

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Ιατρικής**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή  
–Ποιότητα- Ασφάλεια Τροφίμων και Δημόσια Υγεία»**

**«Προσδιορισμός κατάλοιπων φυτοφαρμάκων  
στο μέλι με μικροτεχνικές εκχύλισης και με  
εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας»**

**Φοιτήτρια: Μαρτίνη Αν. Μαργαρίτα**

**Γεωπόνος-Επιστήμων Τροφίμων  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης**

**Έτος 2010**

**Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Ιατρικής**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ  
«Εφαρμοσμένη Δημόσια Υγεία και Περιβαλλοντική Υγιεινή  
–Ποιότητα - Ασφάλεια Τροφίμων και Δημόσια Υγεία»**

**«Προσδιορισμός κατάλοιπων φυτοφαρμάκων  
στο μέλι με μικροτεχνικές εκχύλισης και με  
εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας»**

**Φοιτήτρια: Μαρτίνη Αν. Μαργαρίτα**

**Γεωπόνος-Επιστήμων Τροφίμων  
Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης**

**Έτος 2010**

## **Τριμελής Επιτροπή**

### ***Τσιρόπουλος Νικόλαος***

Αναπληρωτής Καθηγητής στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας.

### ***Τσακάλωφ Ανδρέας***

Επίκουρος Καθηγητής στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Επιστημών Υγείας, Τμήμα Ιατρικής, Εργαστήριο Υγιεινής και Επιδημιολογίας

### ***Αμβράζη Ελπινίκη***

Χημικός (MSc, PhD), Επιστημονικός συνεργάτης στο Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Σχολή Γεωπονικών Επιστημών, Τμήμα Γεωπονίας Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας

*Στους γονείς μου, Αντώνη και Σταματία  
και στον αδελφό μου, Χρίστο*

# «Προσδιορισμός κατάλοιπων φυτοφαρμάκων στο μέλι με μικροτεχνικές εκχύλισης και με εφαρμογή αέριας χρωματογραφίας»

Σημαντικοί όροι διπλωματικής εργασίας

pesticides – Παρασιτοκτόνα, honey – μέλι, microextraction – μικροεκχύλιση, HS-SDME- μικροεκχύλιση μιας σταγόνας στον υπερκείμενο χώρο, Gas Chromatography- Αέρια Χρωματογραφία

## Περίληψη

Η παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο της μεταπτυχιακής μου διατριβής, με σκοπό την ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ουσιών στο μέλι με την τεχνική της μικροεκχύλισης υγρής φάσης (*Liquid Phase Micro Extraction -LPME*) σε μια σταγόνα (*Sinlge Drop Microextraction –SDME*) σε συνδυασμό με την έκθεσή της στον υπερκείμενο του διαλύματος χώρο (*Head Space Sinlge Drop Microextraction – HS-SDME*).

Το κείμενο της εργασίας αποτελείται από δυο μέρη, το θεωρητικό μέρος και το πειραματικό μέρος. Στο θεωρητικό μέρος δίνονται πληροφορίες για το μέλι και για τους τρόπους επιβάρυνσης του μελιού και των άλλων προϊόντων κυψέλης με παρασιτοκτόνα ή και άλλους ρύπους (Κεφάλαιο 1). Επίσης, δίνονται πληροφορίες για τα παρασιτοκτόνα (φυτοπροστατευτικά προϊόντα και κτηνιατρικά φάρμακα) και για τις κατηγορίες ταξινόμησης των ουσιών αυτών, τη σχετική νομοθεσία που υπάρχει για το μέλι και τα ανώτατα επιτρεπτά όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων και φαρμάκων σε προϊόντα ζωικής προέλευσης (Κεφάλαιο 2). Τέλος, γίνεται εκτενής αναφορά στην αναλυτική μεθοδολογία, στις τεχνικές εκχύλισης, στις τεχνικές ανάλυσης (Κεφάλαιο 3) καθώς και στην παρουσίαση των πειραματικών μοντέλων που χρησιμοποιούνται στη χημειομετρική προσέγγιση της μελέτη των τεχνικών μικροεκχύλισης (Κεφάλαιο 4).

Στο πειραματικό μέρος παρουσιάζονται ο σκοπός της πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας και αναπτύσσεται η αναλυτική μεθοδολογία και το ενόργανο σύστημα αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό και την επιβεβαίωση των ουσιών στόχου (Κεφάλαιο 5). Στη συνέχεια παρουσιάζονται και συζητούνται τα αποτελέσματα που προέκυψαν (Κεφάλαιο 6). Παρουσιάζονται η επιλογή και η βελτιστοποίηση των σημαντικότερων παραμέτρων στην *HS-SDME* με τη χρήση παραγοντικών πειραμάτων (*Plackett-Burman Design* και του *Central Composite design (CCD)*). Στη συνέχεια, δίνονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της *HS-SDME-GC-ECD* μεθόδου που αναπτύχθηκε και συγκριτικά στοιχεία των ορίων ανίχνευσης (LOD  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) και ποσοτικοποίησης (LOQ  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) με άλλες μεθόδους. Επίσης, παρουσιάζονται οι σχετικές ανακτήσεις και % σχετικές τυπικές αποκλίσεις όπως υπολογίστηκαν από την εκχύλιση εμβολιασμένων δειγμάτων μελιού σε διάφορες συγκεντρώσεις με την *HS-SDME* μέθοδο που αναπτύχθηκε. Τέλος, γίνεται εφαρμογή της *HS-SDME* σε πραγματικά δείγματα μελιού και δίνονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων με τρεις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης: την *HS-SDME* που αναπτύχθηκε, την εκχύλιση *SDME* και την εκχύλιση υγρού-υγρού (*LLE*).

# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες

Κατάσταση διαγραμμάτων

Κατάσταση πινάκων

## **Κεφάλαιο 1** **1**

1.1 Η παραγωγή ποιοτικού μελιού και επεμβάσεις που υποβαθμίζουν την ποιότητά του	1
1.2 Κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται μέσα στην κυψέλη	2
1.3 Επίδραση του χώρου και των μέσων του τρύγου στην ποιότητα του μελιού	3
1.4 Επεμβάσεις που γίνονται μετά τον τρύγο και μέχρι τη διάθεση του μελιού και υποβαθμίζουν την ποιότητά του, καθώς και κατά την αποθήκευση και η θερμική επεξεργασία	4

## **Κεφάλαιο 2** **5**

2.1 Γεωργικά φάρμακα	5
2.2 Κατηγορίες και ταξινόμηση γεωργικών φαρμάκων	5
2.3 Τοξικότητα γεωργικών φαρμάκων	7
2.4 Νομοθεσία για τα κατάλοιπα φαρμάκων και φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης	9
2.6 Codex Alimentarius	10

## **Κεφάλαιο 3** **11**

3.1 Κατάλοιπα φυτοπροστατευτικών ουσιών και μέθοδοι προσδιορισμού τους	11
3.2 Εκχύλιση	11
3.3 Καθαρισμός	12
3.3.1 Τεχνικές εκχύλισης	12
3.3.1.1 Εκχύλιση υγρού-υγρού ( <i>Liquid-Liquid Extraction, LLE</i> )	12
3.3.1.2 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης ( <i>Solid phase Extraction, SPE</i> )	13
3.3.1.3 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης ( <i>Solid Phase Microextraction, SPME</i> )	15
3.3.1.4 Μικροεκχύλιση δια της υγρής φάσης ( <i>Liquid Phase Microextraction, LPME</i> )	16
3.3.2 Μικροτεχνικές εκχύλισης στον υπερκείμενο χώρο	18
3.3.2.1 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο ( <i>Headspace Solid Phase Microextraction, HS-SPME</i> )	19
3.3.2.2 Μικροεκχύλιση μιας σταγόνας στον υπερκείμενο χώρο ( <i>Headspace single drop microextraction, HS-SDME</i> )	19
3.3.3 Εκτίμηση των παραγόντων που επηρεάζουν την <i>LPME</i> στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων	20
3.3.3.1 Χαρακτηριστικά του δέκτη (acceptor phase) στην <i>LPME</i>	20
3.3.3.2 Όγκοι του διαλύματος δότη (V donor solution) και του δέκτη (acceptor)	21
3.3.3.3 Χρόνος έκθεσης	21
3.3.3.4 Ανάδευση	22
3.3.3.5 Ιονική ισχύς	22

3.3.3.6 Επίδραση του pH	23
3.3.3.7 Θερμοκρασία	23
3.4 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης	23
3.4.1 Αέρια Χρωματογραφία	24
3.4.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης	25

## **Κεφάλαιο 4** **26**

4.1 Χημειομετρική προσέγγιση στη μελέτη των τεχνικών μικροεκχύλισης	26
4.2 Έπιλογή του πειραματικού μοντέλου	27
4.2.1 $2^k$ παραγοντικά πειράματα	27
4.2.2 Πλήρες παραγοντικό μοντέλο τριών επιπέδων	27
4.2.3 Μοντέλο Doehlert	27
4.2.4 Μοντέλο Box-Behnken ( <i>BBD</i> )	28
4.2.5 Μοντέλο Plackett-Burman	28
4.2.6 Central Composite Design ( <i>CCD</i> )	29
4.3. Ανάλυση του μοντέλου και εκτίμηση των επιδράσεων - Pareto chart	29

## **Σκοπός της μελέτης** **30**

## **B. Πειραματικό μέρος** **32**

## **Κεφάλαιο 5** **32**

Υλικά και μέθοδοι	32
5.1 Υλικά	32
5.1.1 Πρότυπες ουσίες και διαλύματα	32
5.1.2 Δείγματα μελιού	34
5.1.3 Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε	34
5.1.3.1 Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην προκατεργασία των δειγμάτων	34
5.1.3.2 Σύστημα χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων	35
5.2 Μέθοδοι	35
5.2.1 Φορτίσεις των δειγμάτων	35
5.2.2 Διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων με <i>HS-SDME</i>	35
5.2.3 Διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων με <i>LLE</i> ( <i>υγρού-υγρού</i> )	36
5.2.4 Διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων με <i>SDME</i>	36
5.2.5 Προσδιορισμός στο σύστημα ανίχνευσης δέσμευσης ηλεκτρονίων ( <i>μECD</i> )	37
5.3 Παραγοντικά πειράματα βελτιστοποίησης της εκχύλισης <i>HS-SDME</i>	37

