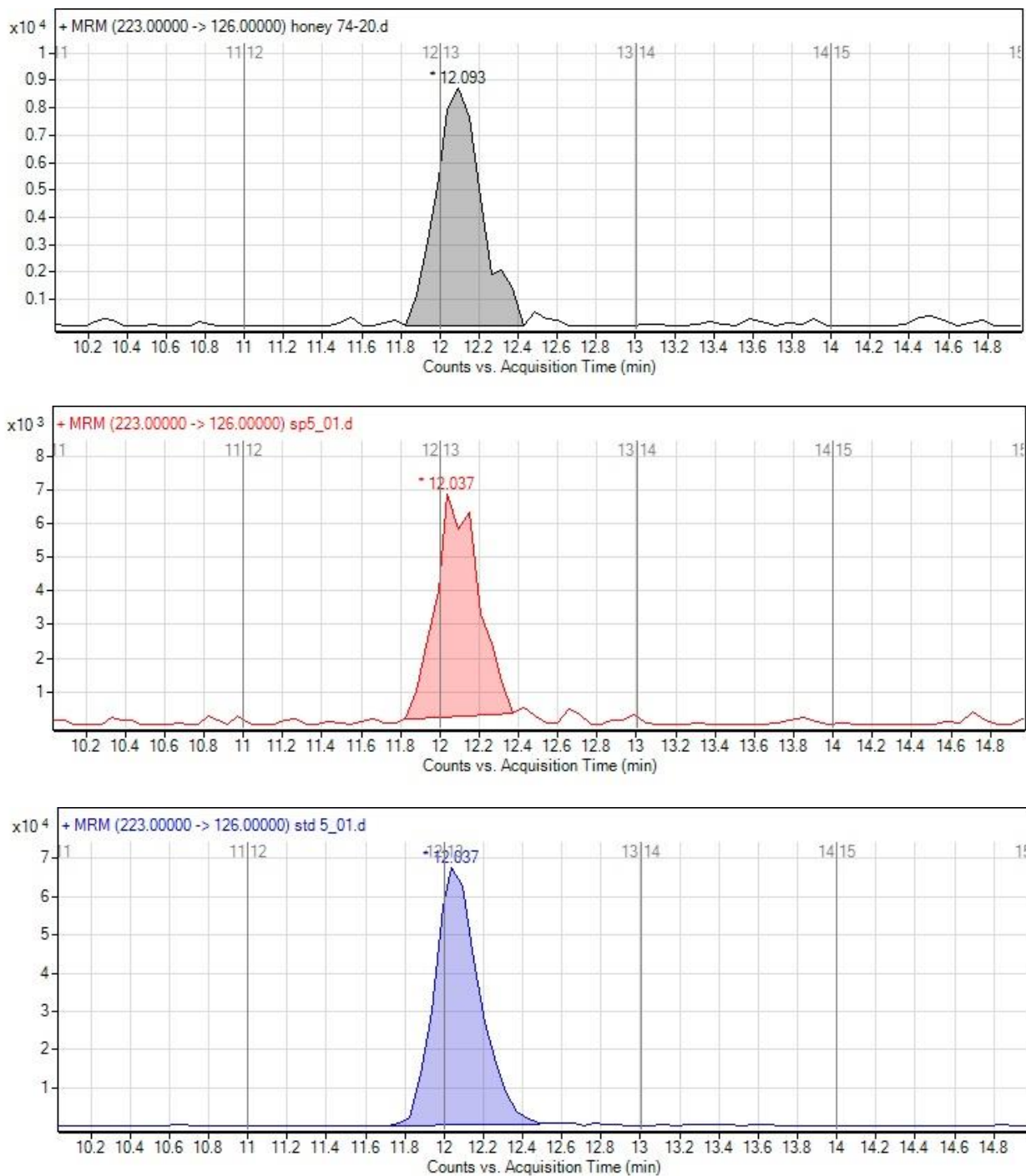
<i>Acetamiprid</i>	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	12.093	9932	13	3970114	0.0025	
	Spike5ppb	12.037	113094	26.2	1706577	0.0663	
	4 (74-20)	12.093	148062	26.1	3991972	0.0371	<b>2.80</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 4 σε *Acetamiprid* πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5ppb, όπου ισούται με:

$Area/Area\ IS\ (\delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma) \times 5 / Area/Area\ IS\ (spk5ppb)$ .

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{74-20} = 1.40\ ppb$

➤  $MRL = 0.05\ mg/kg = 0.05\ ppm$



**Εικόνα 28. Φάσμα MRM δείγματος 1 (71-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Acetaminophen.**

Πίνακας 23. Αποτελέσματα Carbendazim στα δείγματα μελιού.

Carbendazim	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	6.773	51742	2.6	443476	0.1167	
	Spike5ppb	6.702	320228	18.8	138935	2.3049	
	Spike50ppb	6.796	4411148	13.6	226896	19.4413	
	1 (71-20)	6.702	301647	19.7	915576	0.3295	4.71
	2 (72-20)	6.796	298673	17.8	1014761	0.2943	4.66
	3 (73-20)	6.773	357412	18.3	945743	0.3779	5.41
	4 (74-20)	6.655	265696	15.2	880070	0.3019	4.15
	5 (75-20)	6.655	340639	20.9	1063637	0.3203	5.22

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1,2 και 4 σε Acetamiprid πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

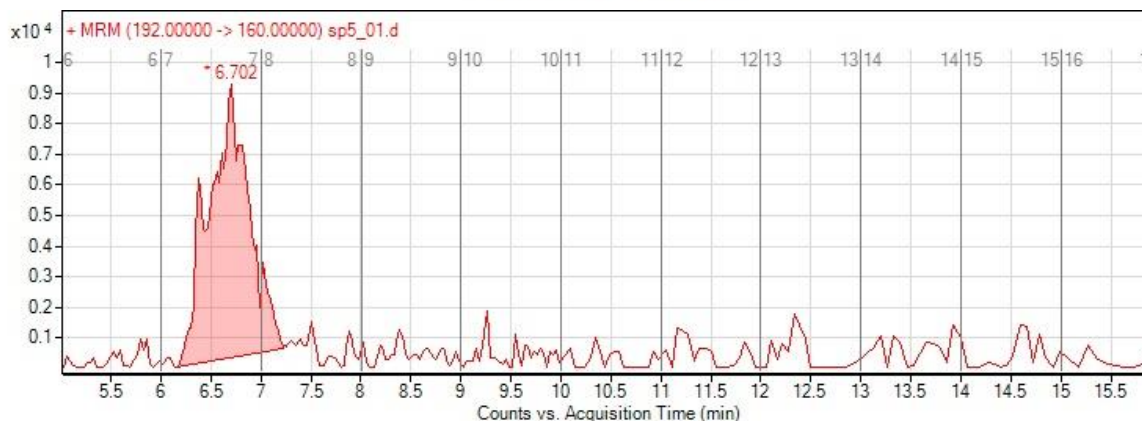
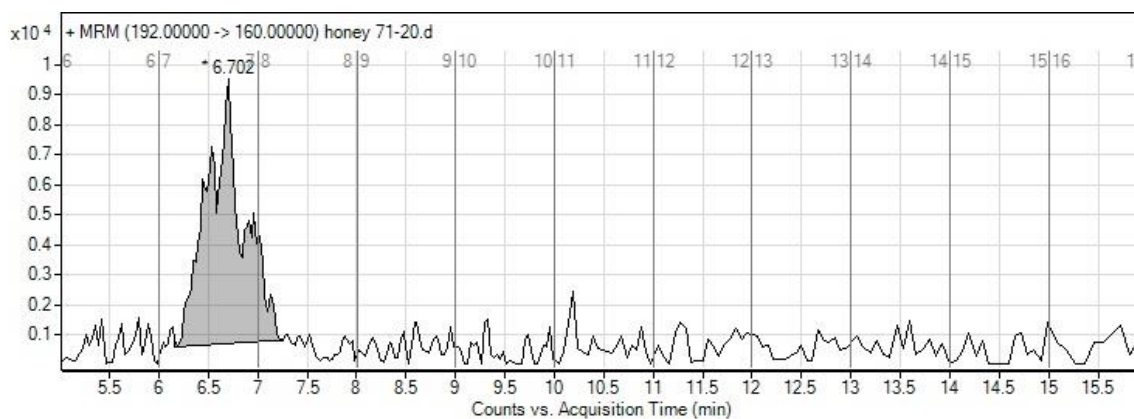
$$Area_{(δείγματος)} \times 5 / Area_{(spk5ppb)}$$

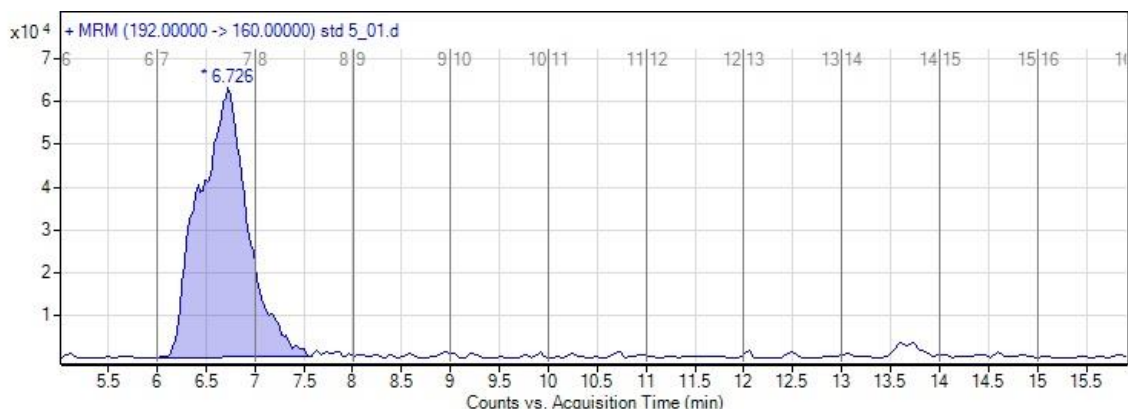
\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 3 και 5 σε Acetamiprid πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb και ισούται με:

$$[50 \times [Area_{(δείγματος)} - Area_{(spk5ppb)}] + 5 \times [Area_{(spk50ppb)} - Area_{(δείγματος)}]] / [Area_{(spk50ppb)} - Area_{(spk5ppb)}]$$

\*\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{71-20} = 2.26$  ppb,  $C_{72-20} = 2.23$  ppb,  $C_{73-20} = 2.65$  ppb,  $C_{74-20} = 2.03$  ppb και  $C_{75-20} = 2.55$  ppb.

➤ MRL = 1 mg / kg = 1 ppm





Εικόνα 7. Φάσμα MRM δείγματος 1 (71-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Carbendazim.

Πίνακας 24. Αποτελέσματα Clothianidin στα δείγματα μελιού.

Clothianidin	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	-	-	-	-	-	
	Spike5ppb	10.507	45643	71.3	138935	0.3285	
	2 (72-20)	10.409	17369	88.9	1014761	0.0171	<b>0.26</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 2 σε Clothianidin πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area/Area\ IS\ (\delta\epsilon\acute{\iota}\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma) \times 5 / Area/Area\ IS\ (spk5ppb)$ .

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{72-20} = 0.12\ ppb$

### Clothianidin

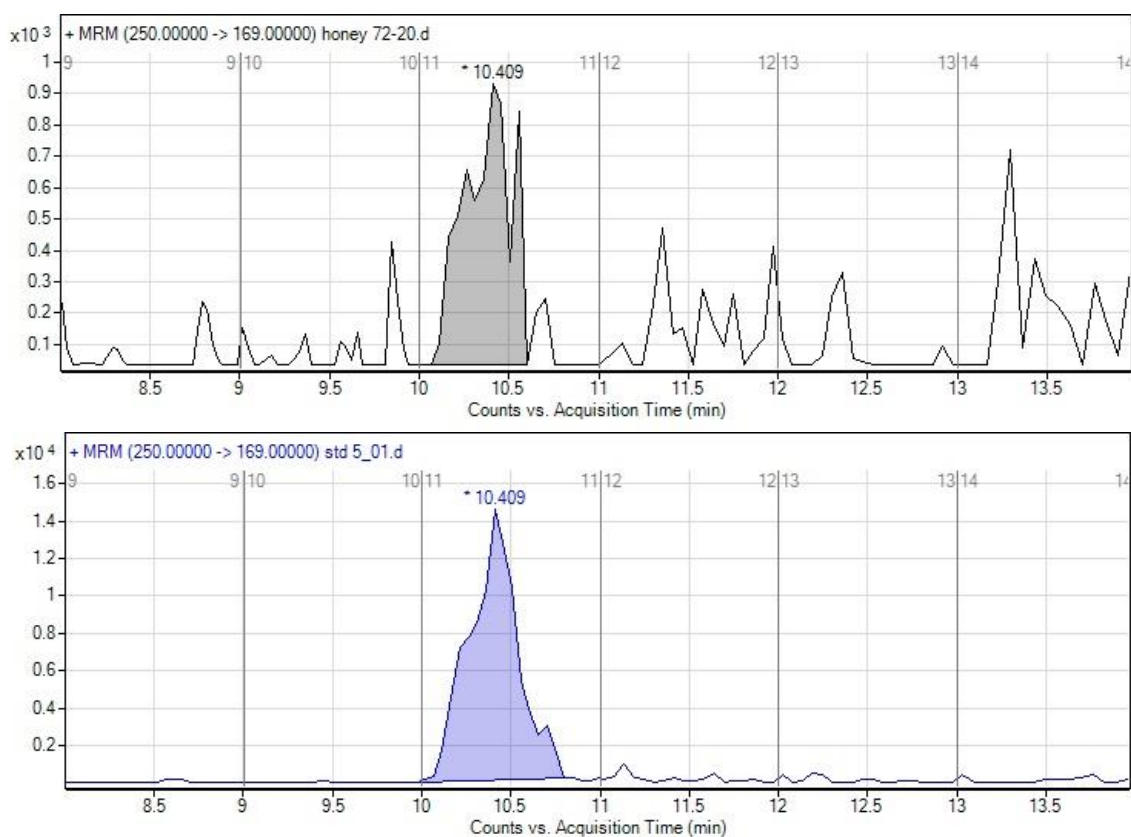
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

EXACT MASS = 249, MS [MH+] = 250

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 250 → 169 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

250 → 132 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05\ mg / kg = 0.05\ ppm$



Εικόνα 30. Φάσμα MRM δείγματος 2 (72-20) και std 5 ppb για Clothianidin.

Πίνακας 25. Αποτελέσματα Malathion στα δείγματα μελιού.

Malathion	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	22.376	483945	1.9	373005	1.2974	
	Spike5ppb	22.376	669889	2.3	159163	4.2088	
	1 (71-20)	22.215	518000	0.7	338460	1.5305	1.82
	2 (72-20)	22.376	496299	0.5	368408	1.3471	1.60

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1 και 2 σε Malathion πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area/Area IS$  (δείγματος)  $\times 5 / Area/Area IS$  (spk5ppb).

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{71-20} = 0.87$  ppb και  $C_{72-20} = 0.77$  ppb.

### Malathion

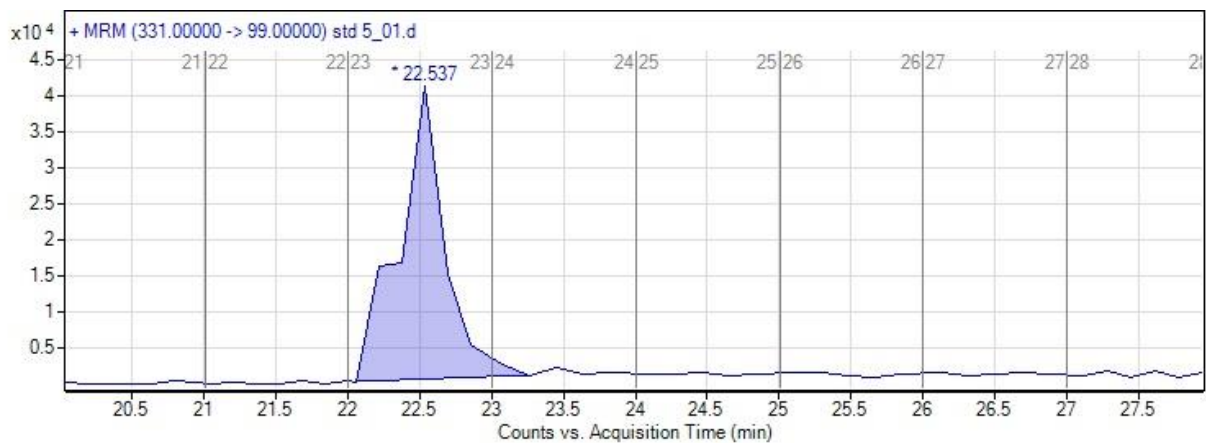
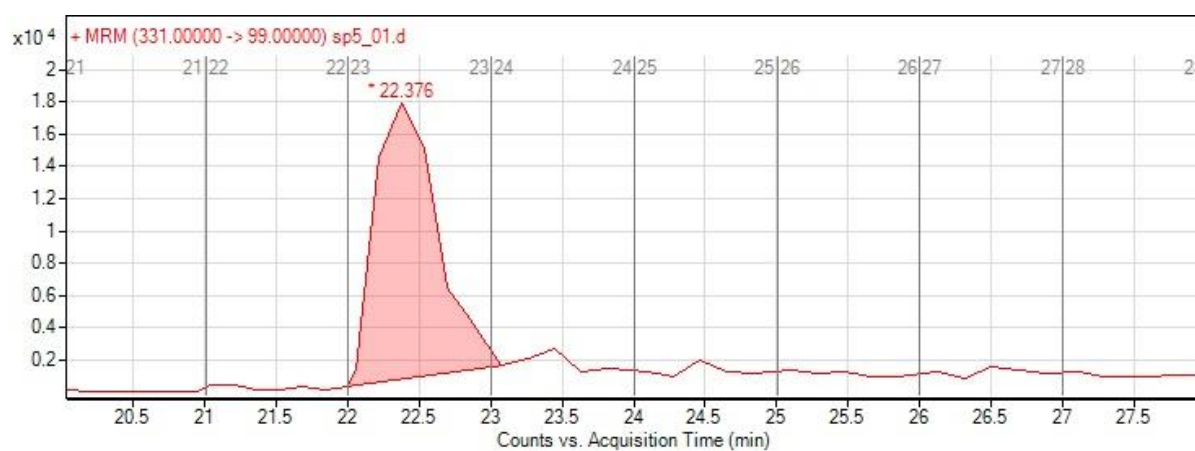
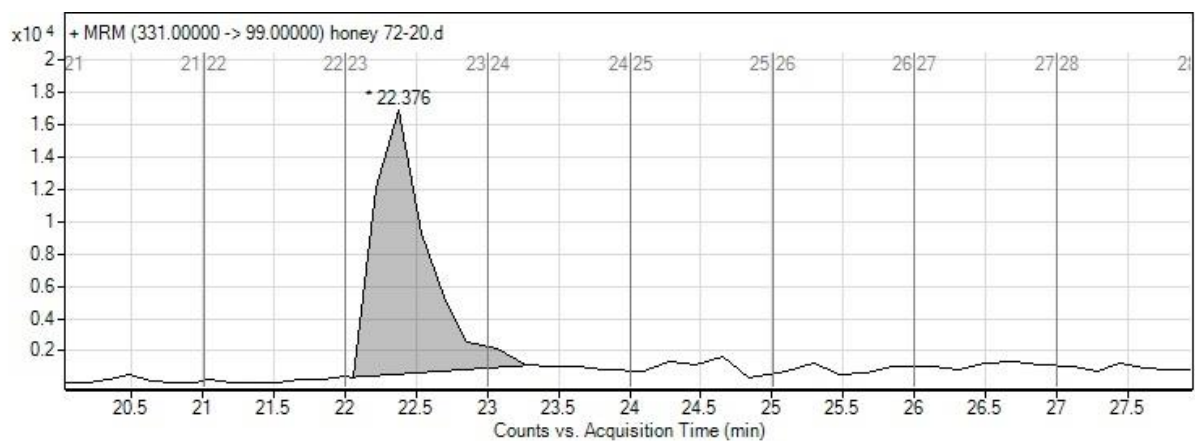
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

EXACT MASS = 330, MS [MH+] = 331

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 331 → 99 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

331 → 127 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05$  mg / kg = 0.05 ppm



**Εικόνα 31. Φάσμα MRM δείγματος 2 (72-20), *spk* 5 *ppb* και *std* 5*ppb* για Malathion.**

Πίνακας 26. Αποτελέσματα Methomyl στα δείγματα μελιού.