---

Αποτελέσματα και συζήτηση	39
6.1 Επιλογή του διαλύτη και του όγκου σταγόνας διαλύτη (δέκτη, acceptor)	39
6.2 Χρόνος έκθεσης	40
6.3 Επιλογή και βελτιστοποίηση των σημαντικότερων παραμέτρων στον <i>HS-SDME</i> προσδιορισμό που επιλέχτηκε να μελετηθεί, με τη χρήση παραγοντικών πειραμάτων	41
6.4 Βελτιστοποίηση των παραγόντων που βρέθηκε να επηρεάζουν σημαντικά τον <i>HS-SDME</i> προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων στο μέλι με την εφαρμογή	45
6.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου <i>HS-SDME</i> που αναπτύχθηκε	48
6.6 Εφαρμογή της <i>HS-SDME</i> σε πραγματικά δείγματα μελιού	50

## Βιβλιογραφία



## Ευχαριστίες

Μετά την ολοκλήρωση της παρούσας μελέτης αισθάνομαι την υποχρέωση να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου, κ. Τσιρόπουλο Νικόλαο, Αναπληρωτή καθηγητή και διευθυντή του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας του τμήματος Γεωπονία, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την ευκαιρία που μου έδωσε να παραγματοποιήσω τη διπλωματική μου διατριβή στο εργαστήριό του και να ασχοληθώ με το συγκεκριμένο θέμα, την πολύτιμη βοήθεια που μου πρόσφερε κατά τη διεξαγωγή της μελέτης και των μετρήσεων, καθώς επίσης για το χρόνο που μου αφιέρωσε για τη διόρθωση του γραπτού κειμένου.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω προς την κα. Αμβράζη Ελπινίκη, Χημικό (MSc, PhD), Επιστημονικό συνεργάτη στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας και Γεωργικής Φαρμακολογίας του τμήματος Γεωπονία, Φυτικής Παραγωγής και Αγροτικού Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή του πειραματικού μέρους της μελέτης και για τις χρήσιμες υποδείξεις της κατά τη συγγραφή της διπλωματικής, καθώς επίσης και για τις διορθώσεις του παρόντος κειμένου.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τους γονείς μου και τον αδελφό μου για την πολύτιμη υποστήριξη και κατανόησή τους σε κάθε μου προσπάθεια.

## Κατάταξη πινάκων

**Πίνακας 1.1** Κτηνιατρικά φάρμακα στη μελισσοκομία και σταθερότητα υπολειμμάτων στο μέλι (σελ. 2)

Εχθρός ή ασθένεια	Σκεύασμα	Δραστική Ουσία	Χρόνος που παραμένει αδιάσπαστο στο μέλι
<b>Βαρρόα</b>	Mavrik Apistan	Fluvalinate $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$ Πυρεθροειδές Εντομοκτόνο Ακαρεοκτόνο	Αρκετά σταθερό. Τουλάχιστο 18 μήνες.
	Asunthol, Περιζιν	Coumarphos, $C_{14}H_{16}ClO_5PS$ Οργανοφωσφορικό Ακαρεοκτόνο	Τουλάχιστο για 13 μήνες
	Folbex-VA	Bromopropylate, $C_{17}H_{16}Br_2O_3$ , Ακαρεοκτόνο	Τουλάχιστο για 11 μήνες
	Malathion	Malathion $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ Οργανοφωσφορικό Εντομοκτόνο Ακαρεοκτόνο	3 μήνες
	Vaprozin Tactic	Amitraz $C_{19}H_{23}N_3$ Εντομοκτόνο Ακαρεοκτόνο	1 μήνα
<b>Αμερικάνικη Σηψιγονία</b>	Oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$ Αντιβιοτικό Οξυτετρακυκλίνη	2,5 μήνες
	Σουλφαθαζόλη	$C_9H_9N_3O_2S_2$ Αντιμικροβιακό	Τουλάχιστο 12 μήνες
<b>Νοσεμίαση</b>	Foumindil-B	$C_{26}H_{34}O_7$ Bicyclohexylammonium Fumagilli Παρασιτοκτόνο	Τουλάχιστο 12 μήνες

**Πίνακας 2.1** Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των εντομοκτόνων\* (σελ.6)

No	Ομάδα
1.	<p>Οργανοφωσφορικά</p> <p>α. Μη διασυστηματικά (παραμένουν στην εξωτερική επιφάνεια των φυτικών ιστών ή έχουν και μικρή διεισδυτική ικανότητα) (<i>azinphos-methyl, chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl*, diazinon*, dichlorvos*, ethion, fenitrothion, fenthion*, malathion*, mecarbam, methidathion, parathion*, parathion methyl*, phosalone, phosmet*, pirimiphos methyl, quinalphos, triazophos</i> κ.α.) (*=παρουσιάζουν δράση ατμών)</p> <p>β. Διασυστηματικά (Διεισδύουν στο εσωτερικό των φυτικών οργάνων και μέσω των ηθμωδών αγγείων μεταφέρονται και διαχέονται μέσα στους φυτικούς ιστούς) (<i>acephate, demeton-S-methyl, dimethoate, disulfoton, fenamiphos, formothion, heptenophos, methanidophos, monochrotophos, omethoate, phorate, phosmamidon, terbufos, thometon, vamidothion</i>)</p>
2.	Οργανοχλωριωμένα ( <i>lindane</i> (ή $\gamma$ -HCH) αποκλειστικά για εφαρμογή στο έδαφος πριν τη σπορά και <i>endosulfan</i> )
3.	Καρβαμιδικά ( <i>aldicarb, butocarboxim, carbaryl, carbofuran, carbosulfan, fenoxycarb, fyrathiocarb, methomyl, oxanyl, pirimicarb, thiodicarb, thiofanox</i> κ.α.)
4.	Συνθετικές Πυρεθρίνες ή Πυρεθροειδή ( $\alpha$ - <i>cypermethrin, bifethrin, bioresmethrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, esfenvalerate, fenvalerate, λ-cyhalothrin, permethrin, ζ-cypermethrin</i> )
5.	Παράγωγα βενζοϋλουρίας ( <i>diflubenzuron, teflubenzuron, triflumuron</i> )
6.	Εντομοκτόνα διαφόρων χημικών ομάδων ( <i>abamectin, buprofezin, cyromazine, imidachloprid</i> )
7.	Πολτοί: είναι γαλακτώματα ή γαλακτωματοποιήσιμα σκευάσματα ελαίων, συνήθως ορυκτελαίου, παραφινελαίου τα οποία χρησιμοποιούνται για ψεκασμούς κατά τη βλαστική περίοδο (θερινοί πολτοί) εναντίων κοκκοειδών αυγών εντόμων και ακάρεων κ.λ.π. ή στα φυλλοβόλα δέντρα κατά την περίοδο του ληθάργου (χειμερινοί πολτοί).
8.	Υποκαπνιστικά ( <i>aluminium phosphide, dazomet, 1-3 dichloropropene</i> κ.α.)
9.	Βιολογικά εντομοκτόνα ( <i>Bacillus thuringiensis subsp.Kurstaki</i> )

\*(Ως εντομοκτόνα ορίζονται τα παρασιτοκτόνα που δρουν εναντίον των εντόμων)

**Πίνακας 2.2** Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των ζιζανιοκτόνων (σελ.6)

No	Ομάδα
1.	<p>Εκλεκτικά αγρωστώδη (Γνωστά και ως παρεμποδιστές της καρβοξυλάσης του ακετυλο-συνενζύμου Α ή αναστολείς της σύνθεσης λιπαρών οξέων)</p> <p>α. Αρυλοξυφαινοξυ-προπιονικά (<i>clodinafop, diclofop, fenoxaprop, fluazifop</i> κ.α.)</p> <p>β. Παράγωγα κυκλοεξανοδιόνης (<i>sethoxydim, tralkoxydim</i>)</p>
2.	<p>Παρεμποδιστές της οξεικογαλακτικής συνθετάσης (ALS)</p> <p>α. Σουλφονυλουρίες (<i>bensulfuron, chlorsulfuron, nicosulfuron, primisulfuron</i> κ.α.)</p> <p>β. Ιμιδαζολινόνες (<i>imazamethabenz, imazapyr</i>)</p> <p>γ. Τριαζοπυρμιδίνες (<i>cloransulan, flumetsulan</i>)</p>
3.	<p>Ορμονικά ζιζανιοκτόνα</p> <p>α. Φαινοξυ-αλκανοϊκά παράγωγα (<i>2,4-D, MCPA, dichlorprop, mecoprop</i>)</p> <p>β. Παράγωγα βενζοϊκού οξέος (<i>dicamba</i>)</p> <p>γ. Παράγωγα πικονιλικού οξέος (<i>chlorpyralid, triclopyr</i>)</p>
4.	Δινιτροανιλίνες ( <i>benfluralin, dinitramine, ethalfuralin, pendimethalin, triflurakin</i> )
5.	<p>Τριαζίνες (Αναστολείς φωτοσύνθεσης)</p> <p>α. Συμμετρικές Τριαζίνες (<i>atrazine, cyanazine, simazine, prometryn</i> κ.α.)</p> <p>β. Ασύμμετρες Τριαζίνες (<i>metamitron, metribuzin</i>)</p>
6.	Παράγωγα φαινυλουρίας ( <i>diuron, fluometuron, isoproturon, linuron, monolinuron</i> )
7.	Ουρακίλες (Αναστολείς φωτοσύνθεσης) ( <i>bromacil, lenacil, terbacil</i> )
8.	<p>Καρβαμιδικά</p> <p>α. Φαινυλοκαρβαμιδικά (<i>desmediphan, phenmedipham</i>)</p> <p>β. Θειοκαρβαμιδικά (<i>cycloate, EPTC, molinate, pebulate, thiobencarb, triallate</i>)</p>
9.	<p>Αμίδια</p> <p>α. Χλωροακεταμίδια (<i>alachlor, metachlor, predilachlor, propachlor</i>)</p> <p>β. Άλλα αμίδια (<i>napropamide, propyzamide, naptalam, tebutam</i>)</p>

## Συνέχεια του Πίνακα 2.2

No	Ομάδα
10.	Διπυριδύλια ( <i>difenzoquat, diquat, paraquat</i> )
11.	Νιτρύλια (Αναστολείς φωτοσύνθεσης) ( <i>dichlobenil, bromoxynil, ioxynil</i> )
12.	Διάφορα: <i>ethofumesate, oxadiazon, oxyfluorfen, bentazone, pyridate, quinclorac, amitrole, glyphosate, trimesium, glufosinate, chlorthal dimethyl-DCPA</i>

\*(Ως ζιζανιοκτόνα ορίζονται τα παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταστροφή ή τον περιορισμό των ανεπιθύμητων που ανταγωνίζονται τα καλλιεγούμενα φυτά, των ζιζανίων)

## Πίνακας 2.3 Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των μυκητοκτόνων \* (σελ.7)

No	Ομάδα
1.	Ανόργανα (θείο, χαλκός, χαλκός βορδονγάλιος, χαλκός οξικινολικός, χαλκός οξυχλωριούχος, χαλκός βουργούνδιος κ.α.)
2.	Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες ( <i>chloroneb, ethazole, quinzoxene-PCNP</i> κ.α.)
3.	Βενζαμίδια
4.	Βενζιμιδαζόλια
5.	Βενζοντρίλια
6.	Καρβαμιδικά, Καρβαμιδικά Ακετανιλίδια, Καρβαμιδικά Φαινυλαμίδια
7.	Αναστολείς διμεθυλίωσης (Dimethylation Inhibitors-DMI) ( <i>cyproconazole, fenarimol, cyclobutamil, prociconazole, tridimefon</i> )
8.	Δικαρβοξιμίδια ( <i>iprodione, vincosolin, procymidone</i> )
9.	Οργανοφωσφορικά ( <i>fozetyl</i> )
10.	Διθειοκαρβαμιδικά ( <i>mancozeb, maneb, thiram, zineb</i> κ.α.)
11	Στρομπιλουρίνες

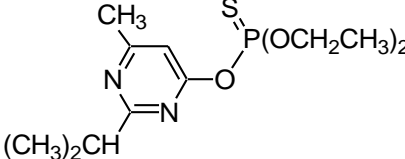
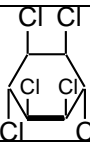
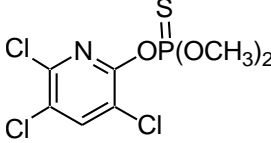
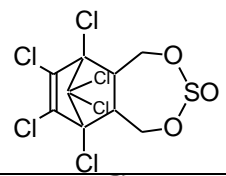
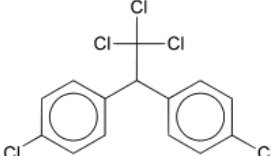
\*(Ως μυκητοκτόνα ορίζονται τα παρασιτοκτόνα που δρουν εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων και ιογενών ασθενειών των φυτών)

## Πίνακας 2.4 Κατηγορίες τοξικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων με βάση την LD<sub>50</sub> οξείας τοξικότητας σε επίμυες σύμφωνα με τους Κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης (σελ. 8)

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΣΤΟΜΑΤΟΣ (mg/Kg Z.B*)	ΔΕΡΜΑΤΟΣ (mg/Kg Z.B)	ΑΝΑΠΝΟΗΣ (mg/L αέρα)
Στερεά εκτός από δολώματα και δισκία			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	0-5	0-10	-
II (ΤΟΞΙΚΑ)	5-50	10-100	-
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	50-500	100-1000	-
Υγρά, δολώματα και δισκία			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	0-25	0-50	-
II (ΤΟΞΙΚΑ)	25-200	50-400	-
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	200-2000	400-4000	-
Αεροκαλύματα, καπνογόνα και πολύ λεπτές σκόνες επιπάσεως (διαμ<50μ)			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	-	-	0,0-0,5
II (ΤΟΞΙΚΑ)	-	-	0,5-2,0
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	-	-	2,0-20,2

- Ζων Βάρος πειραματόζωου
- Πηγή: ΜΑΥΡΟΜΑΝΩΛΑΚΗΣ ΚΩΣΤΑΣ, 2007<sup>1</sup>

**Πίνακας 5.1 :** Φυτοφάρμακα που αναλύθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους (σελ.33)

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>Χημική δομή</i>	<i>Χημική ομάδα/Χρήση</i>	<i>Βιολογικός τρόπος δράσης</i>	<i>Vapour Pressure (mPa)</i>	<i>Διαλυτότητα στο νερό (mg/L)</i>	<i>Log K<sub>ow</sub></i>
<b>Diazinon</b> (M.B. 304.3)		εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, οργανοφωσφορικό	Αναστέλλει την χολινεστεράση Συστηματικό εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο με επαφή και στομαχική δράση	1.2 $\times 10^1$ mPa (25 °C)	60 mg/l (20 °C)	3.30
<b>Lindane</b> (M.B. 290.8)		οργανοχλωριωμένο, εντομοκτόνο	Εντομοκτόνο μέσω επαφής, στομαχιού και αναπνευστικής οδού	4.4 mPa (24 °C)	8.52 (25 °C), 8.35 (pH 5, 25 °C) (και τα δύο mg/l)	3.5
<b>Chlorpyrifos methyl</b> (M. B. 322.5)		Ακαρεοκτόνο οργανοφωσφορικό	Αναστολέας χολινεστεράσης Δράση μέσω επαφής, στομαχικής και αναπνευστικής οδού	3 mPa (25 °C)	2.6 (20 °C)	4.24
<b>endosulfan</b> (α-endosulfan και β- endosulfan) (M.B. 406.9)		Ακαρεοκτόνο, Εντομοκτόνο, οργανοχλωριωμένο	Ανταγωνιστές του GABA	0.83 mPa (20 °C) για 2:1 μίγμα από α- and β- ισομερή	α-endosulfan 0.32, β-endosulfan 0.33 (και τα δύο στους 22 °C)	α- = 4.74 β- = 4.79 (και τα δύο σε pH 5)
<b>DDE 4-4</b> (M. B 354.49)						

**Πίνακας 5.2** Εμπορικά δείγματα μελιού (σελ.34)

Αριθμός	Είδος
1.	Μέλι Ανθέων
2.	Μέλι από άνθη πορτοκαλιάς
3.	Μέλι από άνθη ευκάλυπτου
4.	Κωνοφόρα και Άνθη
5.	Μέλι Ανθέων

**Πίνακας 6.1** Plackett-Burman Design (σελ. 41)

	T (°C)	NaCl (w/v)	V ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ (ml)	V ΔΡΑΙΩΣΗΣ (ml)	T SON (min)	ΣΤΡΟΦΕΣ (rpm)	ΔΕΙΚΤΗΣ/DUM
1.	60	0	4	4	30	600	-1
2.	40	0	2	10	30	1000	-1
3.	60	0	2	4	0	1000	1
4. (C)	50	20	3	7	15	800	0
5.	40	0	4	10	0	600	1
6.	40	40	2	4	30	600	1
7.	60	40	4	4	0	600	1
8. (C)	50	20	3	7	15	800	0
9.	60	0	4	10	0	1000	-1
10. (C)	50	20	3	7	15	800	0
11.	60	40	2	10	0	600	-1
12.	40	40	4	4	0	1000	-1
13.	60	40	2	4	30	1000	-1
14.	40	0	2	4	0	600	-1
15.	40	0	4	4	30	1000	1
16.	40	40	4	10	30	600	-1
17.	40	40	2	10	0	1000	1
18. (C)	50	20	3	7	15	800	0
19.	60	40	4	10	30	1000	0
20.	60	0	2	10	30	600	0

(C) = υποδηλώνει τα πειράματα στο κεντρικό σημείο των παραγόντων που μελετήθηκαν

**Πίνακας 6.2** Πειραματικός σχεδιασμός *Central Composite Design (CCD)* που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των τιμών της θερμοκρασίας εκχύλισης και του όγκου του υδατικού διαλύματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα ανηγμένα εμβαδά (εμβαδό κορυφής φυτοφαρμάκου/εμβαδό εσωτερικού προτύπου) των χρωματογραφικών κορυφών από την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC-μECD) (σελ.46)

	<b>T (°C)</b>	<b>Vdonor (ml)</b>	<b>diazinon</b>	<b>lindane</b>	<b>chlorpyrifos methyl</b>	<b>α-endosulfan</b>	<b>DDE 4-4</b>	<b>β-endosulfan</b>
1.	50	1,3	0,000	0,006	0,047	0,034	0,014	0,023
2.	55	1,5	0,008	0,019	0,004	0,068	0,006	0,016
3.	55	2,5	0,015	0,049	0,003	0,101	0,007	0,018
4.	50 (c)	2(c)	0,002	0,019	0,004	0,034	0,004	0,004
5.	43	2	0,024	0,118	0,031	0,150	0,017	0,014
6.	50 (c)	2	0,013	0,066	0,007	0,120	0,014	0,020
7.	45	1,5	0,000	0,000	0,000	0,109	0,017	0,077
8.	57	2	0,002	0,012	0,005	0,041	0,004	0,013
9.	50	2,7	0,009	0,046	0,001	0,062	0,005	0,009
10.	45	2,5	0,031	0,132	0,069	0,149	0,017	0,078

( C ) = υποδηλώνει τα πειράματα στο κεντρικό σημείο των παραγόντων που μελετήθηκαν

**Πίνακας 6.3** Βασικά αναλυτικά χαρακτηριστικά της *HS-SDME* μεθόδου που αναπτύχθηκε και συγκριτικά στοιχεία των ορίων ανίχνευσης (LOD  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) και ποσοτικοποίησης (LOQ  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) τριών αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού, της *HS-SDME* που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, της (σελ.48)

Δραστική ουσία	MRL ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	SDME		LLE		HS-SDME			
		LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOD ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	Περιοχή Γραμμικότητας ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	R <sup>2</sup>
diazinon	δ.ο.	2,4	7,6	19,31	57,9	0,19	0,57	10-200	0,993
lindane	δ.ο.	0,05	0,2	1,73	5,2	0,44	1,33	2.5-25	0,995
chlorpyrifos methyl	δ.ο.	0,2	0,7	4,50	13,5	12,54	37,62	50-200	0,973
$\alpha$ -endosulfan	10*	0,06	0,2	0,32	0,9	0,13	0,38	2.5-50	0,997
DDE 4-4	50*	-	-	10,00	33,0	0,07	0,20	1.25-25	0,995
$\beta$ -endosulfan	10*	0,04	0,1	0,09	0,3	5,57	16,71	25-200	0,990

- = δεν προσδιορίστηκε αναλυτικά, δ.ο. = δεν έχει οριστεί.