Methomyl	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	5.598	4262	314	443476	0.0096	
	Spike5ppb	5.432	87707	133.1	138935	0.6313	
	Spike50ppb	5.532	457569	94.4	226896	2.0166	
	1 (71-20)	5.465	15290	138.9	915576	0.0167	<b>0.13</b>
	2 (72-20)	5.565	278110	95.7	1014761	0.2741	<b>28.17</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 1 σε Methomyl πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

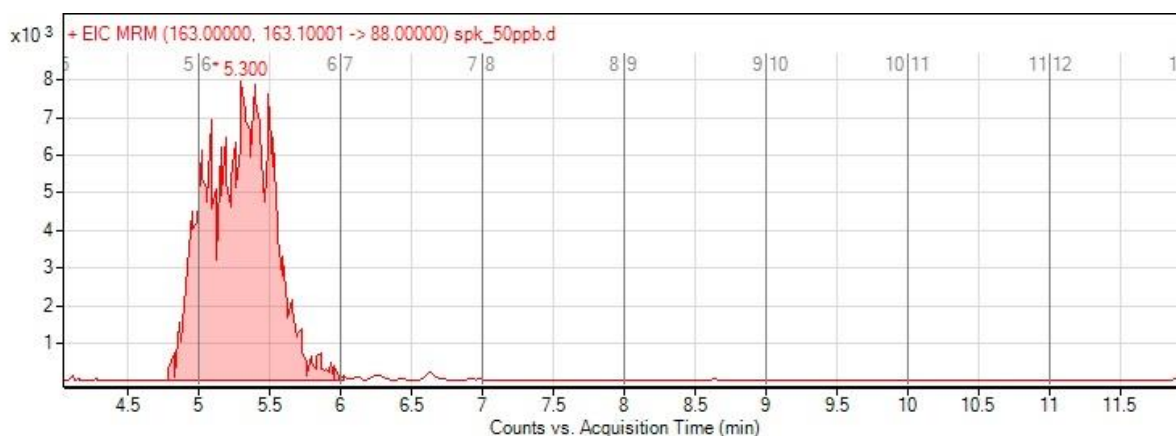
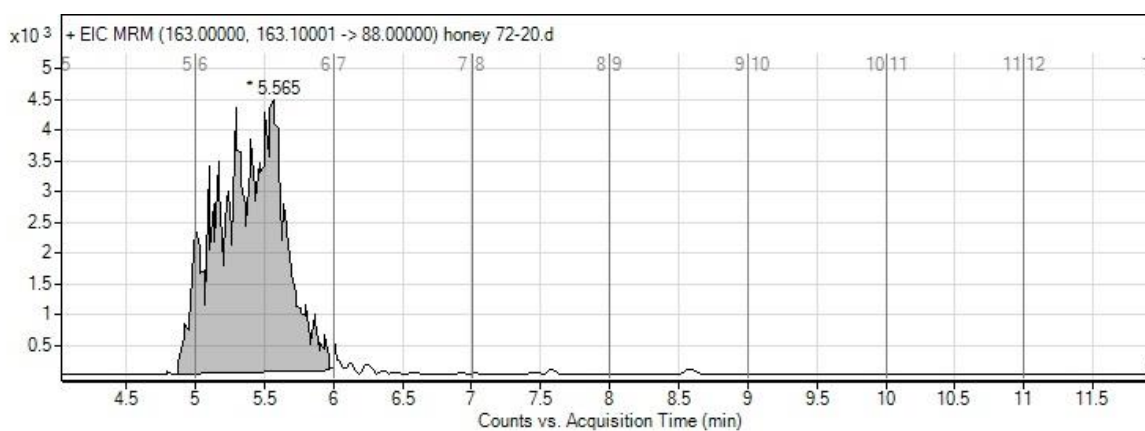
$Area/Area IS$  (δείγματος)  $\times 5 / Area/Area IS$  (spk5ppb).

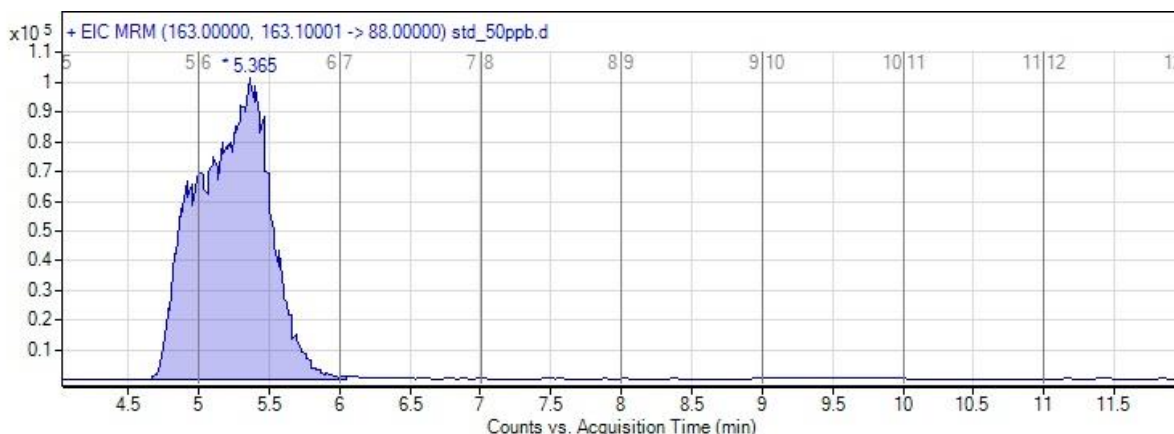
\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 2 σε Methomyl πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb και ισούται με:

$[50 \times [Area/Area IS$  (δείγματος)  $- Area/Area IS$  (spk5ppb)]  $+ 5 \times [Area/Area IS$  (spk50ppb)  $- Area/Area IS$  (δείγματος)]  $/ [Area/Area IS$  (spk50ppb)  $- Area/Area IS$  (spk5ppb)].

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{71-20} = 0.06$  ppb και  $C_{72-20} = 13.5$  ppb.

➤  $MRL = 0.01$  mg / kg = 0.01 ppm





Εικόνα 32. Φάσμα MRM δείγματος 2 (72-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Methomyl.

Πίνακας 27. Αποτελέσματα Pendimethalin στα δείγματα μελιού.

	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
<b>Pendimethalin</b>	Blank	30.406	20570	44.6	373005	0.0551	
	Spike5ppb	30.304	58617	53.3	159163	0.3683	
	Spike50ppb	30.101	264692	11	173113	1.5290	
	1 (71-20)	30.203	84183	51.4	338460	0.2487	<b>10.58</b>
	2 (72-20)	30.304	72282	21.1	368408	0.1962	<b>7.98</b>
	3 (73-20)	30.203	62516	21.7	342291	0.1826	<b>5.85</b>
	4 (74-20)	30.304	83243	47.3	317288	0.2624	<b>10.38</b>
	5 (75-20)	30.203	96896	16.1	431816	0.2244	<b>13.36</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1 έως 5 σε Pendimethalin πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb και ισούται με:

$$[50 \times [\text{Area/Area IS}_{(\text{δείγματος})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{spk5ppb})}] + 5 \times [\text{Area/Area IS}_{(\text{spk50ppb})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{δείγματος})}]] / [\text{Area/Area IS}_{(\text{spk50ppb})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{spk5ppb})}]$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{71-20} = 5.07 \text{ ppb}$ ,  $C_{72-20} = 3.82 \text{ ppb}$ ,  $C_{73-20} = 2,87 \text{ ppb}$ ,  $C_{74-20} = 5.18 \text{ ppb}$  και  $C_{75-20} = 6.51 \text{ ppb}$ .

### Pendimethalin

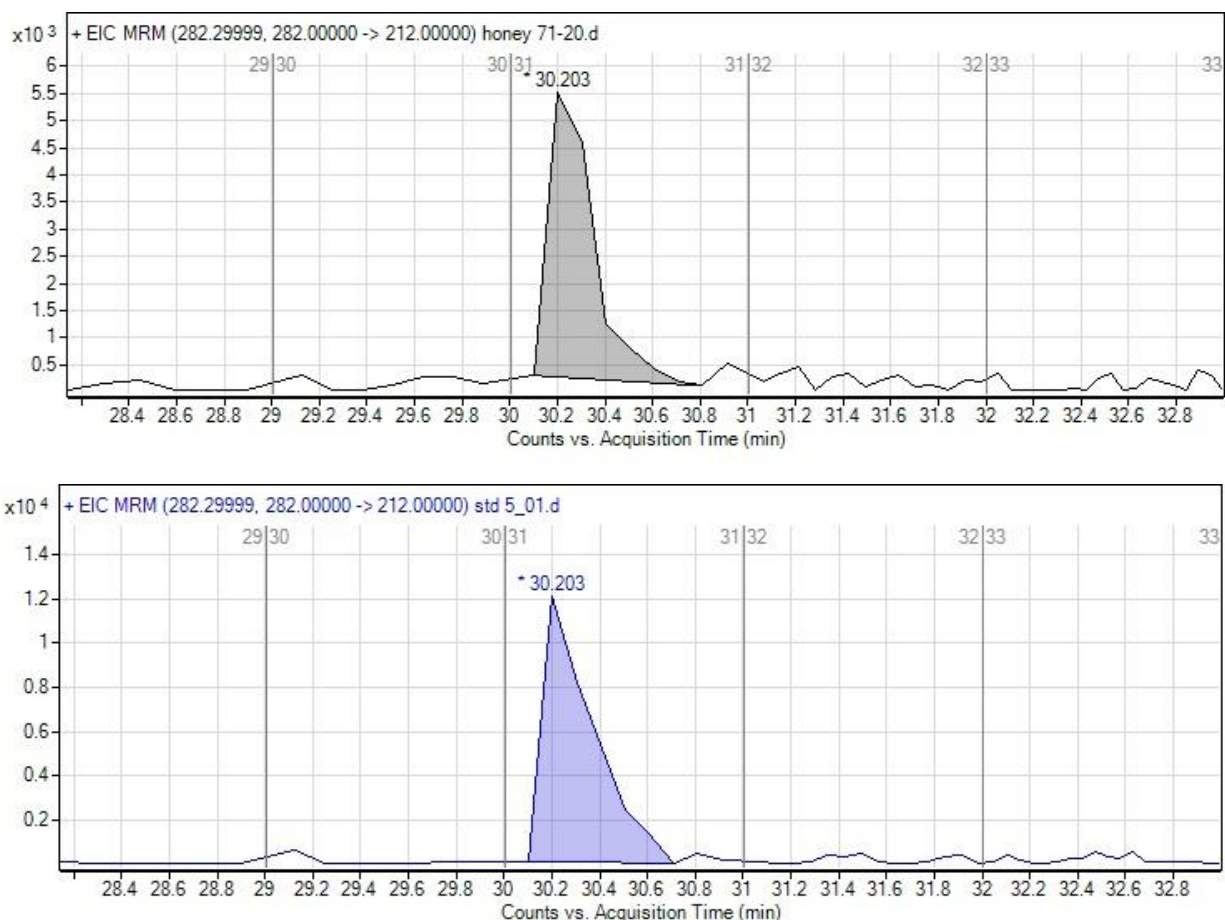
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

EXACT MASS = 281, MS [MH+] = 282

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 282 → 212 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

282 → 194 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤ MRL = 0.05 mg / kg = 0.05 ppm



Εικόνα 8. Φάσμα MRM δείγματος 1 (71-20) και std 5 ppb για Pendimethalin.

Πίνακας 28. Αποτελέσματα Tebuconazole στα δείγματα μελιού.

	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
<b>Tebuconazole</b>	Blank	25.696	9676		443476	0.0218	
	Spike5ppb	25.696	43743	31.7	138935	0.3148	
	Spike50ppb	25.509	141985	8.4	226896	0.6258	
	1 (71-20)	25.509	60585	13.7	915576	0.0662	<b>12.71</b>
	2 (72-20)	25.509	187736	5.4	1014761	0.1850	<b>70.96</b>
	3 (73-20)	25.509	21579	66.9	945743	0.0228	<b>0.36</b>
	4 (74-20)	25.696	10872	41.2	880070	0.0124	<b>0.20</b>
	5 (75-20)	25.509	50132	4.9	1063637	0.0471	<b>7.93</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 3 και 4 σε Tebuconazole πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area/Area IS$  (δείγματος)  $\times 5 / Area/Area IS$  (spk5ppb).

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1, 2 και 5 σε Tebuconazole πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike50ppb και ισούται με:

$$[50 \times [\text{Area/Area IS (δείγματος)} - \text{Area/Area IS (spk5ppb)}] + 5 \times [\text{Area/Area IS (spk50ppb)} - \text{Area/Area IS (δείγματος)}]] / [\text{Area/Area IS (spk50ppb)} - \text{Area/Area IS (spk5ppb)}]$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{71-20} = 6.09 \text{ ppb}$ ,  $C_{72-20} = 34.0 \text{ ppb}$ ,  $C_{73-20} = 0.18 \text{ ppb}$ ,  $C_{74-20} = 0.10 \text{ ppb}$  και  $C_{75-20} = 3.87 \text{ ppb}$ .

### Tebuconazole

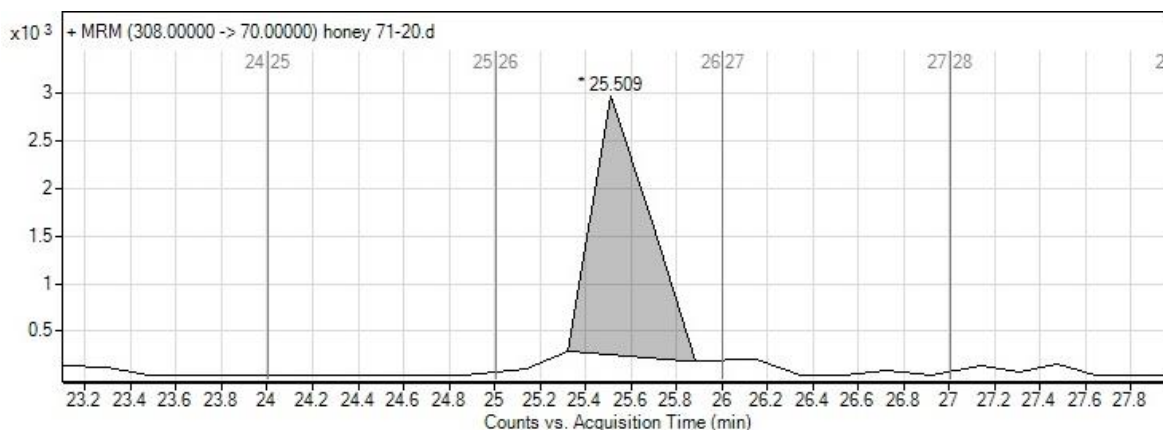
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

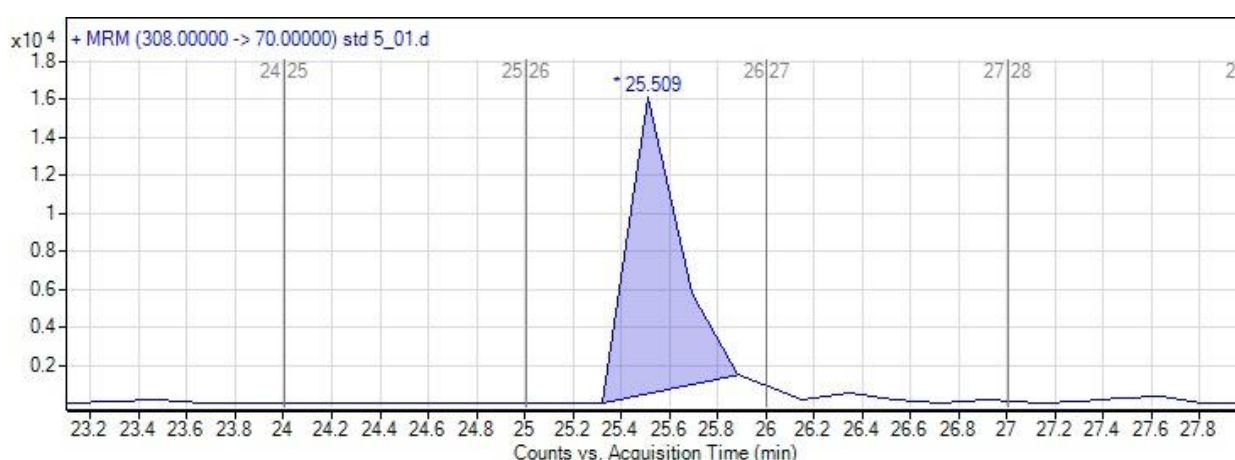
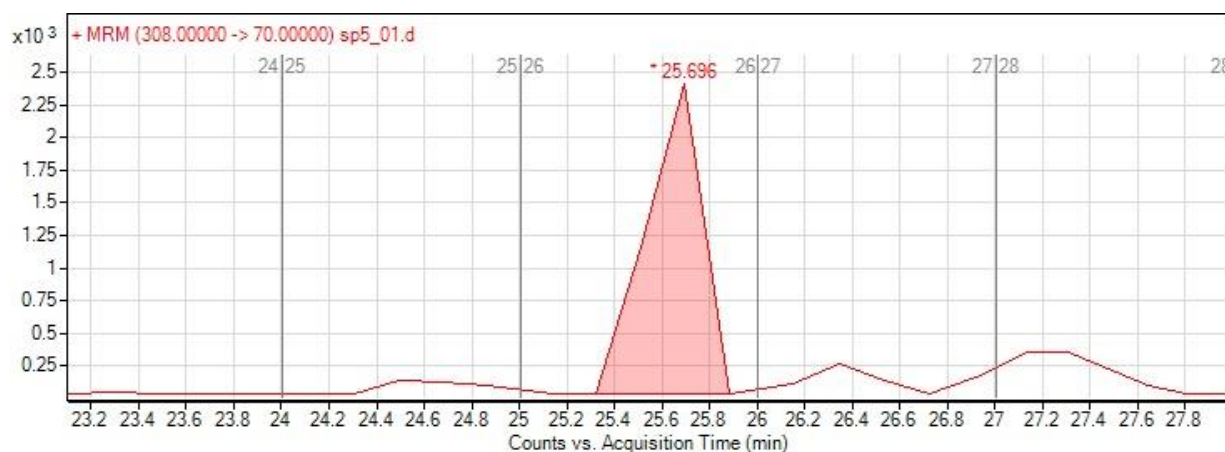
EXACT MASS = 307, MS [MH+] = 308

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 308 → 70 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

308 → 125 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05 \text{ mg / kg} = 0.05 \text{ ppm}$





Εικόνα 34. Φάσμα MRM δείγματος 1 (71-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Tebuconazole.