**Πίνακας 6.4** Σχετικές ανακτήσεις και % σχετικές τυπικές αποκλίσεις όπως υπολογίστηκαν από την εκχύλιση εμβολιασμένων δειγμάτων μελιού σε διάφορες συγκεντρώσεις με την *HS-SDME* μέθοδο που αναπτύχθηκε (σελ.48)

Δραστική ουσία	Φόρτιση $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Σχετική			Σχετική			Σχετική		
		Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Φόρτιση $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	Φόρτιση $\mu\text{g}/\text{Kg}$	Ανάκτηση (%)	RSD (%)	
diazinon	50	74,50	16,2	100	91,34	15,7	200	71,47	15,60	
lindane	6	80,90	19,4	12	80,73	18,1	25	110,29	18,60	
chlorpyrifos methyl	25	*	*	50	86,01	12,4	100	85,63	11,80	
$\alpha$ - endosulfan	12,5	77,48	15,4	25	106,45	13,4	50	71,56	12,30	
DDE 4-4	6	102,00	10,1	12	92,40	11,1	25	79,78	10,40	
$\beta$ -endosulfan	12,5	*	*	25	115,17	18,2	50	73,43	16,80	

\* = κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου



**Πίνακας 6.5** Αποτελέσματα μετρήσεων σε πέντε πραγματικά δείγματα μελιού με τρεις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης: την *HS-SDME* που αναπτύχθηκε, την εκχύλιση *SDME* που προτάθηκε από τους Tsiropoulos and Amvrazi 2010 (In press) και την *LLE* που προτάθηκε από τους Blasco et al. 2004 (σελ. 50)

Δραστική Ουσία	Μέθοδος εκχύλισης	Δείγμα					LOQ (µg/kg)	MRLs (µg/kg)
		1	2	3	4	5		
<b>diazinon</b>	<b>HS-SDME</b>	12.2	δ.π.	6.9	δ.π.	δ.π.	0.6	δ.ο.
	<b>SDME</b>	13	δ.π.	*	δ.π.	δ.π.	7.6	
	<b>LLE</b>	*	δ.π.	*	δ.π.	δ.π.	57.9	
<b>lindane</b>	<b>HS-SDME</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	1.3	δ.ο.
	<b>SDME</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.2	
	<b>LLE</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	5.2	
<b>chlorpyrifos methyl</b>	<b>HS-SDME</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	37.6	δ.ο.
	<b>SDME</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.7	
	<b>LLE</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	13.5	
<b>α-endosulfan</b>	<b>HS-SDME</b>	*	*	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.4	10*
	<b>SDME</b>	0.23	*	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.2	
	<b>LLE</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.9	
<b>DDE 4-4</b>	<b>HS-SDME</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.2	
	<b>SDME</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	-	
	<b>LLE</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	33	
<b>β-endosulfan</b>	<b>HS-SDME</b>	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	16.7	10*
	<b>SDME</b>	0.33	*	0.15	δ.π.	δ.π.	0.1	
	<b>LLE</b>	0.5	δ.π.	*	δ.π.	δ.π.	0.3	

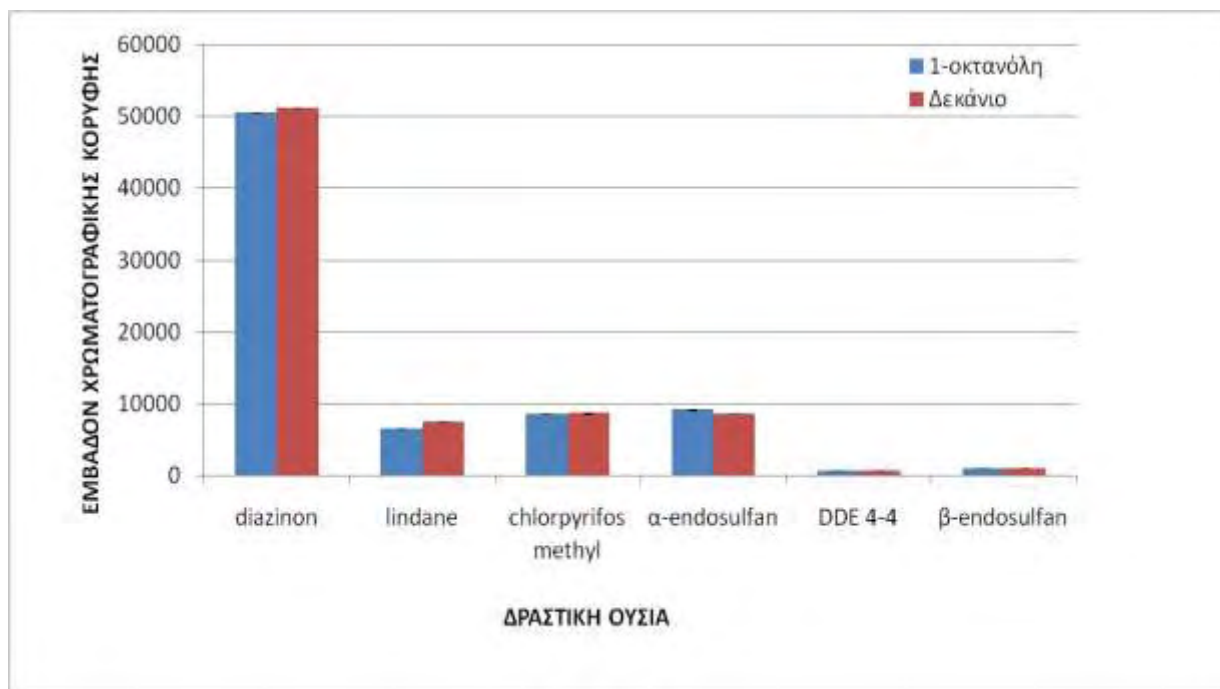
\* = κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου

δ.π. = δεν προσδιορίστηκε (<LOD)

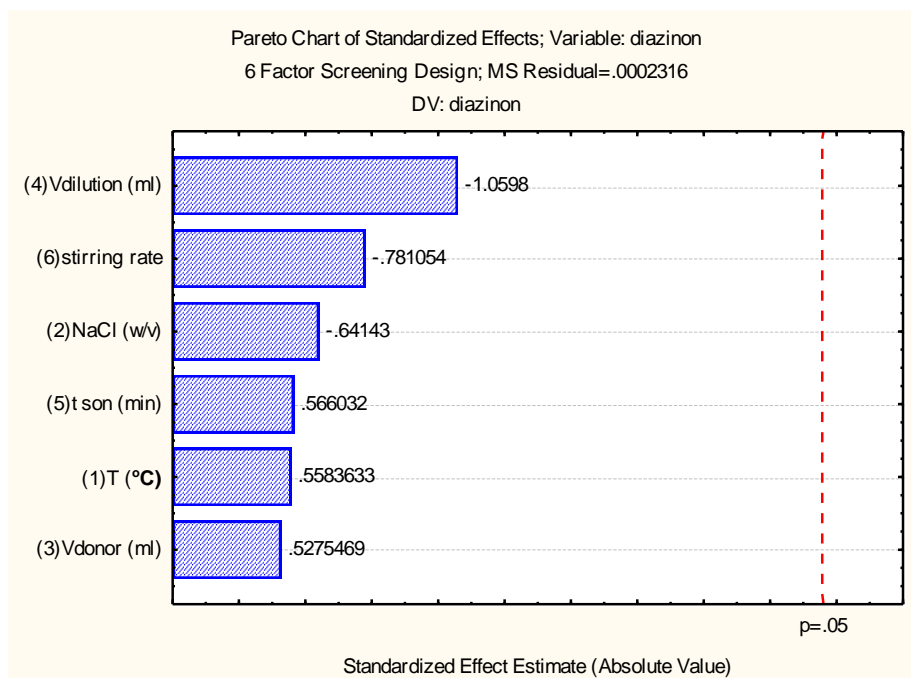
- = δεν προσδιορίστηκε αναλυτικά

δ.ο. = δεν έχει οριστεί.

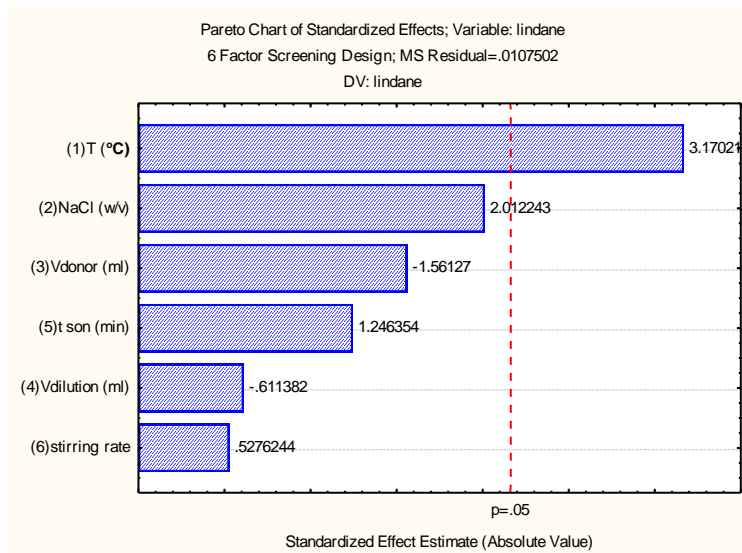
## Κατάταξη Διαγραμμάτων



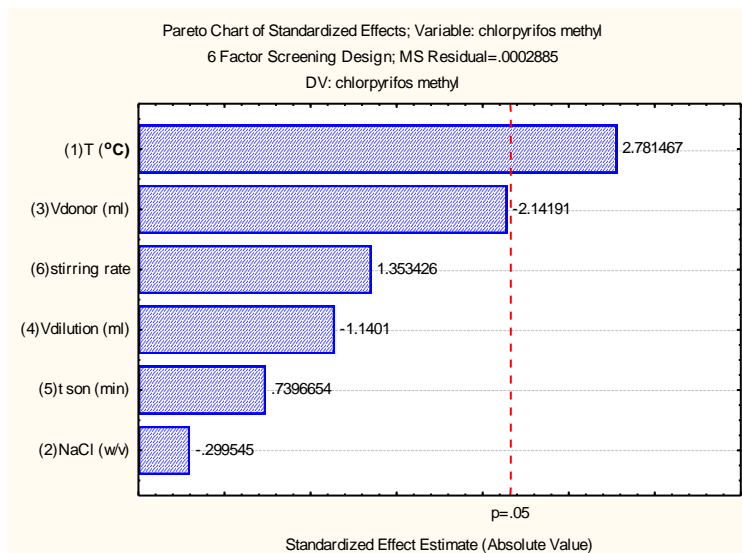
**Διάγραμμα 6.1.** Σύγκριση των μέσων εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών των έξι δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν όπως υπολογίστηκαν μετά από την HS-SDME εκχύλισή τους με σταγόνα 1-οκτανόλης και δεκάνιου (σελ.39)



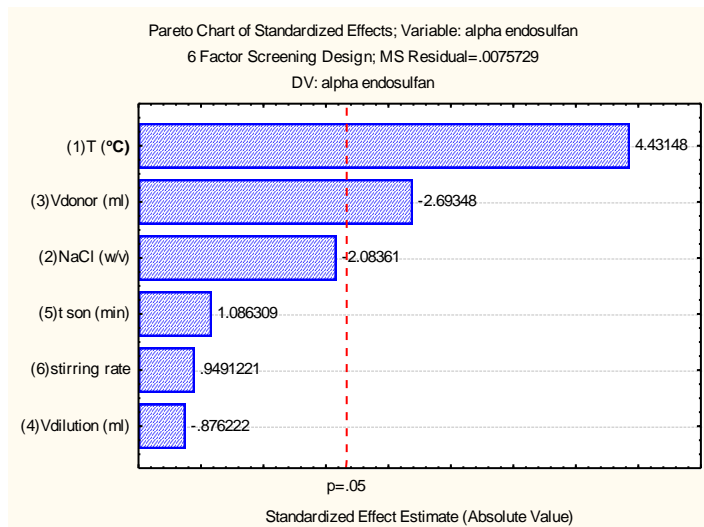
**Διάγραμμα 6.2** Pareto για το Diazinon (σελ.42)



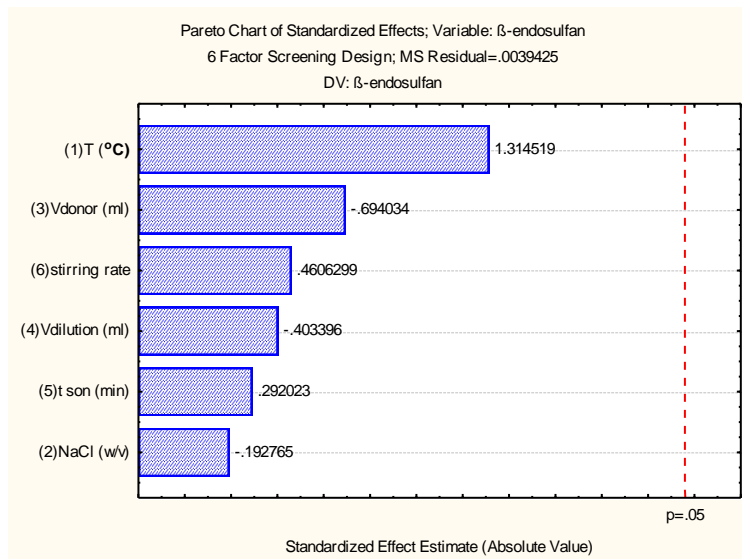
**Διάγραμμα 6.3 Pareto για το Lindane (σελ. 43)**



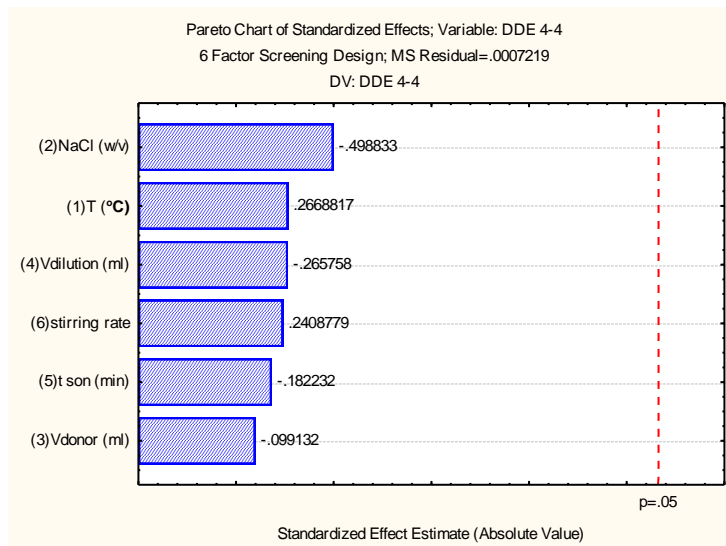
**Διάγραμμα 6.4 Pareto για το Chlorpyrifos methyl (σελ. 43)**



**Διάγραμμα 6.5 Pareto για το α-endosulfan (σελ. 43)**



**Διάγραμμα 6.6** Pareto για το  $\beta$ -endosulfan (σελ. 44)



**Διάγραμμα 6.7** Pareto για το DDE 4-4 (σελ. 44)

# Κεφάλαιο 1

## 1.1 Η παραγωγή ποιοτικού μελιού και επεμβάσεις που υποβαθμίζουν την ποιότητά του

Το ποιοτικά άριστο μέλι παράγεται από τις μέλισσες, σύμφωνα με τους κανόνες της ορθής μελισσοκομικής πρακτικής, αβίαστα και φυσικά, τρυγιέται από τους μελισσοκόμους με προσοχή και επιμέλεια, συσκευάζεται σε κατάλληλες εγκαταστάσεις με τις ορθές συνθήκες και διατίθεται σε σωστή και ελκυστική συσκευασία. Εάν δεχτούμε ότι το μέλι που παράγουν οι μέλισσες με σωστούς χειρισμούς και φυσικό τρόπο είναι άριστο, θα πρέπει παράλληλα να δεχτούμε ότι το προϊόν αυτό δεν χρειάζεται βελτίωση, αλλά αντίθετα απαιτεί προστασία από παράγοντες και συνθήκες που πιθανόν να επηρεάσουν δυσμενώς την ήδη υψηλή του ποιοτική αξία (Θρασυβούλου, 2003<sup>3</sup>).

Μελισσοκομικοί χειρισμοί που έχουν αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα του μελιού μπορεί να γίνουν πριν, κατά ή μετά τον τρύγο. Ο μελισσοκόμος, στην προσπάθειά του να προστατεύσει τις μέλισσές του από διάφορες ασθένειες και εχθρούς, χρησιμοποιεί μέσα στην κυψέλη χημικά σκευάσματα (φάρμακα). Επίσης, για να ενισχύσει την ανάπτυξη των μελισσιών του τα τροφοδοτεί. Με τον όρο τροφοδότηση εννοούμε την παροχή τροφής στις μέλισσες για την εξασφάλιση θρεπτικών ουσιών (πρωτεϊνών, βιταμινών, ιχνοστοιχείων κ.ά.), αλλά ερεθισμάτων για τις διάφορες δραστηριότητες τους, όπως η εκτροφή γόνου, η έκκριση βασιλικού πολτού, η συλλογή γύρης, το κτίσιμο κηρηθρών. Οι επεμβάσεις αυτές, όταν γίνουν σωστά επηρεάζουν ελάχιστα ή καθόλου την ποιότητα του προϊόντος. Η λανθασμένη όμως και άσκοπη χρήση φαρμάκων καθώς επίσης και η άκαιρη τροφοδότηση των μελισσών υποβαθμίζουν σημαντικά το παραγόμενο μέλι (Θρασυβούλου, 2003<sup>2</sup>).

Δύο είναι οι τρόποι ρύπανσης του μελιού από τις διάφορες δραστικές ουσίες. Ο πρώτος είναι ο **άμεσος τρόπος**, που είναι ο πιο επίφοβος και αφορά στα κτηνιατρικά φάρμακα (αντιβιοτικά και παρασιτοκτόνα) που χρησιμοποιεί εντός της κυψέλης ο ίδιος ο μελισσοκόμος. Ο δεύτερος, ο **έμμεσος τρόπος**, έγκειται στη μεταφορά των διαφόρων φυτοπροστατευτικών και μη ουσιών από το περιβάλλον από τις ίδιες τις μέλισσες κατά τη συλλογή νέκταρος, μελιττώματος, νερού και γύρης (Καραζαφείρης<sup>14</sup>).

Το γενικότερο συμπέρασμα είναι ότι οι συγκεντρώσεις των ουσιών παρασιτοκτόνου δράσης που εισέρχονται στην κυψέλη από τον αγρό και το περιβάλλον, είναι συνήθως πολύ μικρότερες από αυτές που εισρέουν με τα κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για τις διάφορες ασθένειες και εχθρούς των μελισσών. Αυτός είναι ο λόγος που ο κύριος όγκος του ερευνητικού ενδιαφέροντος στη Μελισσοκομία –ιδίως στο μέλι– επικεντρώνεται στα κατάλοιπα των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται από τους ίδιους τους μελισσοκόμους. Η άμεση επιβάρυνση των προϊόντων της κυψέλης με κατάλοιπα, γίνεται με τη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων εντός αυτής, προκειμένου να αντιμετωπισθούν οι διάφορες ασθένειες που προσβάλλουν τις μέλισσες ή και εχθροί των μελισσών. Η σημαντικότερη κατηγορία σκευασμάτων που χρησιμοποιείται είναι τα ακαρεοκτόνα, καθώς το ακάρι *Barróa* είναι ο κυρίαρχος εχθρός της μέλισσας. Για την καταπολέμηση του χρησιμοποιούνται τόσο χημικά σκευάσματα όσο και φυσικές ουσίες (Καραζαφείρης<sup>14</sup>).

Όσον αφορά τα παρασιτοκτόνα που προέρχονται από τις καλλιέργειες, οι σημαντικότερες φυτοπροστατευτικές ουσίες που έχουν ανιχνευτεί κυρίως στο μέλι αλλά και σε προϊόντα κυψέλης, είναι οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, τα οργανοφωσφορικά, τα οργανοχλωρικά,

καρβαμιδικά και νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, καθώς και κάποια μυκητοκτόνα. (Tsipi et al, 1999, Blasco et al. 2004, Blasco et al. 2003, Wilczynska and Przybylowski 2007, Balayiannis G. and Balayiannis P. 2008). Στην έρευνα που έκαναν οι Balayiannis G. and P, από τα πενήντα δείγματα μελιού που αναλύθηκαν σε διάφορες αγροτικές περιοχές στην Ελλάδα, βρέθηκαν ποσότητες φυτοπροστατευτικών ουσιών στο μέλι, κυρίως *chlorfenvinphos*, *chlorpyrifos*, *phorate*. Επίσης, βρέθηκε *coumaphos*, το οποίο είναι ένα εντομοκτόνο που χρησιμοποιεί ο ίδιος ο μελισσοκόμος εντός της κυψέλης για την καταπολέμηση της ασθένειας *Βαρρόα*.