Πίνακας 29. Αποτελέσματα Thiocloprid στα δείγματα μελιού.

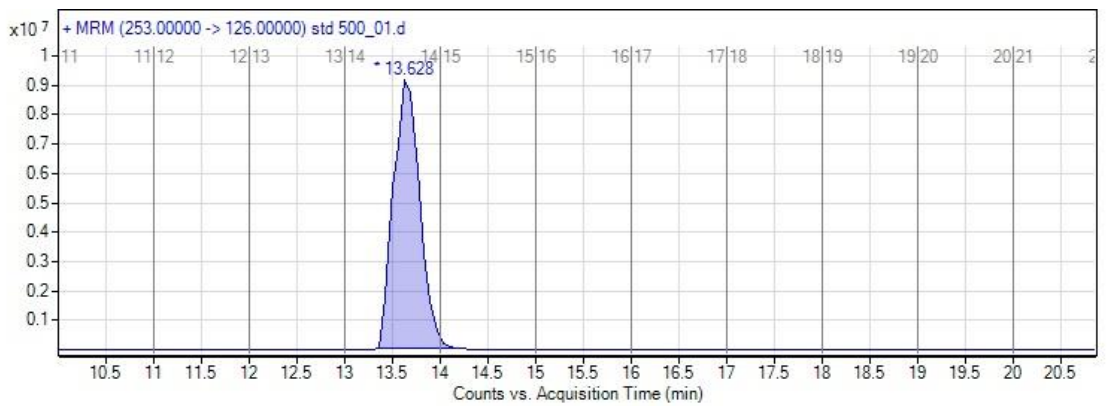
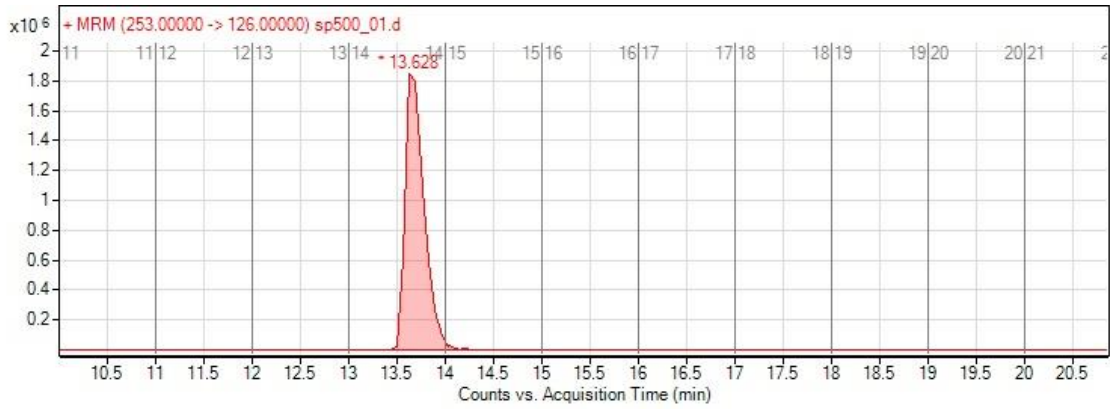
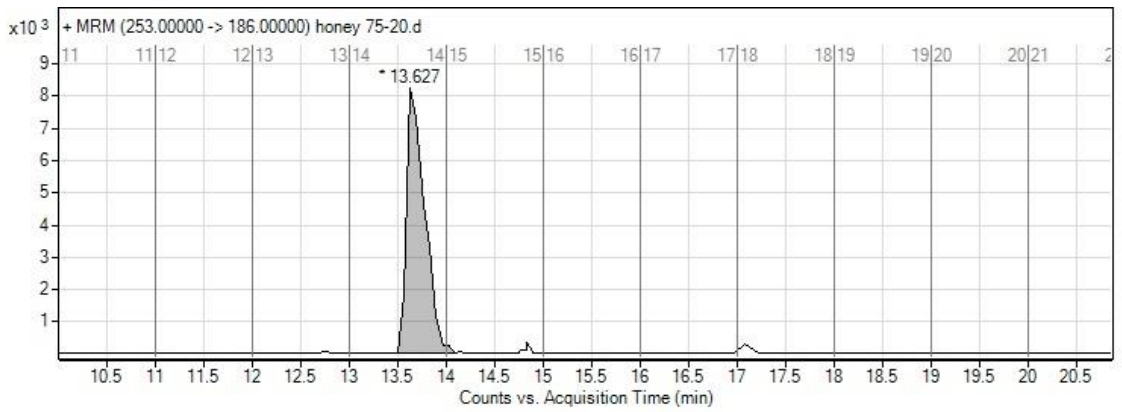
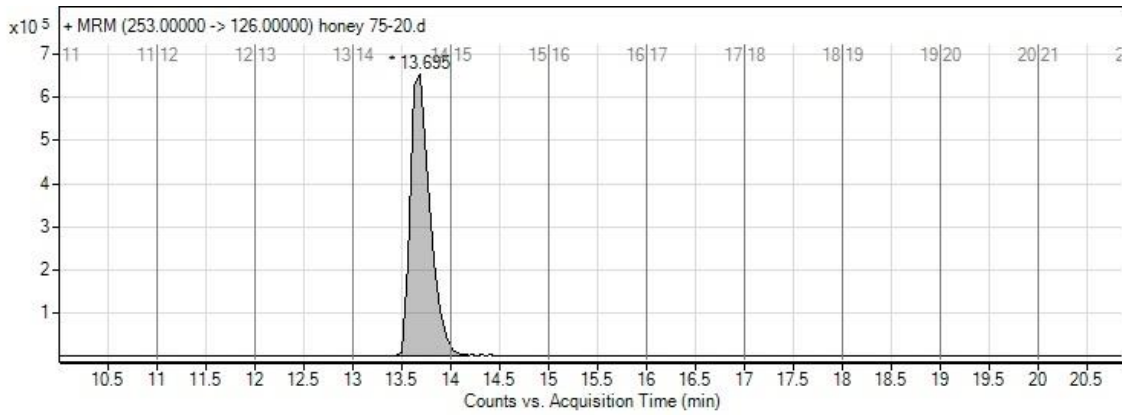
Thiocloprid	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	-	-	-	-	-	
	Spike5ppb	13.695	210946	0.5	1706577	0.1236	
	Spike500ppb	13.628	25608807	1	1240225	20.6485	
	1 (71-20)	13.695	10612525	1.2	4518216	2.3488	<b>56.88</b>
	2 (72-20)	13.695	5494943	1	4635175	1.1855	<b>28.71</b>
	4 (74-20)	13.628	483582	1.1	3991972	0.1211	<b>2.93</b>
	5 (75-20)	13.695	9163433	1.2	5337216	1.7169	<b>41.57</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1,2,4 και 5 σε Thiocloprid πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 500 ppb, όπου ισούται με:

$Area/Area IS$  (δείγματος)  $\times 500 / Area/Area IS$  (spk500ppb).

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{71-20} = 27.25$  ppb,  $C_{72-20} = 13.76$  ppb,  $C_{74-20} = 1.46$  ppb και  $C_{75-20} = 20.27$  ppb.

➤  $MRL = 0.2$  mg / kg = 0.2 ppm



**Εικόνα 9. Φάσμα MRM δείγματος 5 (75-20) 1<sup>ης</sup> και 2<sup>ης</sup> μετάπτωσης, spk 500 ppb και std 500 ppb για Thiacloprid.**

### 5.3 Δείγματα Κηρήθρας

Τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν με την προαναφέρουσα μέθοδο ήταν στο σύνολο 7 και τα γεωργικά φάρμακα τα οποία ταυτοποιήθηκαν ήταν τα εξής: *Amitraz*, *Boscalid*, *Carbendazim*, *DMF*, *Etofenprox*, *Malathion*, *Propiconazole*, *Thiabendazole*, *Thiacloprid* και *Tricyclazole*. Στον πίνακα 30 παρουσιάζονται εκτενέστερα τα εύρηματα για τα συγκεκριμένα δείγματα.

Πίνακας 30. Ευρήματα γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα κηρήθρας 1-7.

<i>N<sup>ο</sup></i> <i>Δείγματος</i>	<i>Amitraz</i>	<i>Boscalid</i>	<i>Carbendazim</i>	<i>DMF</i>
1 (54-20)	•			•
2 (55-20)	•		•	•
3 (56-20)		•		•
4 (57-20)				
5 (58-20)				
6 (59-20)	•			•
7 (60-20)	•			•
<i>N<sup>ο</sup></i> <i>Δείγματος</i>	<i>Etofenprox</i>	<i>Malathion</i>	<i>Propiconazole</i>	<i>Thiabendazole</i>
1 (54-20)	•	•	•	•
2 (55-20)	•	•		•
3 (56-20)				
4 (57-20)	•	•		
5 (58-20)	•	•		
6 (59-20)	•	•		
7 (60-20)	•	•		
<i>N<sup>ο</sup></i> <i>Δείγματος</i>	<i>Thiacloprid</i>	<i>Tricyclazole</i>		
1 (54-20)	•			
2 (55-20)	•	•		
3 (56-20)				
4 (57-20)	•			
5 (58-20)	•			
6 (59-20)	•			
7 (60-20)	•			

Πίνακας 31. Αποτελέσματα Amitraz στα δείγματα κηρήθρας.

Amitraz	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	33.596	503924	-	-	-	
	Spike5ppb	33.601	302701	-	397032	0.7624	
	1 (54-20)	33.622	73535	-	175197	0.4197	1.21
	2 (55-20)	33.603	254997	-	125757	2.0277	4.21
	6 (59-20)	33.612	109570	-	159910	0.6852	1.81
	7 (60-20)	33.595	108216	-	189018	0.5725	1.79

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1,2,6 και 7 σε Amitraz πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area/Area\ IS\ (\delta\acute{\epsilon}\gamma\mu\alpha\tau\omicron\varsigma) \times 5 / Area/Area\ IS\ (spk5ppb)$ .

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{54-20} = 0.59\ ppb$ ,  $C_{55-20} = 2.07\ ppb$ ,  $C_{59-20} = 0.90\ ppb$  και  $C_{60-20} = 0.89\ ppb$ .

### Amitraz

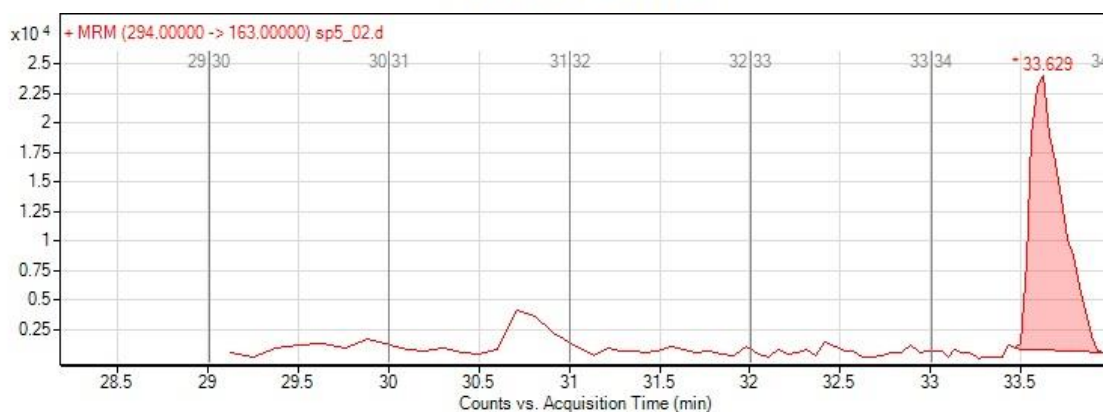
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

EXACT MASS = 293 , MS [MH+] = 294

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 294 → 163 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

294 → 122 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.2\ mg / kg = 0.2\ ppm$



Εικόνα 36. Φάσμα MRL δείγματος 2 (55-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Amitraz.

Πίνακας 32. Αποτελέσματα *Boscalid* στα δείγματα κηρήθρας.

Boscalid	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	22.041	1480	-	-	-	
	Spike5ppb	21.986	15309	-	1373729	0.0111	
	Spike50ppb	21.986	101310	-	1413287	0.0717	
	3 (56-20)	22.041	56933	-	140770	0.4044	<b>26.78</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 3 σε *Boscalid* πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου *bracketing* μεταξύ των *spike 5 ppb* και *spike 50 ppb* και ισούται με:

$$[50 \times [Area/Area IS_{(δείγματος)} - Area/Area IS_{(spk5ppb)}] + 5 \times [Area/Area IS_{(spk50ppb)} - Area/Area IS_{(δείγματος)}]] / [Area/Area IS_{(spk50ppb)} - Area/Area IS_{(spk5ppb)}]$$

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{56-20} = 13.26$  ppb.

### Boscalid

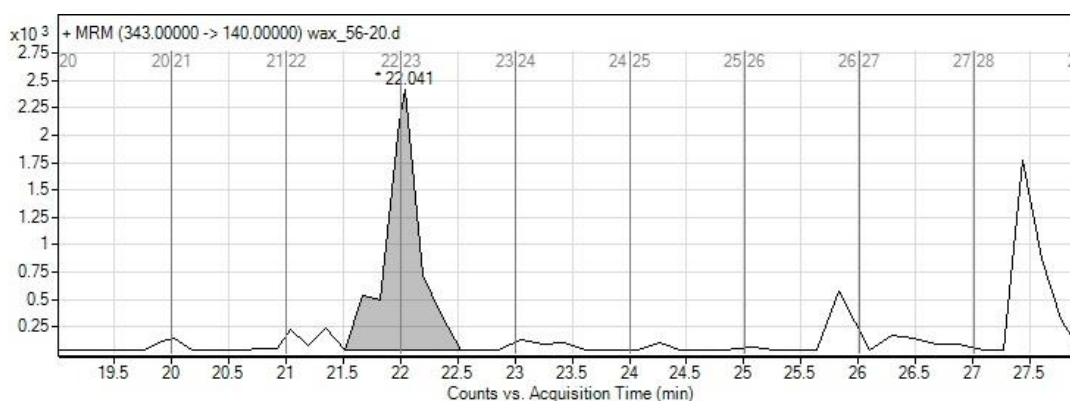
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

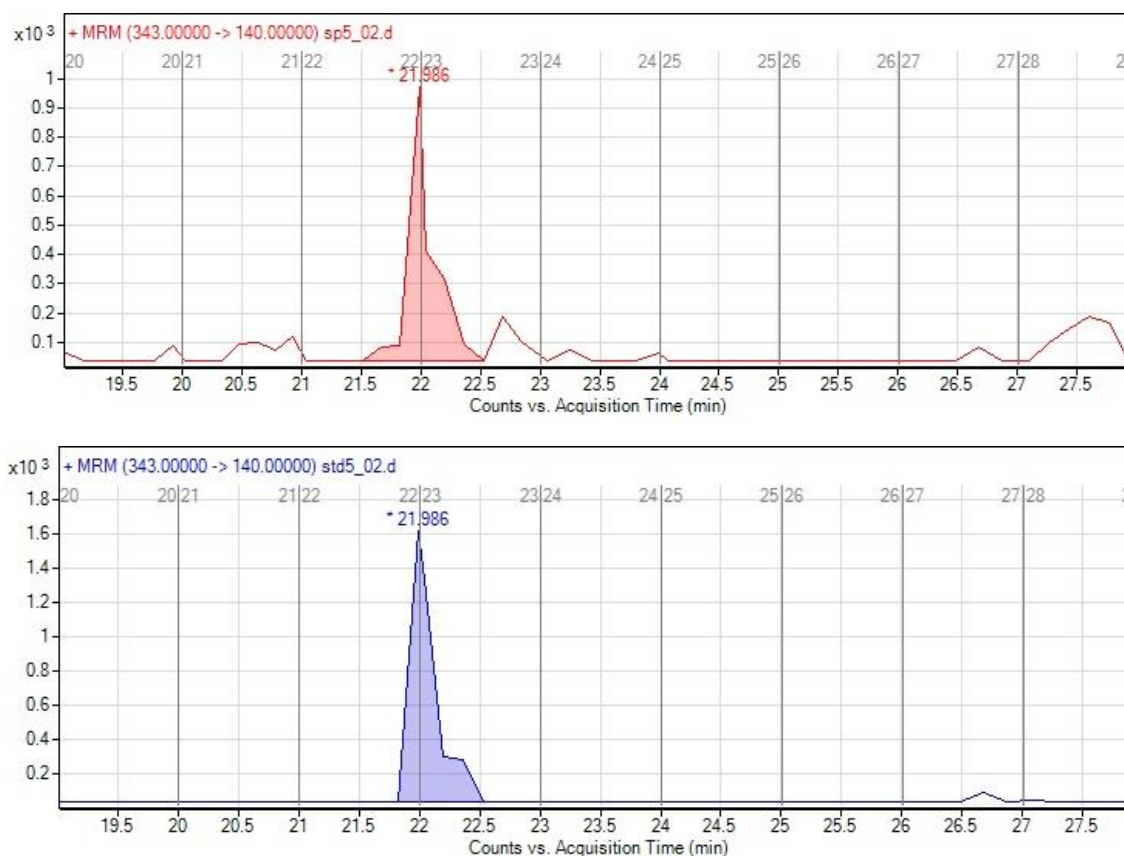
EXACT MASS = 342 , MS [MH+] = 343

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 343 → 140 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

343 → 307 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.15$  mg / kg = 0.15 ppm





Εικόνα 37. Φάσμα MRM δειγματος 3 (56-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Boscalid.