## 1.2 Κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται μέσα στην κυψέλη

Οι κυριότεροι εχθροί και ασθένειες των μελισσών και τα αντίστοιχα φάρμακα που χρησιμοποιούνται εντός της κυψέλης από τους μελισσοκόμους δίνονται στον **Πίνακα 1.1**

**Πίνακας 1.1** Κτηνιατρικά φάρμακα στη μελισσοκομία και σταθερότητα καταλοίπων στο μέλι

Εχθρός ή ασθένεια	Σκεύασμα	Δραστική Ουσία	Χρόνος που παραμένει αδιάσπαστο στο μέλι
<b>Βαρρόα</b>	Mavrik Apistan	Fluvalinate $C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$ Πυρεθροειδές Εντομοκτόνο Ακαρεοκτόνο	Αρκετά σταθερό. Τουλάχιστο 18 μήνες
	Asunthol, Περιζιν	Coumaphos, $C_{14}H_{16}ClO_5PS$ Οργανοφωσφορικό Ακαρεοκτόνο	Τουλάχιστο για 13 μήνες
	Folbex-VA	Bromopropylate, $C_{17}H_{16}Br_2O_3$ , Ακαρεοκτόνο	Τουλάχιστο για 11 μήνες
	Malathion	Malathion $C_{10}H_{19}O_6PS_2$ Οργανοφωσφορικό Εντομοκτόνο Ακαρεοκτόνο	3 μήνες
	Vaprozin Tactic	Amitraz $C_{19}H_{23}N_3$ Εντομοκτόνο Ακαρεοκτόνο	1 μήνα
<b>Αμερικάνικη Σηψιγονία</b>	Oxytetracycline	$C_{22}H_{24}N_2O_9$ Αντιβιοτικό Οξυτετρακυκλίνη	2,5 μήνες
	Σουλφαθιαζόλη	$C_9H_9N_3O_2S_2$ Αντιμικροβιακό	Τουλάχιστο 12 μήνες
<b>Νοσεμίαση</b>	Foumindil-B	$C_{26}H_{34}O_7$ Bicyclohexylammonium Fumagilli Παρασιτοκτόνο	Τουλάχιστο 12 μήνες

Πηγή: Θρασυβούλου Ανδρέας, «Τεχνολογία προϊόντων μέλισσας», 2003<sup>3</sup>

Το πρόβλημα των καταλοίπων των ακαρεοκτόνων ουσιών στο μέλι είναι υπαρκτό, όπως υπαρκτό είναι και το πρόβλημα των διαφόρων ασθενειών-εχθρών των μελισσών. Εκτός της

ορθολογικής και σωστής χρήσης των ακαρεοκτόνων. Αρκετοί μελισσοκόμοι τάσσονται εναντίον της χρήσης χημικών φαρμάκων μέσα στη κυψέλη και αναζητούν εναλλακτικές λύσεις αντιμετώπισης των ασθενειών.

### 1.3 Επίδραση του χώρου και των μέσων του τρύγου στην ποιότητα του μελιού

Το μέλι εύκολα απορροφά υγρασία και οσμές από το περιβάλλον. Η σχολαστική καθαριότητα των συσκευών και σκευών που χρησιμοποιεί ο μελισσοκόμος για τη συλλογή, και διατήρηση του μελιού, συμβάλλουν σημαντικά στον περιορισμό της επιμόλυνσης του μελιού με ζυμομύκητες. Περιορίζουν επίσης σημαντικά την πιθανότητα ενσωμάτωσης στο προϊόν των ανεπιθύμητων σπορίων του κλωστηριδίου της αλλαντίασης. Η αλλαντίαση ή αλλιώς ο βοτουλισμός, είναι μια παραλυτική ασθένεια που προκαλείται από μια οικογένεια νευροτοξινών, οι οποίες παράγονται από το μικρόβιο κλωστηρίδιο της αλλαντίασης ή λατινικά *Clostridium botulinum*. Οι τοξίνες της αλλαντίασης δρουν στις νευρικές απολήξεις και προκαλούν παράλυση μέσω της παρεμπόδισης της απελευθέρωσης των απαραίτητων νευροδιαβιβαστών. Η αλλαντίαση είναι συνήθως τροφογενής αρρώστια που προέρχεται κυρίως από τρόφιμα που διατηρούνται σε αναερόβιες συνθήκες, όπως για παράδειγμα κονσέρβες ή έχουν στον όγκο τους αναερόβια σημεία. Ο μόνος τρόπος εξουδετέρωσης της τοξίνης του μικροβίου είναι το βράσιμο και γι' αυτό δεν υπάρχει κίνδυνος δηλητηρίασης από νωπά τρόφιμα, διότι συνήθως τα βράζουμε καλά. Πιθανές πηγές σπόρων *Clostridium Botulinum* θεωρούνται το νέκτερ και η γύρη των ανθέων, αλλά και η μόλυνση του μελιού κατά το στάδιο της επεξεργασίας του. Τα σπόρια του *Clostridium botulinum*, κατά τη βλάστησή τους, δεν μπορούν να ωριμάσουν στο μέλι, λόγω των αντιβακτηριδιακών και αντιμικροβιακών ιδιοτήτων του. Στην πραγματικότητα όταν το μέλι ωριμάσει με περιεκτικότητα σε υγρασία κάτω από το 18% τίποτα βλαβερό για τους ανθρώπους δεν μπορεί να αναπτυχθεί σε αυτό. ( <http://www.melissokomos.gr/04012.html> , Mari Nevas 2006).

Ο τρύγος του μελιού θα πρέπει να γίνεται σε καθαρούς χώρους, με πλενόμενες επιφάνειες και δάπεδα, μακριά από οσμές, σκόνες και χρώματα. Θα πρέπει να καθαρίζονται με βραστό νερό και απορρυπαντικά κατάλληλα για σκεύη τροφίμων η μελισσοκομική βούρτσα, το μαχαίρι απολεπισμού, ο μελιτοεξαγωγέας, τα φίλτρα, τα δοχεία μεταφοράς και διατήρησης του μελιού και όλα τα μέσα ή σκεύη που χρησιμοποιούνται για τον τρύγο και τη συντήρηση του προϊόντος. Μετά το πλύσιμο τα σκεύη πρέπει να ξεπλένονται με άφθονο νερό και να στεγνώνουν καλά.

**Διαύγαση** είναι η διαδικασία κατά την οποία το μέλι, μετά τον τρύγο, αφήνεται για 24-48 ώρες να «ηρεμήσει» σε μεγάλα βαρέλια και θερμοκρασία περιβάλλοντος χώρου σχετικά υψηλή (30-35° C). Στο στάδιο αυτό της ηρεμίας, φυσαλίδες αέρα που έχουν ενσωματωθεί στη μάζα του μελιού μεταφέρονται στην επιφάνειά του, συμπαρασύροντας στερεά μόρια όπως είναι συσσωματώματα γύρης, μικρά κομμάτια από κερί, ξυλάκια, έντομα ή άλλα ξένα σώματα που πιθανό να έχουν πέσει σ' αυτό κατά τον τρύγο. Αποτέλεσμα της διαύγασης είναι ο σχηματισμός στρώματος αφρού στην επιφάνεια του μελιού. Το στρώμα αυτό πρέπει να αφαιρείται για τρεις κυρίως λόγους:

α) Στον αφρό υπάρχουν πολλά μικρά κομματάκια κεριού που έχουν υψηλές σχετικά συγκεντρώσεις υπολειμμάτων φαρμάκων ιδιαίτερα λιπόφιλων μορίων.

- β) Στον αφρό υπάρχει γύρη και άλλα στερεά μόρια, που όταν ενσωματωθούν στη μάζα του μελιού επιταχύνουν την κρυστάλλωσή του.
- γ) Ο αφρός μειώνει σημαντικά την εμφάνιση του προϊόντος.

#### ***1.4 Επεμβάσεις που γίνονται μετά τον τρύγο και μέχρι τη διάθεση του μελιού και υποβαθμίζουν την ποιότητά του, καθώς και κατά την αποθήκευση***

Αρκετοί παράγοντες όπως ο χώρος και οι συνθήκες αποθήκευσης, η θερμική επεξεργασία, οι αναμίξεις, τα βάζα συσκευασίας, η κρυστάλλωση και η ζύμωση μπορεί να επηρεάσουν την ποιότητα του προϊόντος.

Το μέλι πρέπει να αποθηκεύεται σε χώρους με θερμοκρασίες χαμηλές, προτιμότερο κάτω από 10 °C, χωρίς υγρασία και οσμές, σε δοχεία ερμητικά κλειστά.) Εάν η υγρασία του μελιού είναι μεγαλύτερη από 17%, πρέπει να θερμανθεί προσεκτικά στους 70° C για 5-10, πριν από την αποθήκευσή του, γιατί διαφορετικά κινδυνεύει να ξινίσει. Η θέρμανση αυτή είναι επίσης απαραίτητη σε δοχεία μελιού που κρυσταλλώνουν ανομοιόμορφα. Μέλια με χαμηλή υγρασία ή με ομοιόμορφη κρυστάλλωση, δεν πρέπει να θερμαίνονται πριν την αποθήκευσή τους. Το αποθηκευμένο μέλι δεν πρέπει να είναι εκτεθειμένο στο ήλιο, ούτε σε έντονο συνεχή φωτισμό (Θρασυβούλου, 2003<sup>3</sup>).



## **Κεφάλαιο 2**

### **2.1 Γεωργικά φάρμακα**

Παρασιτοκτόνα (Pesticides) ή φυτοφάρμακα ή γεωργικά φάρμακα ή φυτοπροστατευτικές ουσίες ή προϊόντα (phytosanitary products) είναι οι χημικές ουσίες ή τα προϊόντα, που προορίζονται για να αποτρέψουν, να μετριάσουν ή να σταματήσουν τη δράση των παρασίτων. Στον παραπάνω ορισμό συμπεριλαμβάνονται τα προϊόντα προστασίας της φυτικής και ζωϊκής παραγωγής, καθώς επίσης και οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών.

Είναι γεγονός ότι η προσπάθεια του ανθρώπου τις τελευταίες δεκαετίες ήταν κυρίως να μεγιστοποιήσει την ποσότητα παραγωγής γεωργικών προϊόντων χωρίς να ενδιαφέρεται πρώτιστα για την ποιότητα. Η ταχύτερη ανάπτυξη της βιομηχανίας παραγωγής λιπασμάτων και φυτοπροστατευτικών ουσιών, που παρατηρήθηκε μετά τον Β΄ Παγκόσμιο Πόλεμο, του επέτρεψε να πετύχει σε μεγάλο βαθμό το στόχο του. Σταδιακά όμως, άρχισαν να παρουσιάζονται προβλήματα από την αλόγιστη χρήση των παραπάνω ουσιών, που οδήγησαν σε προσεγγίσεις αναθεώρησης αυτής της πρακτικής και σε στροφή του καταναλωτή στην ποιότητα. Πλέον ο κύριος στόχος των σύγχρονων παραγωγών είναι τα ποιοτικά και ασφαλή προϊόντα. Το κλίμα που διαμορφώθηκε στην παγκόσμια αγορά και στις παραγωγικές διαδικασίες ήταν λογικό να επηρεάσει άμεσα και τα προϊόντα κυψέλης. Αποτέλεσμα αυτού του ενδιαφέροντος ήταν και είναι να εμφανίζονται όλο και πιο συχνά σχετικές αναφορές στην ύπαρξη επικίνδυνων ενώσεων (αντιβιοτικών, πτητικών εντομοκτόνων, φυτοπροστατευτικών ουσιών και κτηνιατρικών φαρμάκων, κ.α.) στο μέλι και στο βασιλικό πολτό (*Bogdanov et al, 2002, Karazfiris et al, 2008*).

### **2.2 Κατηγορίες και ταξινόμηση παρασιτοκτόνων ουσιών**

Η ταξινόμηση των παρασιτοκτόνων ουσιών μπορεί να γίνει ανάλογα με τη βιολογική τους δράση ή τη χημική τους δομή. Τα παρασιτοκτόνα ανάλογα με τη βιολογική τους δράση ταξινομούνται σε εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, ακαρεοκτόνα, αφιδοκτόνα, νηματωδοκτόνα, τρωκτοκτόνα, βακτηριοκτόνα, φερομόνες και ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών. Οι δραστικές ουσίες των παρασιτοκτόνων ταξινομούνται, επίσης, σε ομάδες σύμφωνα με τη χημική τους δομή, τον τρόπο χρήσης τους και/ή την πιο εξειδικευμένη βιολογική τους δράση. Τα οργανικά παρασιτοκτόνα ανάλογα με τη χημική τους δομή ταξινομούνται σε τέσσερις γενικές ομάδες τα οργανοχλωριωμένα, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά και τα ποικίλης χημικής σύστασης παρασιτοκτόνα.

Στους παρακάτω Πίνακες, 2.1, 2.2 και 2.3 παρουσιάζονται οι σημαντικότερες κατηγορίες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων, μυκητοκτόνων αντίστοιχα, οι οποίες αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας κατανάλωσης των παρασιτοκτόνων (*Αμβράζη, 2007<sup>1</sup>, Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ευθυμία, 2008<sup>12</sup>, Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α., 2010<sup>2</sup>*).

**Πίνακας 2.1 Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των εντομοκτόνων\***

No	Ομάδα
1.	<p>Οργανοφωσφορικά</p> <p>α. Μη διασυστηματικά (παραμένουν στην εξωτερική επιφάνεια των φυτικών ιστών ή έχουν και μικρή διεισδυτική ικανότητα) (<i>azinphos-methyl, chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl*, diazinon*, dichlorvos*, ethion, fenitrothion, fenthion*, malathion*, mecarbam, methidathion, parathion*, parathion methyl*, phosalone, phosmet*, pirimiphos methyl, quinalphos, triazophos</i> κ.α.) (*=παρουσιάζουν δράση ατμών)</p> <p>β. Διασυστηματικά (Διεισδύουν στο εσωτερικό των φυτικών οργάνων και μέσω των ηθμωδών αγγείων μεταφέρονται και διαχέονται μέσα στους φυτικούς ιστούς) (<i>acephate, demeton-S-methyl, dimethoate, disulfoton, fenamiphos, formothion, heptenophos, methanidophos, monochrotophos, omethoate, phorate, phosmamidon, terbufos, thometon, vamidothion</i>)</p>
2.	Οργανοχλωριωμένα ( <i>lindane</i> (ή $\gamma$ -HCH) αποκλειστικά για εφαρμογή στο έδαφος πριν τη σπορά και <i>endosulfan</i> )
3.	Καρβαμιδικά ( <i>aldicarb, butocarboxim, carbaryl, carbofuran, carbosulfan, fenoxycarb, fyrathiocarb, methomyl, oxanyl, pirimicarb, thiodicarb, thiofanox</i> κ.α.)
4.	Συνθετικές Πυρεθρίνες ή Πυρεθροειδή ( $\alpha$ - <i>cypermethrin, bifethrin, bioresmethrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, esfenvalerate, fenvalerate, λ-cyhalothrin, permethrin, ζ-cypermethrin</i> )
5.	Παράγωγα βενζοϋλουρίας ( <i>diflubenzuron, teflubenzuron, triflumuron</i> )
6.	Εντομοκτόνα διαφόρων χημικών ομάδων ( <i>abamectin, buprofezin, cyromazine, imidachloprid</i> )
7.	Πολτοί: είναι γαλακτώματα ή γαλακτοματοποιησιμα σκευάσματα ελαίων, συνήθως ορυκτελαίου, παραφινελαίου τα οποία χρησιμοποιούνται για ψεκάσμούς κατά τη βλαστική περίοδο (θερινοί πολτοί) εναντίον κοκκοειδών αυγών εντόμων και ακάρεων κ.λ.π. ή στα φυλλοβόλα δέντρα κατά την περίοδο του ληθάργου (χειμερινοί πολτοί).
8.	Υποκαπνιστικά ( <i>aluminium phosphide, dazomet, 1-3 dichloropropene</i> κ.α.)
9.	Βιολογικά εντομοκτόνα ( <i>Bacillus thuringiensis subsp. Kurstaki</i> )

**Πίνακας 2.2 Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των ζιζανιοκτόνων**

No	Ομάδα
1.	<p>Εκλεκτικά αγρωστώδη (Γνωστά και ως παρεμποδιστές της καρβοξυλάσης του ακετυλο-συνενζύμου A ή αναστολείς της σύνθεσης λιπαρών οξέων)</p> <p>α. Αρλοξυφαινοξυ-προπιονικά (<i>clodinafop, diclofop, fenoxaprop, fluazifop</i> κ.α.)</p> <p>β. Παράγωγα κυκλοξανοδιόνης (<i>sethoxydim, tralkoxydim</i>)</p>
2.	<p>Παρεμποδιστές της οξεικογαλακτικής συνθέσεως (ALS)</p> <p>α. Σουλφονυλουρίες (<i>bensulfuron, chlorsulfuron, nicosulfuron, primisulfuron</i> κ.α.)</p> <p>β. Ιμιδαζολιόνες (<i>imazamethabenz, imazapyr</i>)</p> <p>γ. Τριαζοπυριμιδίνες (<i>cloransulan, flumetsulan</i>)</p>
3.	<p>Ορμονικά ζιζανιοκτόνα</p> <p>α. Φαινοξυ-αλκανοϊκά παράγωγα (<i>2,4-D, MCPA, dichlorprop, mecorprop</i>)</p> <p>β. Παράγωγα βενζοϊκού οξέος (<i>dicamba</i>)</p> <p>γ. Παράγωγα πικονιλικού οξέος (<i>chlorpyralid, triclopyr</i>)</p>
4.	Δινιτροανιλίνες ( <i>benfluralin, dinitramine, ethalfuralin, pendimethalin, triflurakin</i> )
5.	<p>Τριαζίνες (Αναστολείς φωτοσύνθεσης)</p> <p>α. Συμμετρικές Τριαζίνες (<i>atrazine, cyanazine, simazine, prometryn</i> κ.α.)</p> <p>β. Ασύμμετρες Τριαζίνες (<i>metamitron, metribuzin</i>)</p>
6.	Παράγωγα φαινυλουρίας ( <i>diuron, fluometuron, isoproturon, linuron, monolinuron</i> )
7.	Ουρακίλες (Αναστολείς φωτοσύνθεσης) ( <i>bromacil, lenacil, terbacil</i> )
8.	<p>Καρβαμιδικά</p> <p>α. Φαινυλοκαρβαμιδικά (<i>desmediphan, phenmedipham</i>)</p> <p>β. Θειοκαρβαμιδικά (<i>cycloate, EPTC, molinate, pebulate, thiobencarb, triallate</i>)</p>
9.	<p>Αμίδια</p> <p>α. Χλωροακεταμίδια (<i>alachlor, metachlor, predilachlor, propachlor</i>)</p> <p>β. Άλλα αμίδια (<i>napropamide, propyzamide, naptalam, tebutam</i>)</p>

No	Ομάδα
10.	Διπυριδύλια ( <i>difenzoquat, diquat, paraquat</i> )
11.	Νιτρίλια (Αναστολείς φωτοσύνθεσης) ( <i>dichlobenil, bromonixil, ioxynil</i> )
12.	Διάφορα: <i>ethofumesate, oxadiazon, oxyfluorfen, bentazone, pyridate, quinclorac, amitrole, glyphosate, trimesium, glufosinate, chlorthal dimethyl-DCPA</i>

\*(Ως ζιζνιοκτόνα ορίζονται τα παρασιτοκτόνα που χρησιμοποιούνται για την καταστροφή ή τον περιορισμό των ανεπιθύμητων που ανταγωνίζονται τα καλλιεγούμενα φυτά, των ζιζανίων)

### Πίνακας 2.3 Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των μυκητοκτόνων \*

No	Ομάδα
1.	Ανόργανα (θείο, χαλκός, χαλκός βορδιγάλειος, χαλκός οξικινολικός, χαλκός οξυχλωριούχος, χαλκός βουργούνδιος κ.α.)
2.	Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες ( <i>chloroneb, ethazole, quintozene-PCNP</i> κ.α.)
3.	Βενζαμίδια
4.	Βενζιμιδαζόλια
5.	Βενζονιτρίλια
6.	Καρβαμιδικά, Καρβαμιδικά Ακετανιλίδια, Καρβαμιδικά Φαινυλαμίδια
7.	Αναστολείς διμεθυλίωσης (Dimethylation Inhibitors-DMI) ( <i>cyproconazole, fenarimol, cyclobutamil, prociconazole, tridimefon</i> )
8.	Δικαρβοξυμιδία ( <i>iprodione, vincosolin, procymidone</i> )
9.	Οργανοφωσφορικά ( <i>fozetyl</i> )
10.	Διθειοκαρβαμιδικά ( <i>mancozeb, maneb, thiram, zineb</i> κ.α.)
11	Στρομπιλουρίνες

\*(Ως μυκητοκτόνα ορίζονται τα παρασιτοκτόνα που δρουν εναντίον των φυτοπαθογόνων μυκήτων και ιογενών ασθενειών των φυτών)

### 2.3 Τοξικότητα γεωργικών φαρμάκων

Η τοξικότητα μιας ουσίας εκφράζεται σε τιμές **θανατηφόρας δόσης των 50%** (Lethal dose values-LD<sub>50</sub>). Ο όρος αυτός δίνει την ποσότητα της ουσίας, η οποία προκαλεί το θάνατο του 50% ενός πληθυσμού πειραματόζωων, αν χορηγηθεί σε μια δόση. Η τιμή LD<sub>50</sub> σε ppm ή σε mg ανά Kg βάρους του πειραματόζωου. Ευνόητο είναι, ότι όσο πιο μικρή η LD<sub>50</sub>, τόσο πιο τοξική είναι η ένωση.

Εκτός από την LD<sub>50</sub>, χρησιμοποιείται και ο όρος **ανώτατη μη δραστική συγκέντρωση** (no effect level) και είναι η συγκέντρωση εκείνη, με την οποία δεν εμφανίζεται καμία βλάβη στο πειραματόζωο.