Πίνακας 33. Αποτελέσματα Carbendazim στα δείγματα κηρήθρας.

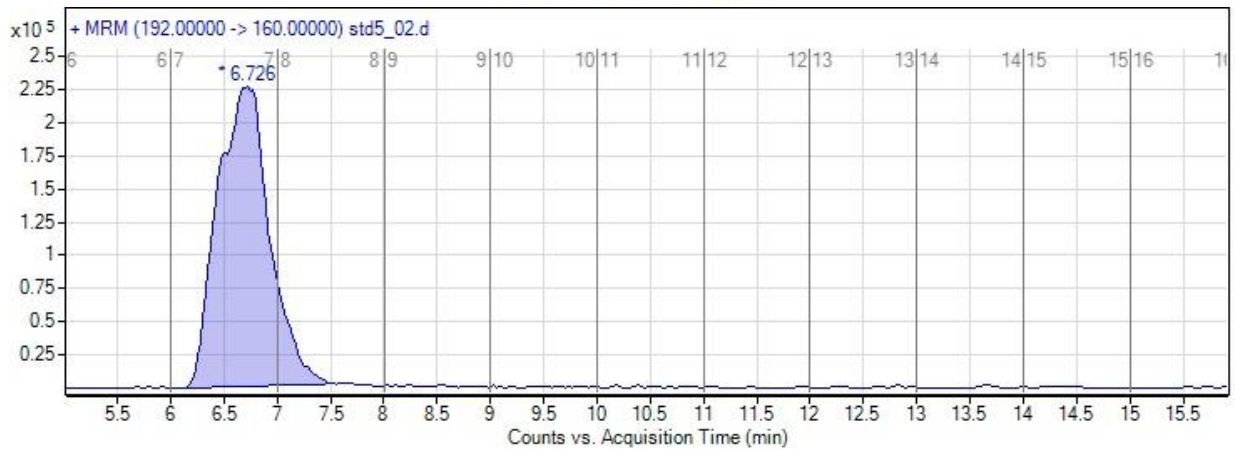
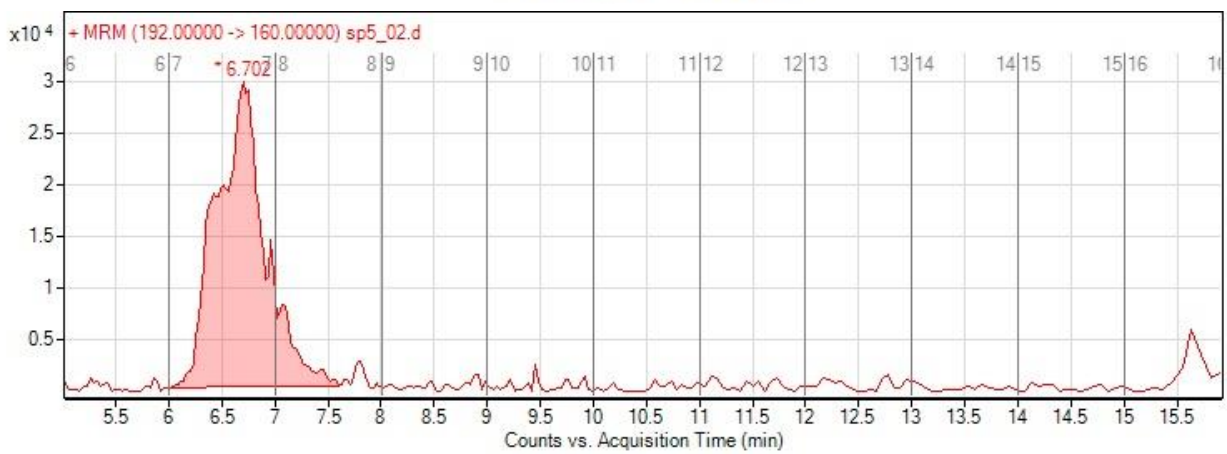
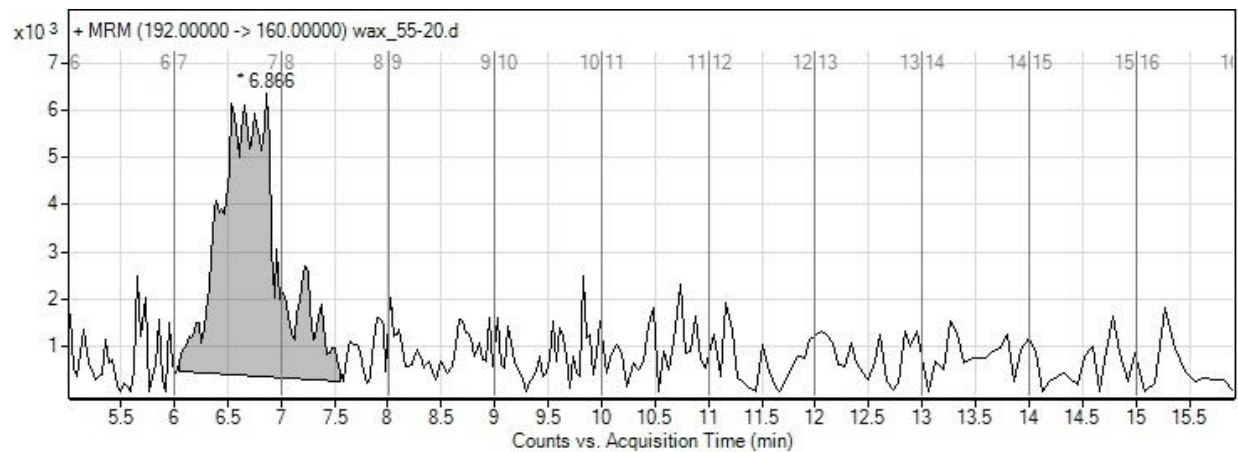
Carbendazim	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	6.702	195772	4.2	551561	0.3549	
	Spike5ppb	6.702	958968	-	1373729	0.6981	
	2 (55-20)	6.866	267774	13.7	21451	12.4831	<b>89.41</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 2 σε Carbendazim πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area/Area IS$  (δείγματος)  $\times 5 / Area/Area IS$  (spk5ppb).

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{55-20} = 43.94$  ppb.

➤  $MRL = 1 \text{ mg} / \text{kg} = 1 \text{ ppm}$



**Εικόνα 38. Φάσμα MRM του δείγματος 2 (55-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Carbendazim.**

Πίνακας 34. Αποτελέσματα DMF στα δείγματα κηρήθρας.

DMF	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	15.369	915975	-	-	-	
	Spike5ppb	15.369	504954	-	-	-	
	1 (54-20)	15.46	443413	25.7	-	-	4.39
	2 (55-20)	15.369	4606436	28.2	-	-	79.83
	4 (57-20)	15.277	384387	26.4	-	-	3.81
	6 (59-20)	15.369	205342	48.8	-	-	2.03

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1, 2, 4 και 6 σε DMF πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$$Area_{(δείγματος)} \times 5 / Area_{(spk5ppb)}$$

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{54-20} = 2.16 \text{ ppb}$ ,  $C_{55-20} = 39.23 \text{ ppb}$ ,  $C_{57-20} = 1.87 \text{ ppb}$  και  $C_{59-20} = 1.01 \text{ ppb}$ .

## DMF

### ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΗΣ AMITRAZ

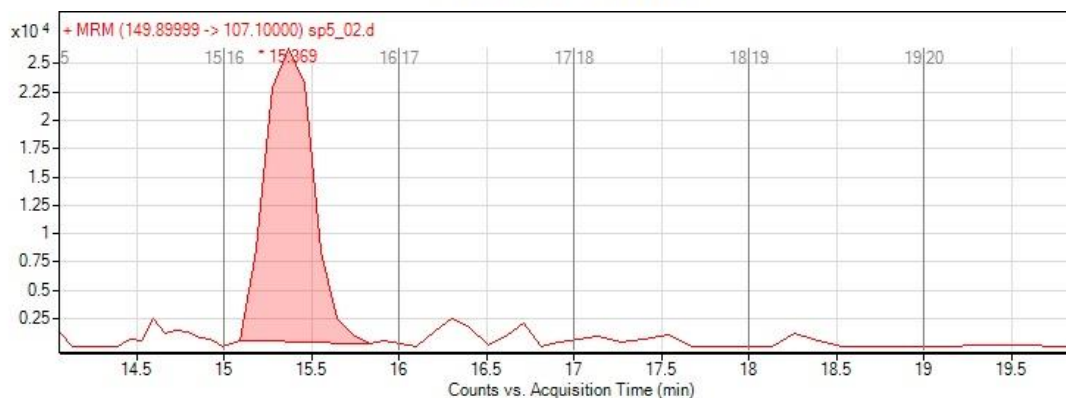
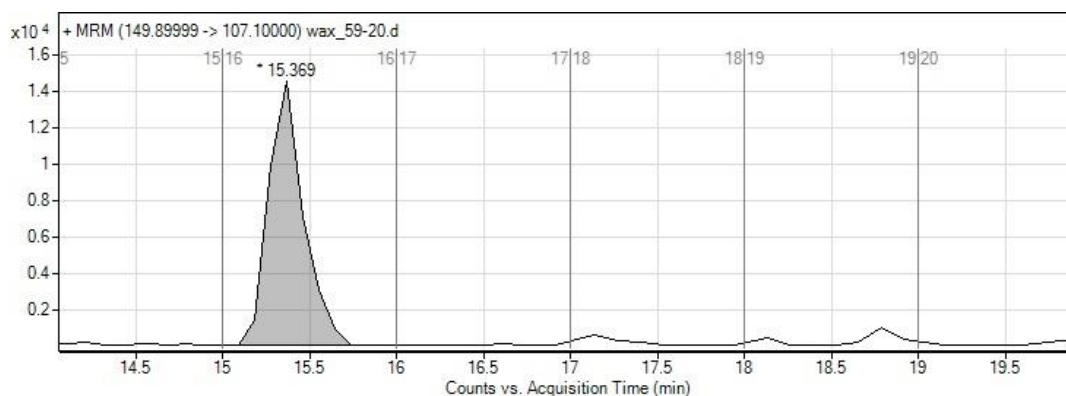
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

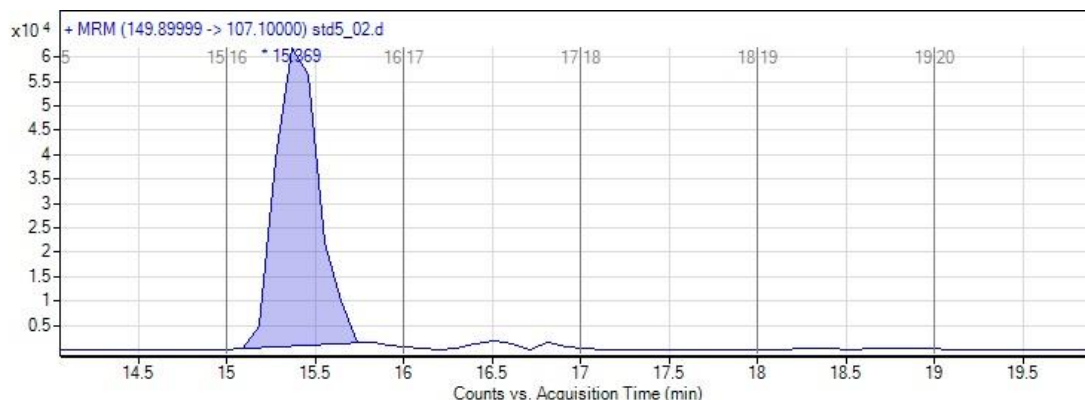
EXACT MASS = 148, MS [MH+] = 149

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 149 → 107 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

149 → 132 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.2 \text{ mg / kg} = 0.2 \text{ ppm}$





Εικόνα 39. Φάσμα MRM δείγματος 6 (59-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για DMF.

Πίνακας 35. Αποτελέσματα Etofenprox στα δείγματα κηρήθρας.

	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
<b>Etofenprox</b>	Blank	-	-	-	-	-	
	Spike5ppb	33.846	61760	131.6	-	-	
	Spike50ppb	33.846	665515	90.2	-	-	
	1 (54-20)	33.846	105381	98.8	-	-	<b>8.25</b>
	2 (55-20)	33.846	74953	110.2	-	-	<b>5.98</b>
	4 (57-20)	33.846	58027	95	-	-	<b>4.72</b>
	5 (58-20)	33.846	92042	114.7	-	-	<b>7.26</b>
	6 (59-20)	33.846	88251	86.6	-	-	<b>6.97</b>
7 (60-20)	33.846	104872	96.8	-	-	<b>8.21</b>	

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1, 2, 4, 5, 6 και 7 σε Etofenprox πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb και ισούται με:

$$[50 \times [Area_{(δείγματος)} - Area_{(spk5ppb)}] + 5 \times [Area_{(spk50ppb)} - Area_{(δείγματος)}]] / [Area_{(spk50ppb)} - Area_{(spk5ppb)}].$$

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{54-20} = 4.05$  ppb,  $C_{55-20} = 2.94$  ppb,  $C_{57-20} = 2.32$  ppb,  $C_{58-20} = 3.62$  ppb,  $C_{59-20} = 3.47$  ppb και  $C_{60-20} = 4.09$  ppb.

### Etofenprox

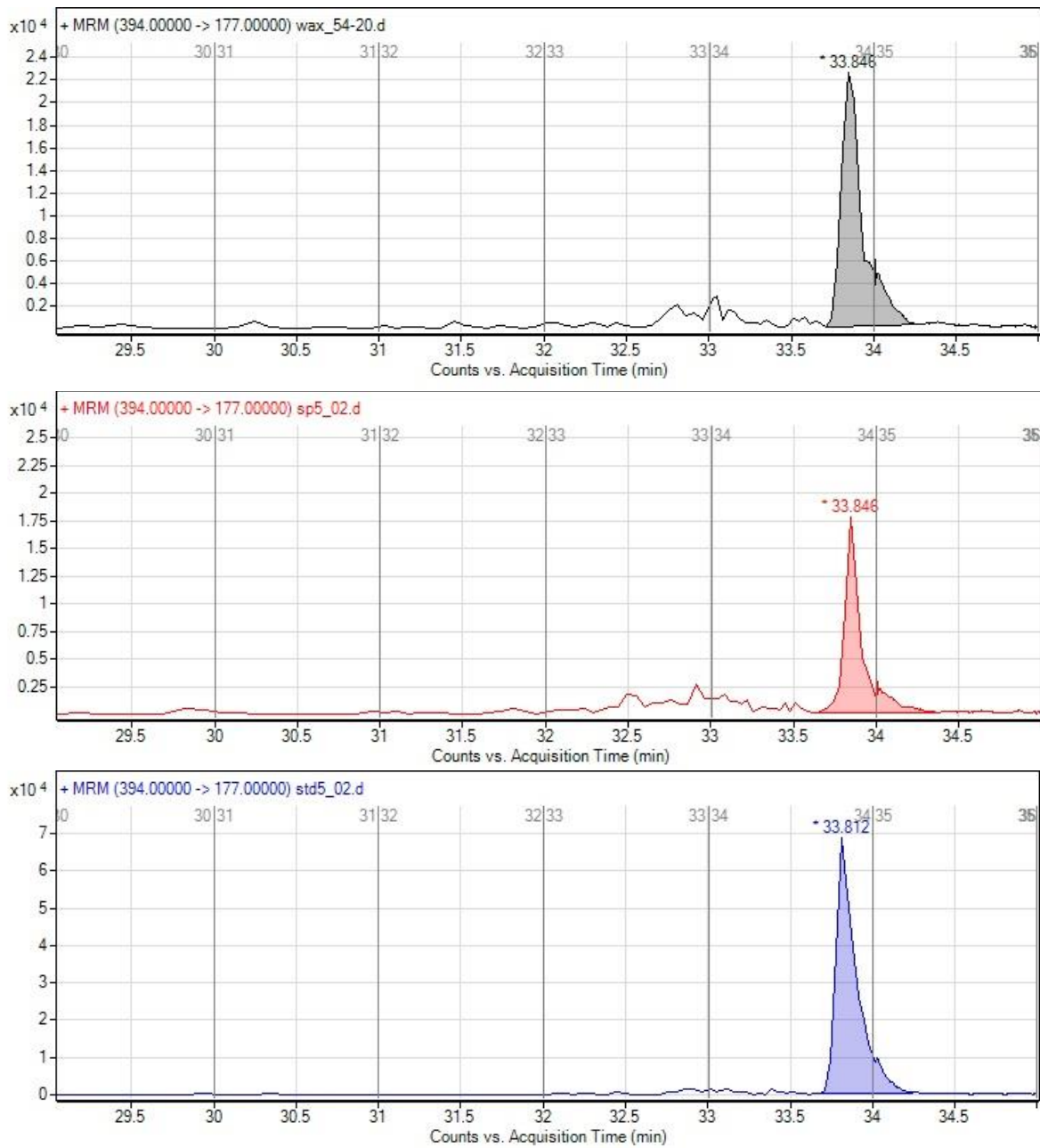
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

EXACT MASS = 393 , MS [MH+] = 394

ΜΕΤΑΠΤΩΞΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 394 → 177 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

394 → 107 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05$  mg / kg = 0.05 ppb



**Εικόνα 40. Φάσμα MRM του δείγματος 1 (54-20), spk 5 ppb και std 5 ppb σε Etofenprox.**

Πίνακας 36. Αποτελέσματα Malathion στα δείγματα κηρήθρας.

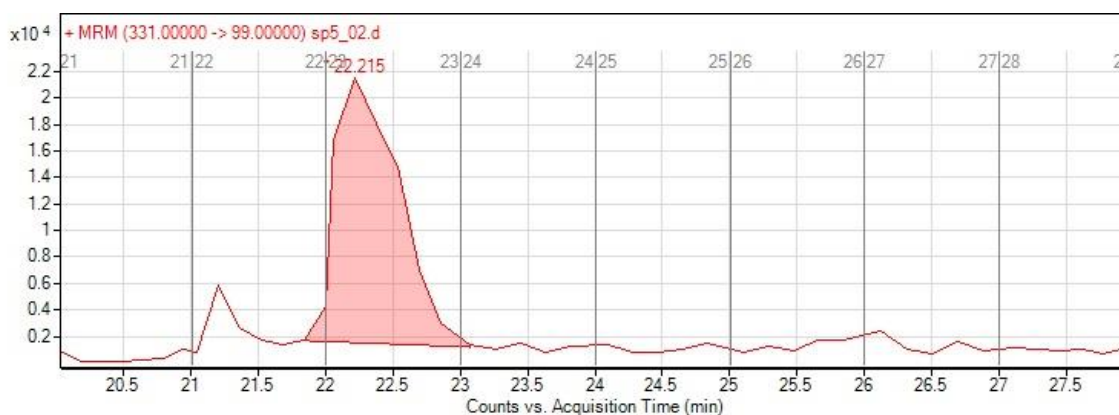
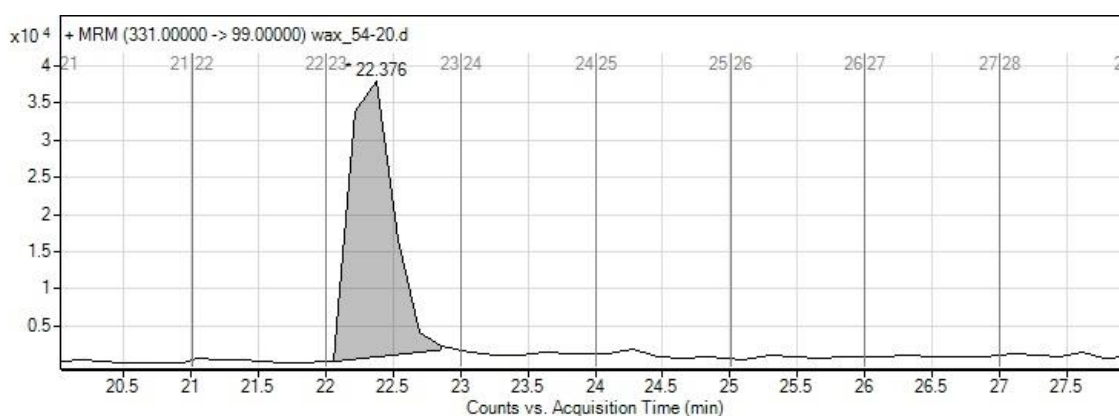
Malathion	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	22.376	656758	44.4	41211	15.9365	
	Spike5ppb	22.215	752078	43.9	397032	1.8943	
	Spike50ppb	22.697	1136724	56.3	528841	2.1495	
	1 (54-20)	22.376	967180		175197	5.5205	<b>30.16</b>

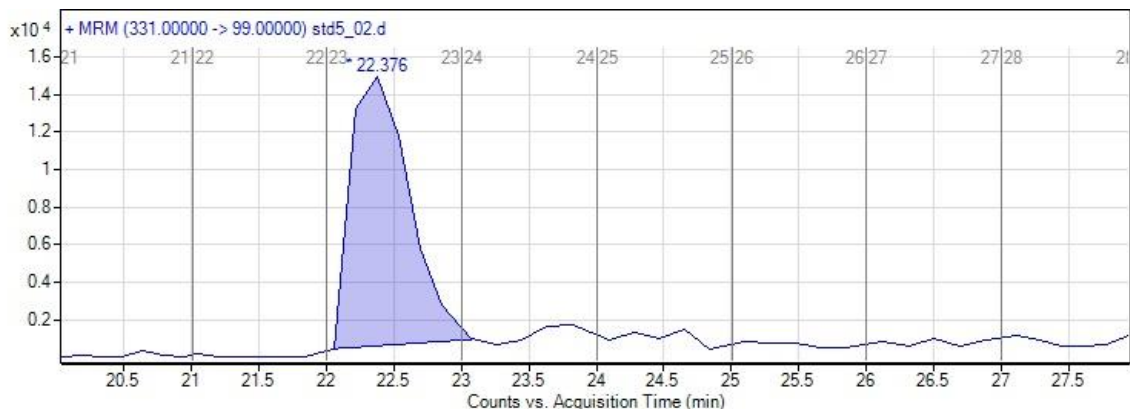
\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 1 σε Malathion πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb, όπου ισούται με:

$$[50 \times [\text{Area/Area IS}_{(\text{δείγματος})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{spk5ppb})}] + 5 \times [\text{Area/Area IS}_{(\text{spk50ppb})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{δείγματος})}]] / [\text{Area/Area IS}_{(\text{spk50ppb})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{spk5ppb})}]$$

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{54-20} = 14.81 \text{ ppb}$ .

➤  $MRL = 0.05 \text{ mg/kg} = 0.05 \text{ ppm}$





Εικόνα 41. Φάσμα MRM του δείγματος 1 (54-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Malathion.

Πίνακας 37. Αποτελέσματα Propiconazole στα δείγματα κηρήθρας.

Propiconazole	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	-	-	-	-	-	
	Spike5ppb	25.831	64726	43.1	397032	0.1630	
	Spike50ppb	25.831	614036	77.4	528841	1.1611	
	1 (54-20)	25.831	66093	50.4	175197	0.3772	<b>5.11</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 1 σε Propiconazole πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb, όπου ισούται με:

$$[50 \times [Area/Area IS_{(δείγματος)} - Area/Area IS_{(spk5ppb)}] + 5 \times [Area/Area IS_{(spk50ppb)} - Area/Area IS_{(δείγματος)}]] / [Area/Area IS_{(spk50ppb)} - Area/Area IS_{(spk5ppb)}]$$

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{54-20} = 2.51 \text{ ppb}$ .

### Propiconazole

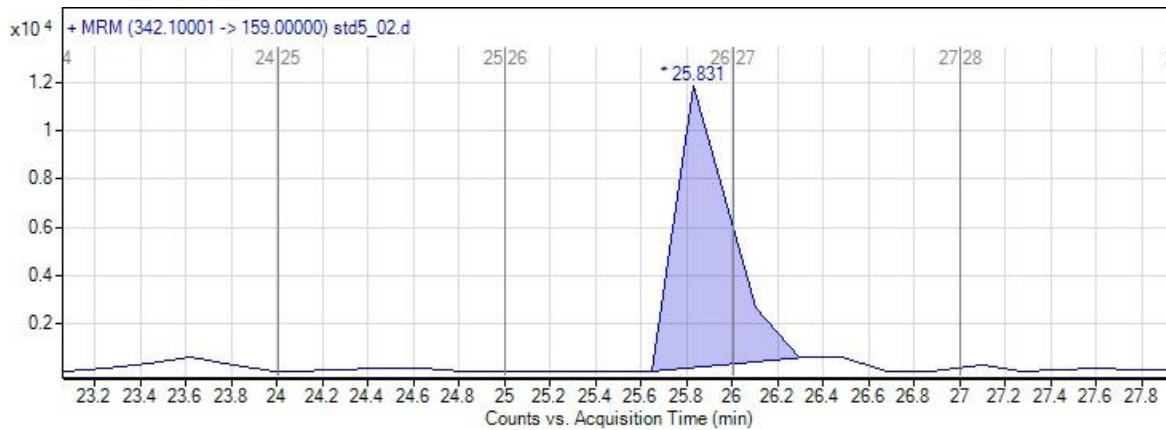
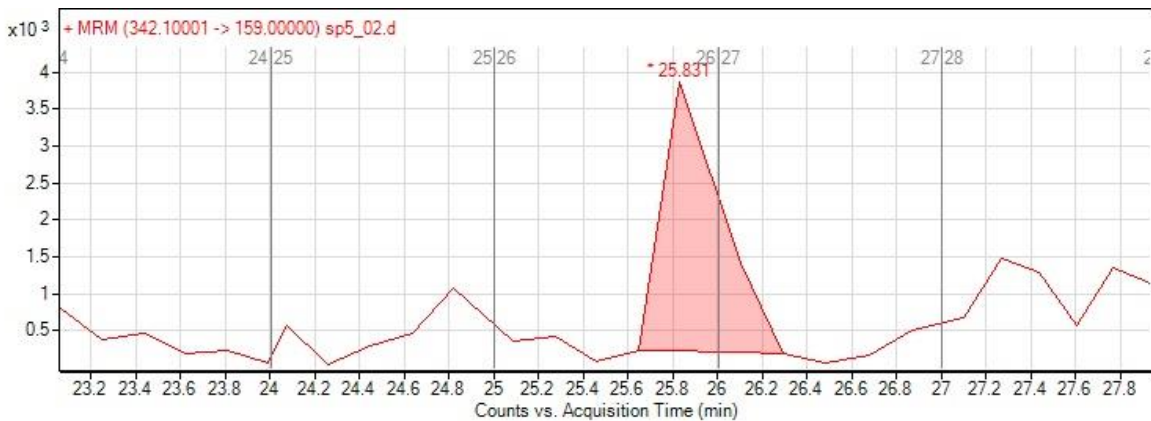
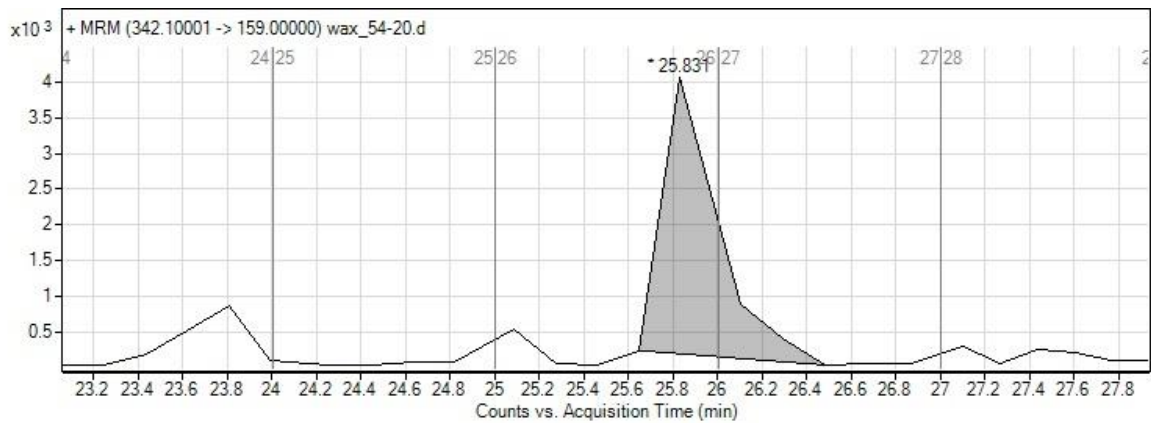
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

EXACT MASS = 341 , MS [H+] = 342

MASS FRAGMENTATION : 342 → 159 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

342 → 69 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05 \text{ mg/kg} = 0.05 \text{ ppm}$



**Εικόνα 42. Φάσμα MRM του δείγματος 1 (54-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Propiconazole.**

Πίνακας 38. Αποτελέσματα Thiabendazole στα δείγματα κηρήθρας.

Thiabendazole	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	9.669	26270	90.9	18323	1.4337	
	Spike5ppb	9.637	80645	86.1	63857	1.2629	
	Spike50ppb	9.573	1133592	69.1	216160	5.2442	
	1 (54-20)	9.509	61861	48.6	115036	0.5378	<b>2.13</b>
	2 (55-20)	9.541	301026	64.3	72381	4.1589	<b>4.20</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 1 σε Thiabendazole πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area/AreaIS$  (δείγματος)  $\times 5 / Area/AreaIS$  (spk5ppb).

\* Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 2 σε Thiabendazole πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb, όπου ισούται με:

$[50 \times [Area/Area IS$  (δείγματος)  $- Area/Area IS$  (spk5ppb)]  $+ 5 \times [Area/Area IS$  (spk50ppb)  $- Area/Area IS$  (δείγματος)]  $/ [Area/Area IS$  (spk50ppb)  $- Area/Area IS$  (spk5ppb)].

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{54-20} = 1.05$  ppb και  $C_{55-20} = 2.06$  ppb.

### Thiabendazole

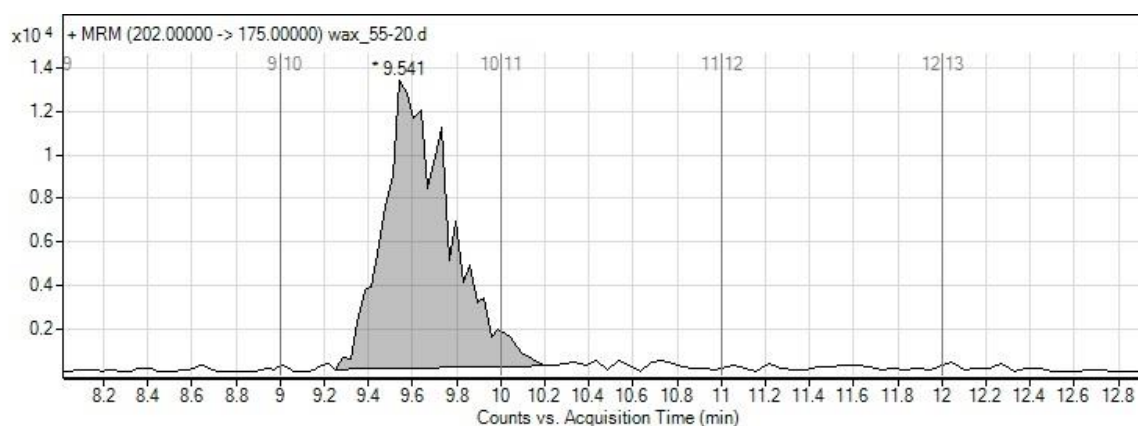
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

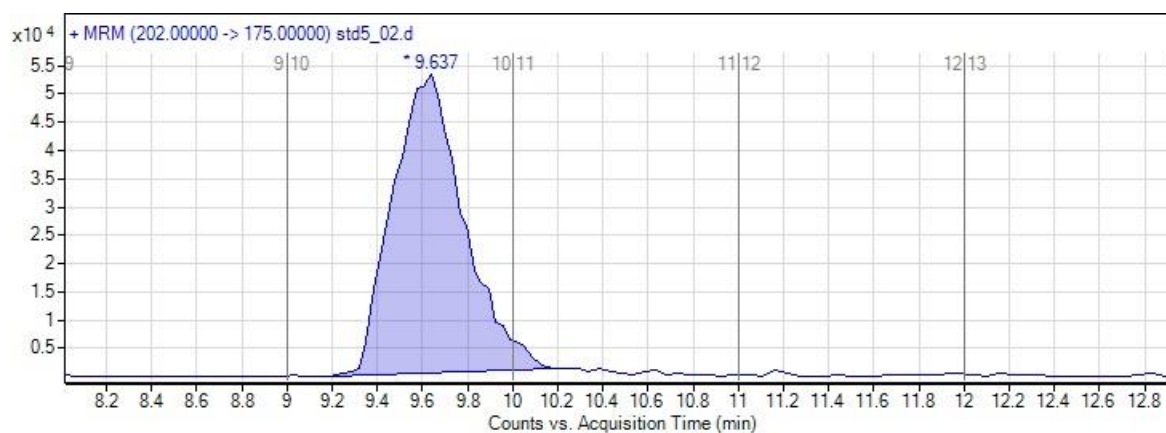
EXACT MASS = 201, MS [MH+] = 202

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 202 → 175 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

202 → 131 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05$  mg/kg = 0.05 ppm





Εικόνα 43. Φάσμα MRM του δείγματος 2 (55-20), *spk 5 ppb* και *std 5 ppb* για Thiabendazole.

Πίνακας 39. Αποτελέσματα Thiachlorprid στα δείγματα κηρήθρας.

	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
<b>Thiachlorprid</b>	Blank	-	-	-	-	-	
	Spike5ppb	13.628	374552	0.3	3839620	0.0975	
	Spike50ppb	13.628	7667382	1.3	5051568	1.5178	
	1 (54-20)	13.762	41505	2.6	2558685	0.0162	<b>0.83</b>
	2 (55-20)	13.695	1388432	1.9	2119652	0.6550	<b>11.26</b>
	4 (57-20)	13.695	30100	0.5	2937949	0.0102	<b>0.53</b>
	5 (58-20)	13.695	12197	-	2833115	0.0043	<b>0.22</b>
	6 (59-20)	13.628	68124	0.5	2887849	0.0236	<b>1.21</b>
7 (60-20)	13.695	5513	-	3155411	0.0017	<b>0.09</b>	

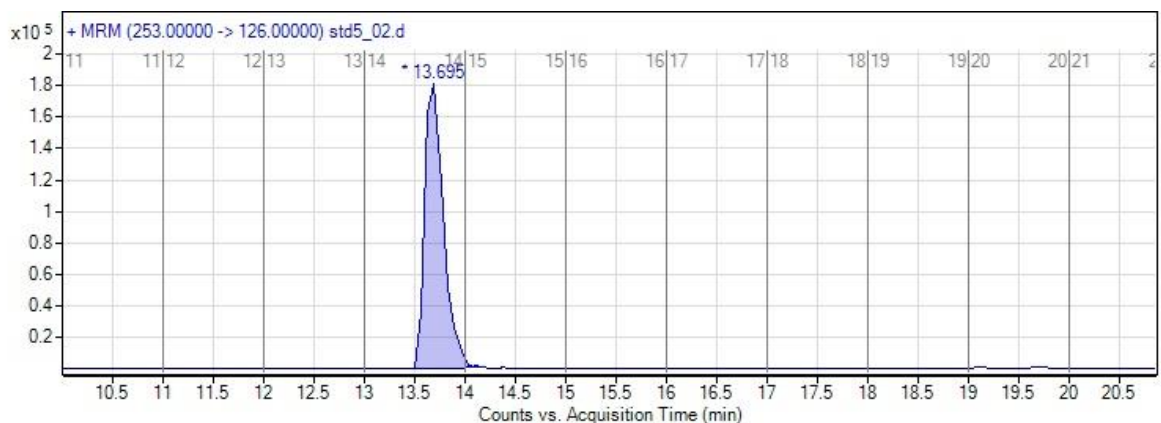
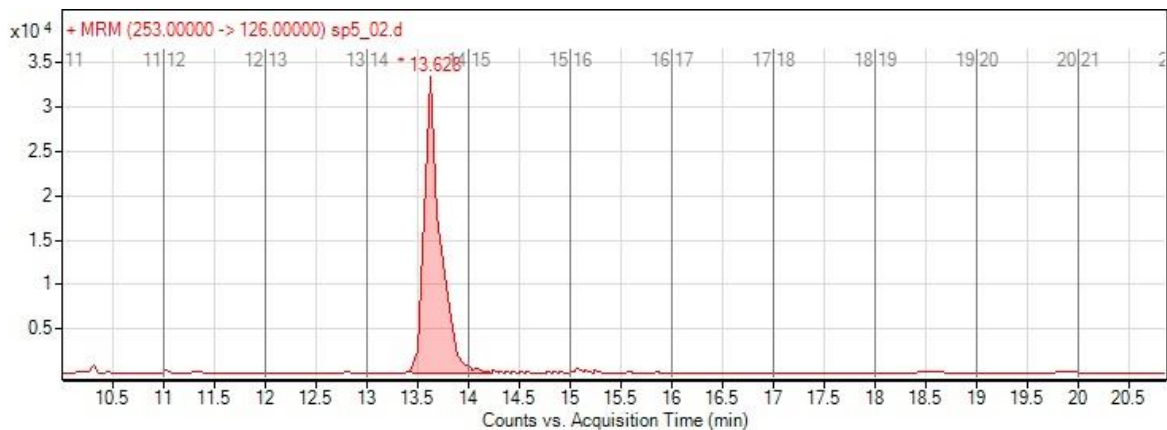
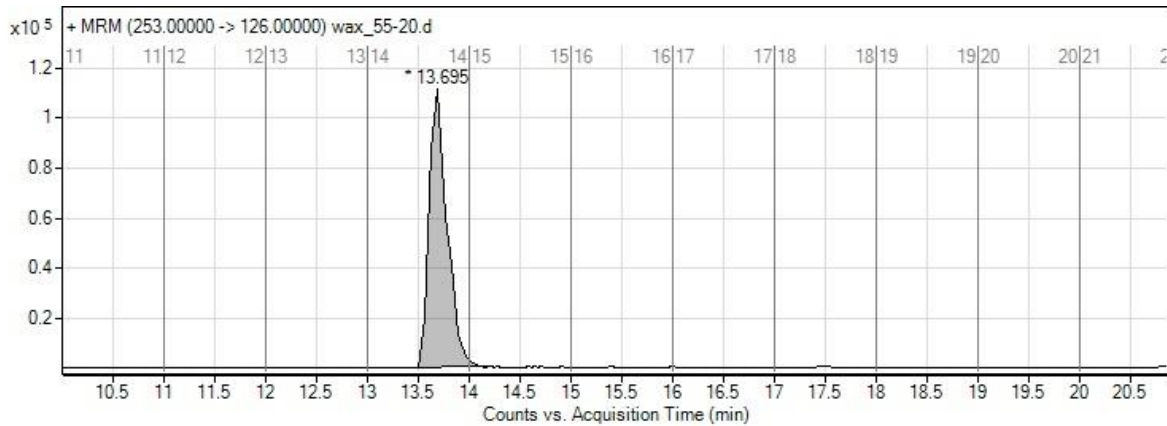
\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1, 4, 5, 6 και 7 σε Thiachlorprid πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:  $Area/Area_{IS} (\text{δείγματος}) \times 5 / Area/Area_{IS} (\text{spk5ppb})$ .

\* Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 2 σε Thiachlorprid πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των spike 5 ppb και spike 50 ppb, όπου ισούται με:

$[50 \times [\text{Area/Area IS}_{(\text{δείγματος})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{spk5ppb})}] + 5 \times [\text{Area/Area IS}_{(\text{spk50ppb})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{δείγματος})}] / [\text{Area/Area IS}_{(\text{spk50ppb})} - \text{Area/Area IS}_{(\text{spk5ppb})}]$ .

\* Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{54-20} = 0.41 \text{ ppb}$ ,  $C_{55-20} = 5.53 \text{ ppb}$ ,  $C_{57-20} = 0.26 \text{ ppb}$ ,  $C_{58-20} = 0.11 \text{ ppb}$ ,  $C_{59-20} = 0.60 \text{ ppb}$  και  $C_{60-20} = 0.04 \text{ ppb}$ .

➤  $\text{MRL} = 0.2 \text{ mg / kg} = 0.2 \text{ ppm}$



Εικόνα 44. Φάσμα MRM του δείγματος 2 (55-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Thiacloprid.

Πίνακας 40. Αποτελέσματα Tricyclazole στα δείγματα κηρήθρας.

Tricyclazole	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	14.394	18373	56	18323	1.0027	
	Spike5ppb	14.328	172993	98.9	63857	2.7091	
	2 (55-20)	14.365	138163	104.2	72381	1.9088	<b>3.52</b>

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 2 σε Tricyclazole πραγματοποιήθηκε μέσω του spike 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area/AreaIS$  (δείγματος)  $\times 5 / Area/AreaIS$  (spk5ppb).

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{55-20} = 1.73$  ppb.

### Tricyclazole

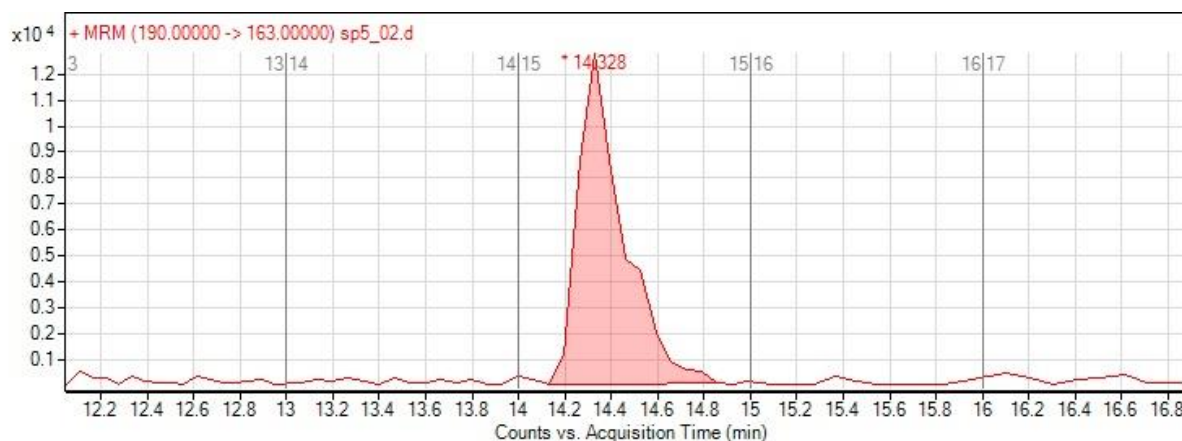
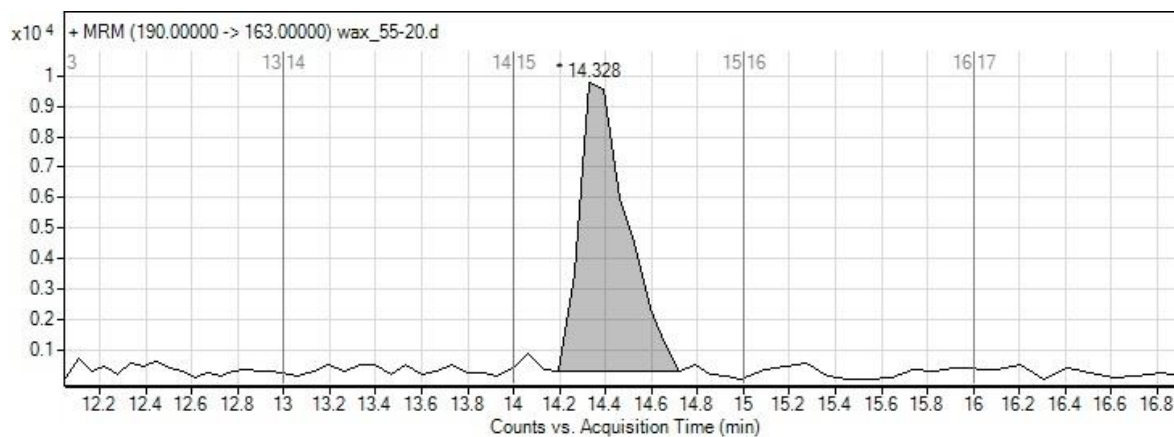
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

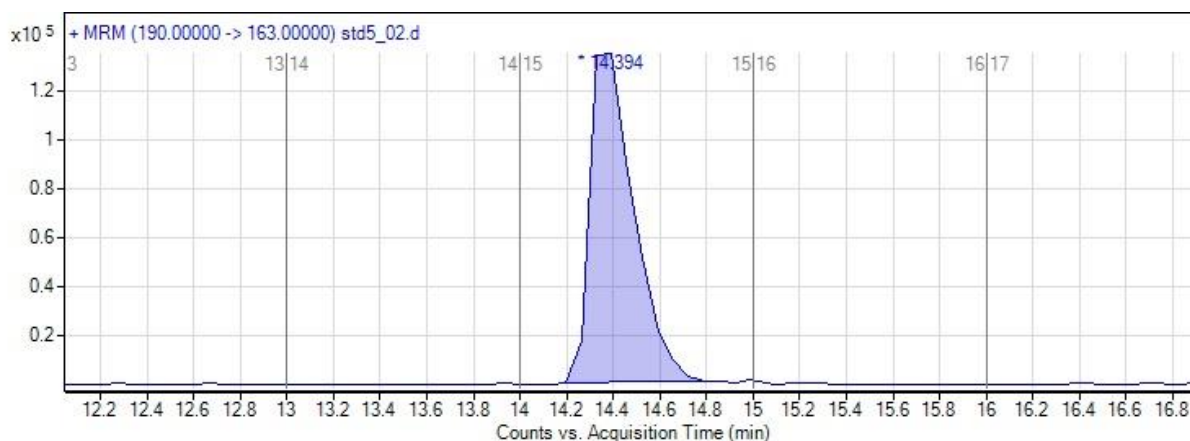
EXACT MASS = 189, MS [MH+] = 190

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 190 → 163 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

190 → 136 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05$  mg / kg = 0.05 ppm





Εικόνα 45. Φάσμα MRM του δείγματος 2 (55-20), spk 5 ppb και std 5 ppb για Tricyclazole.

## 5.4 Δείγματα Γύρης

Τα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν με την προαναφέρουσα μέθοδο ήταν στο σύνολο 3 και τα γεωργικά φάρμακα τα οποία ταυτοποιήθηκαν ήταν τα εξής: *Acetamiprid*, *Azinphos ethyl*, *DMF*, *Etofenprox*, *Fenpropimorph* και *Pyrimethanil*. Στον πίνακα 41 παρουσιάζονται εκτενέστερα τα εύρηματα για τα συγκεκριμένα δείγματα.

Πίνακας 41. Αποτελέσματα ζυγίσεων δειγμάτων γύρης.

N <sup>ο</sup> δείγματος	68-20	69-20	70-20
Μάζα (m)	2.011 g	2.010 g	2.008 g

Πίνακας 42. Ευρήματα γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα γύρης 1-3.

N <sup>ο</sup> Δείγματος	<i>Acetamiprid</i>	<i>Azinphos Ethyl</i>	<i>DMF</i>
1 (71-20)	•		•
2 (72-20)	•		•
3 (73-20)		•	
N <sup>ο</sup> Δείγματος	<i>Etofenprox</i>	<i>Fenpropimorph</i>	<i>Pyrimethanil</i>
1 (71-20)	•	•	•
2 (72-20)	•		
3 (73-20)	•		

Πίνακας 43. Αποτελέσματα Acetamiprid στα δείγματα γύρης.

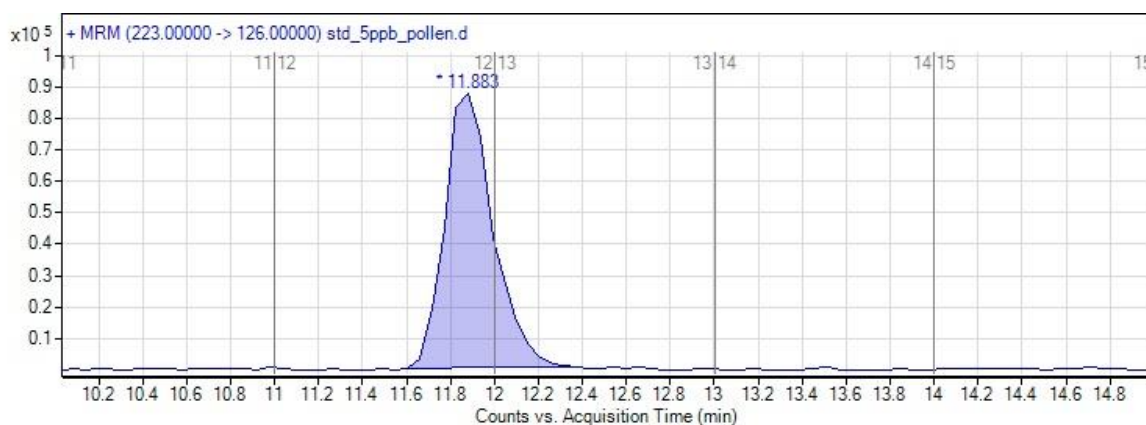
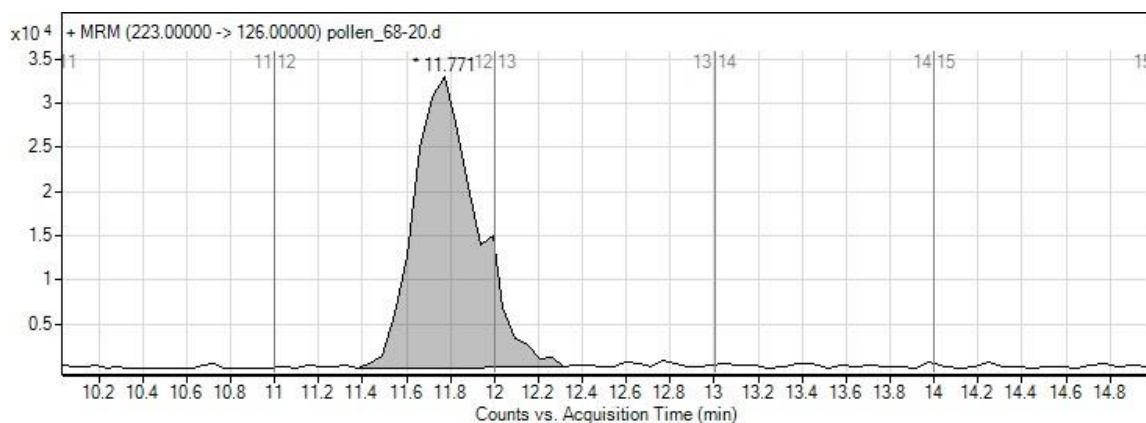
Acetamiprid	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	11.995	33021	-	-	-	
	Standard5ppb	11.883	1346864	23.4	21223900	0.06346	
	1 (68-20)	11.771	669938	22.6	2207577	0.303472	2.49
	2 (69-20)	11.771	124906	28.1	2886228	0.043277	0.46

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1 και 2 σε Acetamiprid πραγματοποιήθηκε μέσω του standard 5 ppb, όπου ισούται με:

$$Area_{(δείματος)} \times 5 / Area_{(std5ppb)}$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{68-20} = 1.24 \text{ ppb}$  και  $C_{69-20} = 0.23 \text{ ppb}$ .

➤  $MRL = 0.05 \text{ mg/kg} = 0.05 \text{ ppm}$



Εικόνα 10. Φάσμα MRM του δείγματος 1 (68-20) και std 5 ppb για Acetamiprid.

Πίνακας 44. Αποτελέσματα Azinphos Ethyl στα δείγματα γύρης.

Azinphos Ethyl	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	-	-	-	-	-	
	Standard5ppb	23.060	14034	-	-	-	
	Standard50ppb	23.060	230415	-	-	-	
	3 (70-20)	22.844	21920	-	-	-	6.64

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 3 σε Azinphos Ethyl πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των standard 5 ppb και standard 50 ppb, όπου ισούται με:

$$[50 \times [Area_{(δείγματος)} - Area_{(std5ppb)}] + 5 \times [Area_{(std50ppb)} - Area_{(δείγματος)}]] / [Area_{(std50ppb)} - Area_{(std5ppb)}].$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{70-20} = 3.31$  ppb.

### Azinphos Ethyl

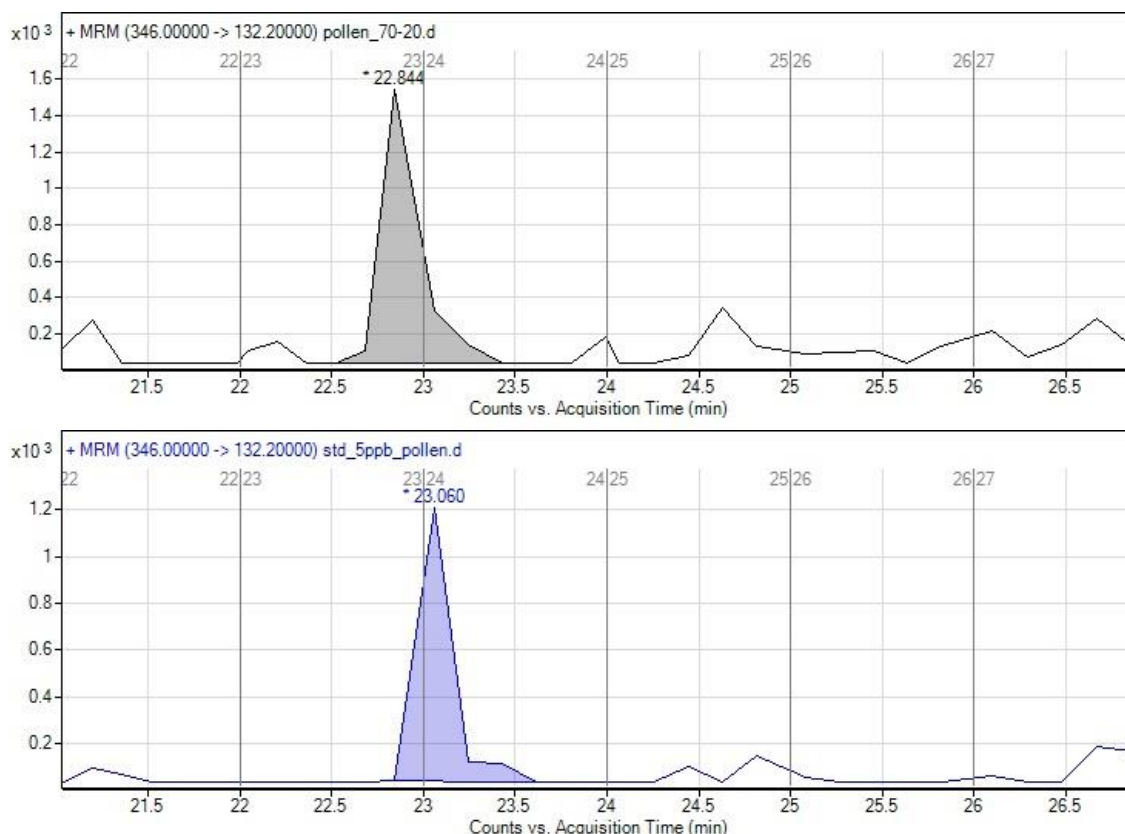
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

EXACT MASS = 345, MS [MH+] = 346

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ: 346 → 132 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

346 → 160 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.1 \text{ mg/kg} = 0.1 \text{ ppm}$



Εικόνα 11. Φάσμα MRM του δείγματος 3 (70-20) και std 5 ppb για Azinphos Ethyl.

Πίνακας 45. Αποτελέσματα DMF στα δείγματα γύρης.

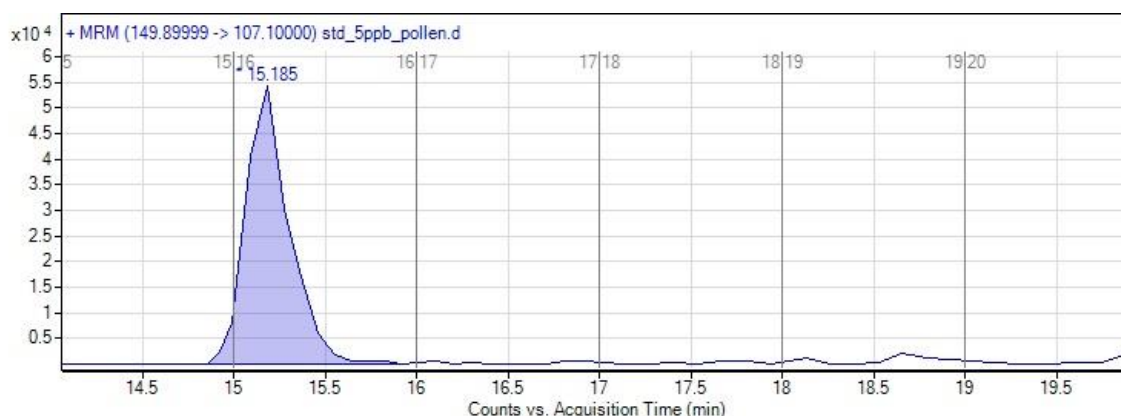
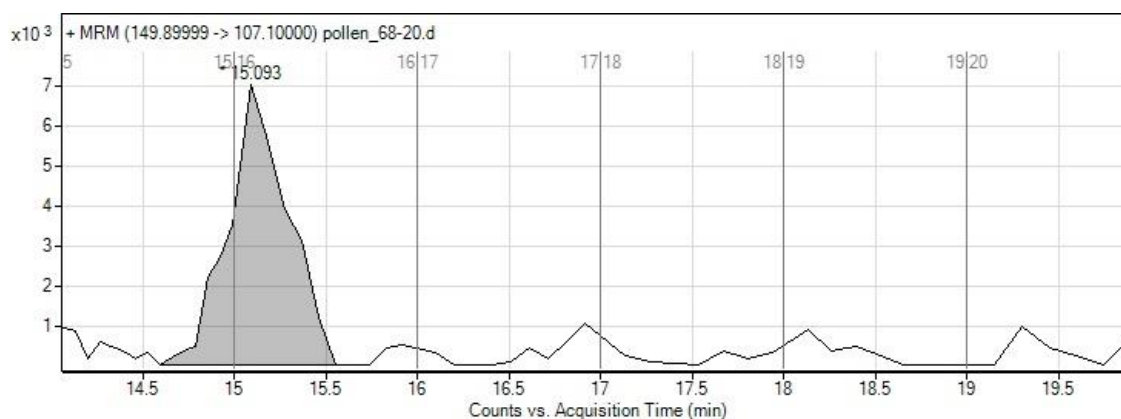
DMF	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	15.185	80932	-	-	-	
	Standard5ppb	15.185	836658	-	-	-	
	1 (68-20)	15.093	137863	-	-	-	0.82
	2 (69-20)	15.185	104646	-	-	-	0.63

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1 και 2 σε DMF πραγματοποιήθηκε μέσω του standard 5 ppb, όπου ισούται με:

$$Area_{(δείματος)} \times 5 / Area_{(std5ppb)}$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{68-20} = 0.41$  ppb και  $C_{69-20} = 0.31$  ppb.

➤  $MRL = 0.1$  mg/kg = 0.1 ppm



Εικόνα 48. Φάσμα MRM του δείγματος 1 (68-20) και std 5 ppb για DMF.

**Πίνακας 46. Αποτελέσματα Etofenprox στα δείγματα γύρης.**

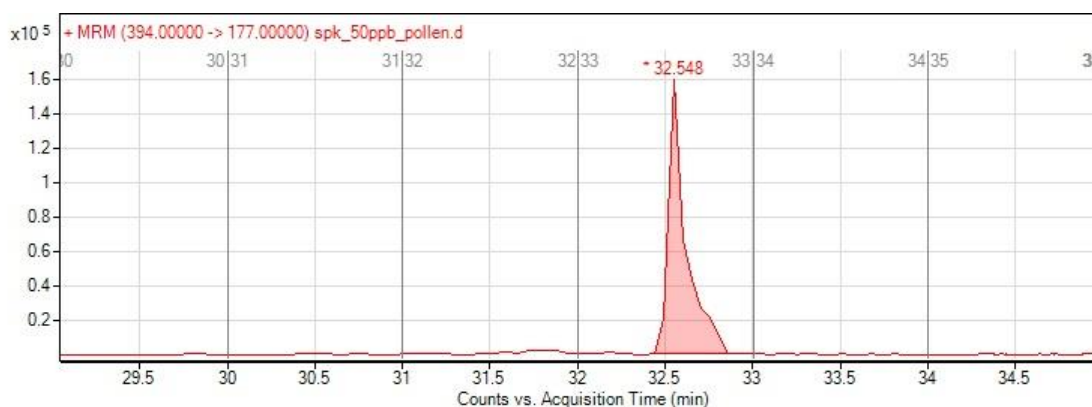
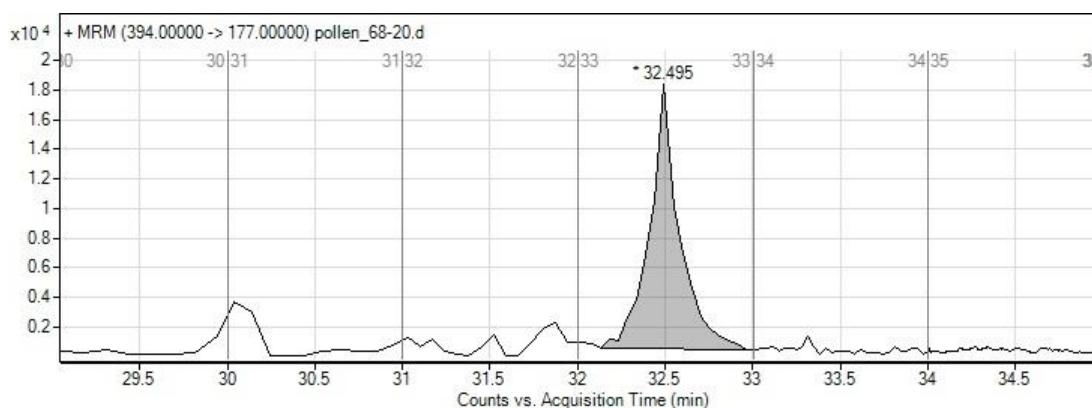
Etofenprox	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	-	-	-	-	-	
	Standard5ppb	32.548	101119	-	-	-	
	Standard50ppb	32.548	1031308	-	-	-	
	1 (68-20)	32.495	207492	-	-	-	10.15
	2 (69-20)	32.495	248761	-	-	-	12.14
	3 (70-20)	32.495	206619	-	-	-	10.10

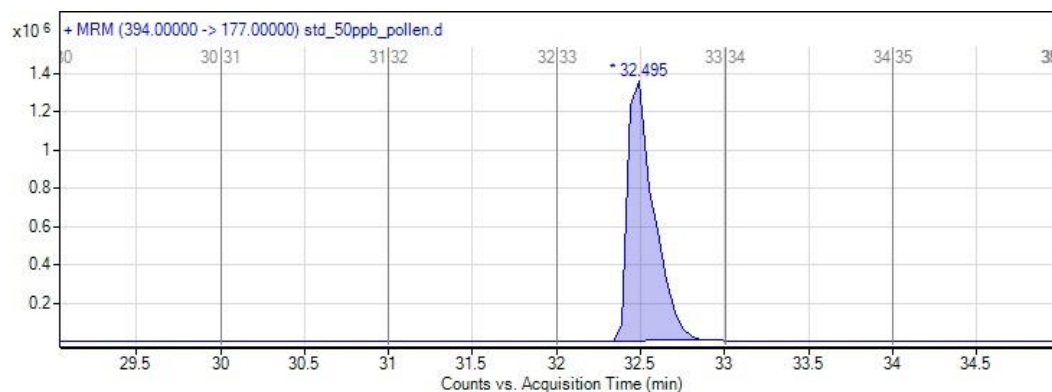
\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1, 2 και 3 σε Etofenprox πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου του bracketing μεταξύ των standard 5 ppb και standard 50 ppb, όπου ισούται με:

$$[50 \times [Area_{(δείγματος)} - Area_{(std5ppb)}] + 5 \times [Area_{(std50ppb)} - Area_{(δείγματος)}]] / [Area_{(std50ppb)} - Area_{(std5ppb)}].$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{68-20} = 5.05 \text{ ppb}$ ,  $C_{69-20} = 6.04 \text{ ppb}$  και  $C_{70-20} = 5.03 \text{ ppb}$ .

➤  $MRL = 0.05 \text{ mg/kg} = 0.05 \text{ ppm}$





Εικόνα 12. Φάσμα MRM του δείγματος 1 (68-20), spk 50 ppb και std 50 ppb για Etofenprox.

Πίνακας 46. Αποτελέσματα Fenpropimorph στα δείγματα γύρης.

Fenpropimorph	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
	Blank	-	-	-	-	-	
	Standard5ppb	20.513	1126581	-	-	-	
	1 (68-20)	20.513	609356	-	-	-	2.70

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων 1,2 και 3 σε Fenpropimorph πραγματοποιήθηκε μέσω του standard 5 ppb, όπου ισούται με:

$Area \text{ (δείγματος)} \times 5 / Area \text{ (std5ppb)}$ .

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{68-20} = 1.34 \text{ ppb}$ .

### Fenpropimorph

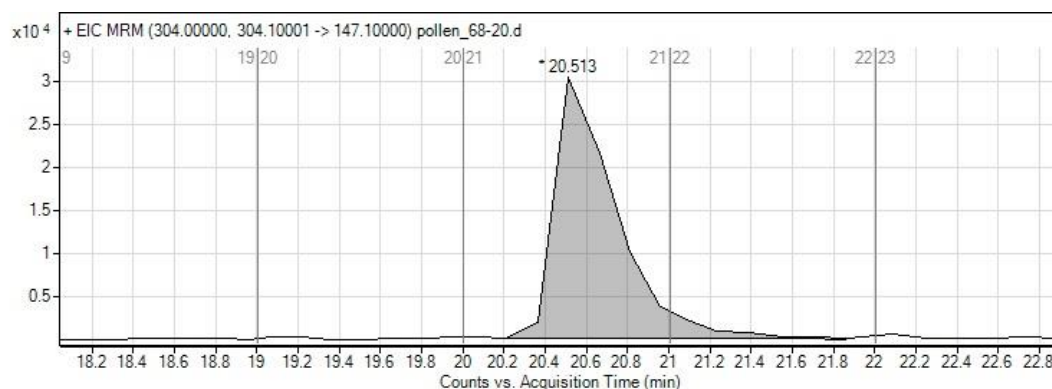
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΟΧΙ

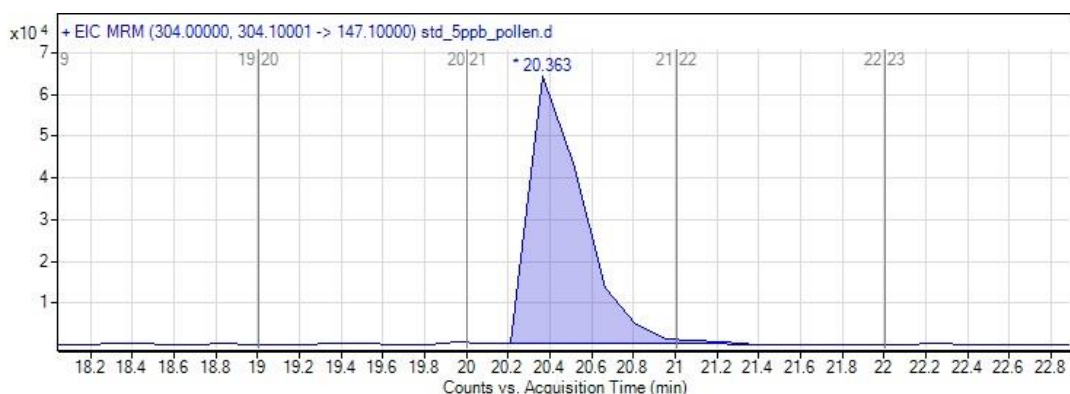
EXACT MASS = 303, MS [MH+] = 304

ΜΕΤΑΠΤΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 304 → 147 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

304 → 132 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05 \text{ mg/kg} = 0.05 \text{ ppm}$





Εικόνα 50. Φάσμα MRM του δείγματος 1 (68-20) και std 50 ppb για Fenpropimorph.

Πίνακας 46. Αποτελέσματα Pyrimethanil στα δείγματα γύρης.

	Data File	RT	Area	Ratio	Area IS	Area/Area IS	C (ppb)
<b>Pyrimethanil</b>	Blank	-	-	-	-	-	
	Standard5ppb	19.746	153049	-	-	-	
	Standard50ppb	19.746	2779254	-	-	-	
	1 (68-20)	19.746	348250	68.2	-	-	8.34

\*Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης του δείγματος 1 σε Pyrimethanil πραγματοποιήθηκε μέσω μεθόδου bracketing μεταξύ των standard 5 ppb και standard 50 ppb, όπου ισούται με:

$$[50 \times [Area_{(δείγματος)} - Area_{(std5ppb)}] + 5 \times [Area_{(std50ppb)} - Area_{(δείγματος)}]] / [Area_{(std50ppb)} - Area_{(std5ppb)}].$$

\*Άρα, με αναγωγή στο 1 g έχουμε  $C_{68-20} = 4.15 \text{ ppb}$ .

### Pyrimethanil

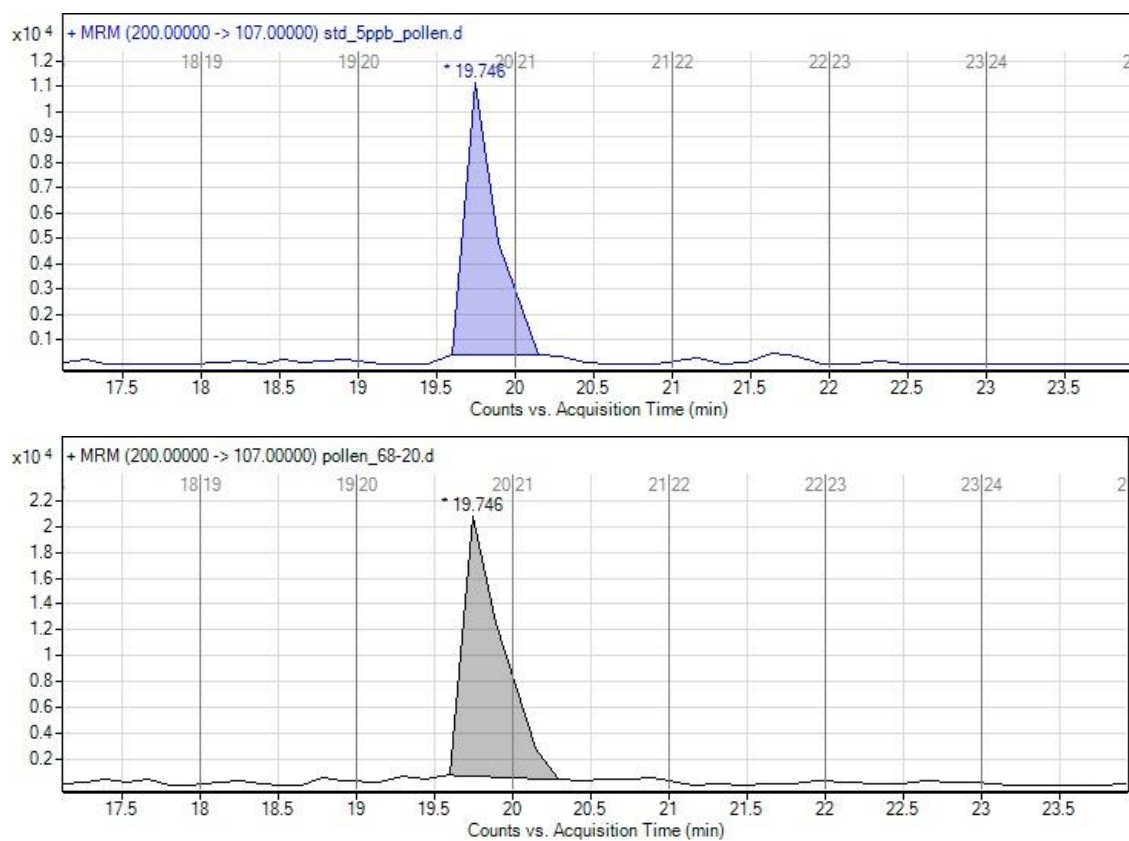
ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΓΚΡΙΣΗ = ΝΑΙ

EXACT MASS = 199, MS [MH+] = 200

ΜΕΤΑΠΤΩΣΕΙΣ ΙΟΝΤΩΝ : 200 → 107 (ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ)

200 → 79 (ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗΣ)

➤  $MRL = 0.05 \text{ mg/kg} = 0.05 \text{ ppm}$



**Εικόνα 51. Φάσμα MRM του δείγματος 1 (68-20) και std 5 ppb για Pyrimethanil.**

## 6. Συμπεράσματα

Στη συγκεκριμένη εργασία παρουσιάστηκε η ανάλυση μελισσοκομικών υποστρωμάτων με τη τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (HPLC) συζευγμένης με Ιοντισμό Ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) και της Διαδοχικής Φασματομετρίας Μάζας (MS/MS) με σκοπό την ανίχνευση, ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση υπολειμμάτων πληθώρας γεωργικών φαρμάκων που εμφανίζεται να υπάρχουν σε αυτά. Για την επίτευξη του στόχου αυτού, χρησιμοποιήθηκε στήλη χρωματογραφίας ανάστροφης φάσης C<sub>18</sub> και κινητές φάσεις: Α, με βάση το νερό και Β, με βάση τη μεθανόλη. Ως αέριο έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το άζωτο (N<sub>2</sub>), ενώ επιλέχθηκε βαθμιδωτή έκλουση καθόλη τη διάρκεια της αναλυτικής διαδικασίας, με ταχύτητα έκλουσης τα 0.28μL/min και πίεση κατά μέσο όρο τα 160-180 bar. Η προεργασία των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με βάση τη μεθοδολογία QuEChERS, χρησιμοποιώντας άλατα εκχύλισης και καθαρισμού με σκοπό τη καλύτερη δυνατή απομάκρυνση των συστατικών από αυτά. Επιπλέον παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα αναφοράς με σκόπο την μελέτη της αλληλεπίδρασης τόσο του υποστρώματος με τον αναλύτη (εμβολιασμός ή spiking), όσο και του υποστρώματος με τον ίδιο το διαλύτη. Με το πέρας της αναλυτικής αυτής διαδικασίας, τα προκύπτοντα φάσματα αξιολογήθηκαν και συγκρίθηκαν με εκείνα αρκετών βιβλιογραφικών αναφορών προκειμένου να ταυτοποιηθούν και τελικά να ποσοτικοποιηθούν.

- ❖ Όσον αφορά τα δείγματα μελισσών, ήταν στο σύνολο 7 και τα γεωργικά φάρμακα τα οποία εντοπίστηκαν σε αυτά, είναι τα εξής: *Acetamiprid*, *Carbendazim*, *Methomyl* και *Thiacloprid*. Αξίζει να σημειωθεί πως οι εντάσεις κορυφών ήταν της τάξης του 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> και λαμβάνοντας υπόψη τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα και συγκρίνοντάς τα με τις τιμές αναφοράς *LD<sub>50,contact</sub>* και *LD<sub>50,oral</sub>*, εξάγεται εύλογα το συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις είναι παρακάτω των *LOQ* της μεθόδου για τις επικυρωμένες αναλυόμενες ουσίες.
- ❖ Όσον αφορά τα δείγματα μελιού, ήταν στο σύνολο 5 και τα γεωργικά φάρμακα τα οποία εντοπίστηκαν σε αυτά, είναι τα εξής: *Acetamiprid*, *Carbendazim*, *Clothianidin*, *Malathion*, *Methomyl*, *Pendimethalin*, *Tebuconazole* και *Thiacloprid*. Αξίζει να σημειωθεί πως οι εντάσεις κορυφών ήταν της τάξης του 10<sup>3</sup>-10<sup>5</sup> και λαμβάνοντας υπόψη τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα και συγκρίνοντάς τα με τις τιμές αναφοράς *MRL*, εξάγεται

εύλογα το συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις είναι παρακάτω των *LOQ* της μεθόδου για τις επικυρωμένες αναλυόμενες ουσίες.

- ❖ Όσον αφορά τα δείγματα κεριού, ήταν στο σύνολο 7 και τα γεωργικά φάρμακα τα οποία εντοπίστηκαν σε αυτά, είναι τα εξής: *Amitraz*, *Boscalid*, *Carbendazim*, *DMF*, *Etofenprox*, *Malathion*, *Propiconazole*, *Thiabendazol*, *Thiacloprid* και *Tricyclazole*. Αξίζει να σημειωθεί πως οι εντάσεις κορυφών ήταν της τάξης του  $10^3$ - $10^5$  και λαμβάνοντας υπόψη τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα και συγκρίνοντάς τα με τις τιμές αναφοράς *MRL*, εξάγεται εύλογα το συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις είναι παρακάτω των *LOQ* της μεθόδου για τις επικυρωμένες αναλυόμενες ουσίες.
- ❖ Όσον αφορά τα δείγματα γύρης, ήταν στο σύνολο 3 και τα γεωργικά φάρμακα τα οποία εντοπίστηκαν σε αυτά, είναι τα εξής: *Acetamiprid*, *Azinphos Ethyl*, *DMF*, *Etofenprox*, *Fenpropimorph* και *Pyrimethanil*. Αξίζει να σημειωθεί πως οι εντάσεις κορυφών ήταν της τάξης του  $10^3$ - $10^5$  και λαμβάνοντας υπόψη τις υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των γεωργικών φαρμάκων στα δείγματα και συγκρίνοντάς τα με τις τιμές αναφοράς *MRL*, εξάγεται εύλογα το συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις είναι παρακάτω των *LOQ* της μεθόδου για τις επικυρωμένες αναλυόμενες ουσίες.

Συνολικά, στα δείγματα τα οποία αναλύθηκαν με τη συγκεκριμένη αναλυτική τεχνική ανιχνεύτηκαν νεονικοτινοειδή γεωργικά φάρμακα όπως το *Acetamiprid* και το *Thiacloprid*, καρβαμιδικά γεωργικά φάρμακα όπως το *Carbendazim* και το *Methomyl*, οργανοφωσφορικά γεωργικά φάρμακα όπως το *Malathion* και το *Azinphos Ethyl*, το πυρεθροειδές γεωργικό φάρμακο *Etofenprox* καθώς και πολλά μυκητοκτόνα/ ζιζανιοκτόνα/ εντομοκτόνα. Τα εξαγόμενα αποτελέσματα χαρακτηρίζονται αρκετά ικανοποιητικά μιας και υπάρχει ακρίβεια και ευστοχία αποτελέσματος ταυτοποίησης και η επικύρωση και επιβεβαίωση του εκάστοτε αποτελέσματος βασίζεται σε προδιαγραφές και δεδομένα ευρωπαϊκών φορέων.

Μελλοντικό στόχος αποτελεί:

-Η πραγματοποίηση περαιτέρω αναλύσεων με τη συγκεκριμένη τεχνική ώστε να αυξηθεί η επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων.

-Η περαιτέρω αραίωση των δειγμάτων-προς-ανάλυση ή ακόμα και η μείωση του όγκου της εκάστοτε έγχυσης, θα έχει ως στόχο την δημιουργία λιγότερο ευρείων και πιο οξείων κορυφών. Στο παραπάνω στόχο θα μπορούσε να συμβάλλει και το καλύτερο ίσως φιλτράρισμα των δειγμάτων κατά το σταδιο της προεργασίας των δειγμάτων και η καλύτερη ρύθμιση του pH των κινητών φάσεων.

-Η αλλαγή της χρωματογραφικής στήλης του εργαστηρίου, που χρησιμοποιείται για δεκάδες αναλύσεις σε καθημερινή βάση, θα μπορούσε ενδεχομένως να μειώσει τυχόν προσμίξεις που πιθανόν δημιουργούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα με κορυφές ευρείες ή/και που επικαλύπτονται.

-Η σταθερότητα των διαλυμάτων τόσο των δειγμάτων όσο και των προτύπων είναι άκρως σημαντικός παράγοντας που μπορεί να επηρεάζει την ακρίβεια, συνεπώς η φροντίδα φύλλαξης σε κατάλληλες συνθήκες, έχει ως στόχο τη συμβολή σε ένα πιο ακριβές αποτέλεσμα.

-Τέλος, η εισαγωγή και ανάλυση των δειγμάτων, σαφώς με την κατάλληλη προεργασία αλλαγής διαλύτη, στον *Αέριο Χρωματογράφο*, θα μπορούσε να εξάγει ένα πιο ολοκληρωμένο αποτέλεσμα καθώς πτητικές ουσίες θα μπορούν να ανιχνευτούν με τη χρήση της συγκεκριμένης μεθοδολογίας όπως για παράδειγμα αποτελούν και τα *Πυρεθροειδή* γεωργικά φάρμακα.

Εν κατακλείδι, τόσο η προεργασία των δειγμάτων όσο και η αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε στην συγκεκριμένη εργασία αποτελούν μία συνδυαστική μεθοδολογία αρκετά πρωτόπορα, γρήγορη και ακριβής με πολλαπλές δυνατότητες ανάλυσης διαφορετικών μορφών δειγμάτων και με χαρακτηριστικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων τεχνικών. Επιπλέον, η εξαιρετική ευαισθησία, το μεγάλο εύρος ανάλυσης και η απόδοση της δομής του προς-ανάλυση-δείγματος που χαρακτηρίζουν τη τεχνική αυτή, την έχουν καθιερώσει ως μία από τις πιο αξιόλογες και σημαντικές τεχνικές με προσφορά δυνατοτήτων βελτίωσης μελλοντικών αναλύσεων στον επιστημονικό τομέα. Σε καμία περίπτωση δε έχει σκοπό να αντικαταστήσει άλλες υπάρχουσες τεχνικές, αλλά σε συνδυασμό με άλλες μπορεί να δώσει το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα όσον αφορά την συνιστώσα του χρόνου και της ποιότητας της εκάστοτε ανάλυσης.

## 7. Βιβλιογραφία

- [1] Χαριζάνης Χρ. Πασχάλης, «Μέλισσα και Μελισσοκομική Τεχνική», γ' έκδοση, Αθήνα 2014
- [2] Daniel C. Harris, «Ποσοτική Χημική Ανάλυση», Τόμος II, Κεφάλαια 22 & 25, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο 2010
- [3] Franz-Xavier Reichl, «Γενική Τοξικολογία – Ουσίες, Δράσεις, Περιβαλλον», 186-203, 250-251, Ιατρικές Εκδόσεις Π.Χ. Πασχαλίδης, 2004
- [4] Skoog, Holler, Crouch, «Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης» 6<sup>η</sup> έκδοση, τμήμα 3 κεφάλαιο 20- τμήμα 5 κεφάλαια 26 και 28, Εκδόσεις Κωσταράκη, 2007
- [5] European Commission. (2021). Document n0 SANTE 11312/2021. Analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Accessible at: [https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl\\_article.asp?CntID=727](https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727). 1–57.
- [6] Edmond de Hoffmann, Vincent Stroobant. *Mass spectrometry : Principles and Applications, Third edition.* 2007, 119.
- [7] Kero, F. A., Yost, R. A., & Pedder, R. E. (2001). *Short Specialist Review Quadrupole mass analyzers : theoretical and practical considerations.*
- [8] Kasiotis, K. M., & Machera, K. (2017). *Improved liquid chromatographic photo diode array mass spectrometric determination of 5-hydroxymethylfurfural and related furfurals in honey. Toxicological and Environmental Chemistry*, 99(4), 578–589. <https://doi.org/10.1080/02772248.2016.1201674>
- [9] Kasiotis, K. M., Tzouganaki, Z. D., & Machera, K. (2018). *Chromatographic determination of monoterpenes and other acaricides in honeybees: Prevalence and possible synergies. Science of the Total Environment*, 625, 96–105. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.244>
- [10] Sud, D., & Kaur, P. (2012). *Heterogeneous photocatalytic degradation of selected organophosphate pesticides: A review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(22), 2365–2407. <https://doi.org/10.1080/10643389.2011.574184>
- [11] 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

- [12] Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). *Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques*. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*. doi:10.1016/j.ejar.2020.08.007
- [13] Zafeiraki, E., Kasiotis, K. M., Nisianakis, P., Manea-Karga, E., & Machera, K. (2022). *Occurrence and human health risk assessment of mineral elements and pesticides residues in bee pollen*. *Food and Chemical Toxicology*, 161(November 2021), 112826. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2022.112826>
- [14] Cech, N. B., & Enke, C. G. (2001). *Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals*. *Mass Spectrometry Reviews*, 20(6), 362–387. <https://doi.org/10.1002/mas.10008>
- [15] Wang, J., Chow, W., & Leung, D. (2011). *Applications of LC/ESI-MS/MS and UHPLC/Qq-TOF-MS for the Determination of 141 Pesticides in Tea*. *Journal of AOAC International*, 94(6), 1685–1714. doi:10.5740/jaoacint.sgewang
- [16] Hassaan, M. A., & El Nemr, A. (2020). *Pesticides pollution: Classifications, human health impact, extraction and treatment techniques*. *Egyptian Journal of Aquatic Research*, 46(3), 207–220. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2020.08.007>
- [17] Mol, H., Dam, R. Van, & Nijssen, R. (2018). *Introduction / Pesticides in HBM4EU*. Retrieved from <https://www.efsa.europa.eu/en/efsa>
- [18] Stevens, J., & Jones, D. (2010). *QuEChERS 101: The Basics and Beyond*. Agilent Technologies, 3–8. Retrieved from [https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/QuEChERS\\_101\\_10\\_11\\_01.pdf](https://www.agilent.com/cs/library/eseminars/Public/QuEChERS_101_10_11_01.pdf)
- [19] Σαμανίδου, Β., & Θεοδωρίδης, Γ. Κεφάλαιο 15 : Επικύρωση Βιοαναλυτικών Μεθόδων. 1–11.
- [20] Frederike (2022) *Identifying & supporting wild bees*, Plantura. Available at: <https://plantura.garden/uk/insects/bees/wild-bees>
- [21] Panagiotis, M. (2014, January 1). *ΒΙΟΛΟΓΙΑ\*ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ\*ΑΝΑΤΟΜΙΑ ΚΑΙ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΜΕΛΙΣΣΑΣ. ΧΡΥΣΟ ΜΕΛΙ ΖΑΚΥΝΘΟΥ*. [https://toxrysomeli.blogspot.com/2015/05/blog-post\\_25.html](https://toxrysomeli.blogspot.com/2015/05/blog-post_25.html)
- [22] *LC-MS – What Is LC-MS, LC-MS Analysis and LC-MS/MS*. (2017, January 1). *Analysis & Separations From Technology Networks*. <http://www.technologynetworks.com/analysis/articles/lc-ms-what-is-lc-ms-lc-ms-analysis-and-lc-msms-348238>

- [23] *Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics* | Agilent. (2023, June 12). *Chemical Analysis, Life Sciences, and Diagnostics* | Agilent. [https://www.agilent.com/?gclid=Cj0KCQjwnMWkBhDLARIsAHBOfrQUxHUddx8jj6egtBcqV2rni8Bcgwit-sBdKipynH7ANANaHhwMJlaAvb\\_EALw\\_wcB&gclidsrc=aw.ds](https://www.agilent.com/?gclid=Cj0KCQjwnMWkBhDLARIsAHBOfrQUxHUddx8jj6egtBcqV2rni8Bcgwit-sBdKipynH7ANANaHhwMJlaAvb_EALw_wcB&gclidsrc=aw.ds)
- [24] *Agytax Lab - Tecnología avanzada de extracción*. Agytax Lab - Tecnología Avanzada De Extracción. <https://agytax.com/>
- [25] *Heidolph Instruments : Rotary Evaporators*. Heidolph Instruments : Rotary Evaporators. <https://heidolph-instruments.com/en/products/Rotary-Evaporators~c19>
- [26] *Labofuge, H. (n.d.). Our Heraeus Labofuge 400 and 400 R benchtop centrifuges — ideal for average-sized samples in routine lab applications for research , biology and medicine .*
- [27] *Cervera, M. I., Portolés, T., López, F. J., Beltrán, J., & Hernández, F. (2014). Screening and quantification of pesticide residues in fruits and vegetables making use of gas chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 406(27), 6843–6855. doi:10.1007/s00216-014-7853-1*
- [28] *Cannella, D. (2018). Light-induced electron transfer protocol for enzymatic oxidation of polysaccharides. In Methods in Molecular Biology (Vol. 1796). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7877-9\_17*
- [29] *Jomova, K., & Valko, M. (2011). Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology, 283(2–3), 65–87. https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.03.001*
- [30] *INCHEM. INCHEM. https://www.inchem.org/#/*
- [31] *EU Pesticides Database. (n.d.). EU Pesticides Database. https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database / start / screen / mrls / searchpr*
- [32] *Hertfordshire, U. O. (n.d.). PPDB - Pesticides Properties DataBase. PPDB - Pesticides Properties DataBase. http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/*
- [33] *Quadrupole mass analyzers: theoretical and practical considerations (Proteomics). (n.d.). Quadrupole Mass Analyzers: Theoretical and Practical Considerations (Proteomics). https://what-when-how.com/proteomics/quadrupole-mass-analyzers-theoretical-and-practical-considerations-proteomics/*

[34] *File:Liquid chromatography MS spectrum 3D analysis.png - Wikipedia.* (n.d.). *File:Liquid Chromatography MS Spectrum 3D analysis.png - Wikipedia.* [https://en.wikipedia.org/wiki/File:Liquid\\_chromatography\\_MS\\_spectrum\\_3D\\_analysis.png](https://en.wikipedia.org/wiki/File:Liquid_chromatography_MS_spectrum_3D_analysis.png)

## 8. Παράρτημα

Πίνακας 47. Όρια Ποσοτικοποίησης (LOQ)

LOQ (mg/kg)	
Acetamiprid	0.4
Carbendazim	2
Methomyl	0.1
Thiacloprid	0.1
Clothianidin	0.2
Malathion	1.5
Pendimethalin	5
Tebuconazole	0.2
Amitraz	1
Boscalid	1
DMF	0.5
Etofenprox	2
Propiconazole	5
Thiabendazole	2
Tricyclazole	2
Azinphos Ethyl	5
Fenpropimorph	1
Pyrimethanil	1