Με βάση την ανώτατη μη δραστική συγκέντρωση υπολογίζεται η ανώτατη επιτρεπτή ημερήσια δόση, επίσης σε mg/Kg βάρους σώματος του πειραματόζωου. Στη συνέχεια υπολογίζεται η ανώτατη επιτρεπτή ημερήσια πρόσληψη (acceptable daily intake) για τον άνθρωπο. Για τον υπολογισμό αυτό θεωρείται πως ο άνθρωπος είναι δέκα φορές πιο ευαίσθητος από το πειραματόζωο και επιπλέον χρησιμοποιείται ένας δεκαπλάσιος συντελεστής ασφάλειας (Κουίμτζη Θ., Χημεία Περιβάλλοντος, 1998).

Στον **πίνακα 2.4** δίνονται οι κατηγορίες τοξικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων με βάση την LD<sub>50</sub> οξείας τοξικότητας σε επίμυες σύμφωνα με τους Κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

Η είσοδος των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να γίνει:

- Από το δέρμα (με επαφή)

- Από το αναπνευστικό σύστημα
- Από το στόμα

Οι τοξικές επιπτώσεις μπορεί να είναι αποτέλεσμα πρόσληψης μεγάλων δόσεων σε μικρό χρονικό διάστημα (οξεία τοξικότητα), ή μικρών δόσεων για μεγάλο χρονικό διάστημα (χρόνια τοξικότητα).

**Πίνακας 2.4** Κατηγορίες τοξικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων με βάση την LD<sub>50</sub> οξείας τοξικότητας σε επίμυες σύμφωνα με τους Κανονισμούς της Ευρωπαϊκής Ένωσης

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΣΤΟΜΑΤΟΣ (mg/Kg Z.B*)	ΔΕΡΜΑΤΟΣ (mg/Kg Z.B)	ΑΝΑΠΝΟΗΣ (mg/L αέρα)
Στερεά εκτός από δολώματα και δισκία			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	0-5	0-10	-
II (ΤΟΞΙΚΑ)	5-50	10-100	-
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	50-500	100-1000	-
Υγρά, δολώματα και δισκία			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	0-25	0-50	-
II (ΤΟΞΙΚΑ)	25-200	50-400	-
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	200-2000	400-4000	-
Αεροκαλύματα, καπνογόνα και πολύ λεπτές σκόνες επιπάσεως (διαμ<50μ)			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	-	-	0,0-0,5
II (ΤΟΞΙΚΑ)	-	-	0,5-2,0
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	-	-	2,0-20,2

- Ζων Βάρος πειραματόζωου
- Πηγή: ΜΑΥΡΟΜΑΝΩΛΑΚΗΣ ΚΩΣΤΑΣ, 2007<sup>10</sup>

Η τοξικότητα ενός γεωργικού φαρμάκου εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες. Εκτός της ομάδας στην οποία ανήκει, σημαντικό ρόλο μπορεί να παίξουν οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, η δόση, η διάρκεια έκθεσης, ο τρόπος εφαρμογής, η φυσική του κατάσταση και τελικά ο τρόπος έκθεσης στο φάρμακο. Στα αποτελέσματα μιας οξείας τοξικότητας μπορούν να αναφερθούν ως δηλητηριάσεις, δυσφορία, ερεθισμοί ματιών, δέρματος και αναπνευστικού συστήματος. Επίσης, τα παρασιτοκτόνα μπορούν να θεωρηθούν υπεύθυνα για την πρόκληση ορισμένων μορφών καρκίνου (*Mary L. Grodner, 1996, Essen, S G, 1998*), καθώς και για την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου (*Benerjee, 1999*). Το γεγονός ότι ο πιο επικίνδυνος τρόπος έκθεσης σε μία δραστική ουσία είναι μέσω της κατάποσης καταδεικνύει τη σημασία που έχουν για τον καταναλωτή τα ελεύθερα από υπολείμματα τρόφιμα.

Άξια αναφοράς είναι η κατάταξη των δραστικών ουσιών και με βάση την τοξικότητα τους στις μέλισσες. Έτσι έχουμε φάρμακα πολύ τοξικά, μετρίως τοξικά και μη τοξικά για τις μέλισσες (*Sanford, 1993*).

## **2.4 Νομοθεσία για τα κατάλοιπα φαρμάκων και φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης**

Η σχετική νομοθεσία που υπάρχει από την Ευρωπαϊκή Ένωση για τα υπολείμματα φαρμάκων και φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης είναι η εξής:

### **Κανονισμός (ΕΚ) 2377/90**

Με βάση τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης 2377/90 για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, ως «**ανώτατο όριο καταλοίπων**» **Maximum Residue Limits (MRLs)** ορίζεται η μέγιστη συγκέντρωση καταλοίπων που προκύπτει από τη χρήση κτηνιατρικού φαρμάκου (εκφραζόμενη σε mg/kg ή σε µg/kg με βάση το βάρος του νωπού προϊόντος), η οποία μπορεί να θεωρείται ως νομίμως επιτρεπτή από την Κοινότητα ή να αναγνωρίζεται ως αποδεκτή εντός ή επί τροφίμου. Το εν λόγω όριο βασίζεται στον τύπο και την ποσότητα καταλοίπων.

#### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I**

Κατάλογος των φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών για τις οποίες έχουν καθοριστεί ανώτατα επιτρεπτά όρια

#### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II**

Κατάλογος των φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών για τις οποίες δεν καθορίζεται κανένα ανώτατο όριο καταλοίπων

#### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III**

Κατάλογος των φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα κτηνιατρικά φάρμακα και για τις οποίες έχουν καθοριστεί προσωρινά ανώτατα όρια καταλοίπων

#### **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV**

Κατάλογος των φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών για τις οποίες δεν καθορίζεται κανένα ανώτατο όριο καταλοίπων

### **Κανονισμός (ΕΚ) 396/2005**

Για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα ή πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου

### **Κανονισμός (ΕΚ) 2002/657**

Για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων

### **Κανονισμός (ΕΚ) 2003/181**

Για την τροποποίηση της απόφασης 2002/657/ΕΚ όσον αφορά τον καθορισμό των ελάχιστων απαιτούμενων ορίων επίδοσης (MRL) για ορισμένα κατάλοιπα σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης

## **2.6 Codex Alimentarius**

Ο **Codex Alimentarius** είναι στην ουσία Κώδικας Τροφίμων. Περιλαμβάνει μια σειρά γενικών και συγκεκριμένων προτύπων ασφάλειας τροφίμων που έχουν διατυπωθεί με στόχο την προστασία της καταναλωτικής υγείας και τη διασφάλιση δίκαιων πρακτικών στο εμπόριο τροφίμων. Τα τρόφιμα που τίθενται στην αγορά για τοπική κατανάλωση ή εξαγωγή πρέπει να είναι ασφαλή προς βρώση και καλής ποιότητας. Ο **Codex Alimentarius** δεν έχει θεσπίσει ανώτατα όρια καταλοίπων στο μέλι και σε προϊόντα κυψέλης.

## Κεφάλαιο 3

### 3.1 Κατάλοιπα φυτοπροστατευτικών ουσιών και μέθοδοι προσδιορισμού τους

Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός φυτοπροστατευτικών ουσιών στα τρόφιμα, γνώρισε αλματώδη ανάπτυξη τα τελευταία είκοσι χρόνια. Η καλύτερη γνώση της τοξικότητας των διαφόρων ουσιών και οι πιέσεις των καταναλωτών και των οικολογικών οργανώσεων προς τις κυβερνήσεις των ανεπτυγμένων χωρών και τους αρμόδιους φορείς ελέγχου, είχαν ως αποτέλεσμα την υποστήριξη της έρευνας με στόχο την ανάπτυξη των αναλυτικών δυνατοτήτων και τη μείωση των ορίων προσδιορισμού των παρασιτοκτόνων σε πολύ χαμηλότερα επίπεδα απ' ό,τι τα παλαιότερα. Ο προσδιορισμός των καταλοίπων, ως μέρος της αναλυτικής χημείας, διέπεται από την αξιόπιστη και ευαίσθητη ανάλυση και παρουσιάζει (Παπαδή-Ψύλλου, 2009<sup>11</sup>) τις εξής ιδιαιτερότητες:

- ✓ Οι συγκεντρώσεις των καταλοίπων είναι πολύ μικρές, της τάξεως  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  έως αρχές  $\text{mg}/\text{Kg}$  ή  $\text{ng}/\text{L}$  έως  $\mu\text{g}/\text{L}$  και βρίσκονται σε συνάρτηση με τα αποδεκτά όρια υπολειμμάτων που θεσπίζουν οι διεθνείς οργανισμοί και τα οποία τα τελευταία χρόνια έχουν συνεχώς καθοδική τάση.
- ✓ Το υπόστρωμα του δείγματος που αποτελείται από πολλά συστατικά με ποικίλες ιδιότητες, συνυπάρχει στο τελικό εκχύλισμα και συνήθως παρεμποδίζει τη μέτρηση.
- ✓ Το ιστορικό των δειγμάτων που αναλύονται είναι πολλές φορές άγνωστο

Η αναλυτική μεθοδολογία προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών ουσιών στα τρόφιμα περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

- Εκχύλιση των ουσιών στόχων (αναλυτών)
- Πιθανό καθαρισμό του εκχυλίσματος
- Προσδιορισμό των αναλυτών με τεχνικές αέριας και υγρής χρωματογραφίας και τη χρήση εκλεκτικών ανιχνευτών (NPD, ECD, MS).

### 3.2 Εκχύλιση

Οι σημαντικότερες μέθοδοι που έχουν χρησιμοποιηθεί στο στάδιο της εκχύλισης στο μέλι είναι:

- Εκχύλιση υγρού-υγρού (*Liquid-Liquid Extraction - LLE*)
- Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (*Solid Phase Extraction - SPE*)
- Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (*Solid Phase Microextraction - SPME*)
- Μικροεκχύλιση υγρής φάσης (*Liquid Phase Microextraction - LPME*)

Με την εκχύλιση, οι ουσίες στόχοι πρέπει να μεταφερθούν από το υγρό υπόστρωμα στο τελικό ενέσιμο διάλυμα. Εκχύλιση είναι η διεργασία κατά την οποία οι αναλύτες (π.χ. τα φυτοφάρμακα) λαμβάνονται από το τρόφιμο με κατάλληλα εκχυλιστικά μέσα. Η επιλογή των εκχυλιστικών μέσων είναι καθοριστικής σημασίας για την επιτυχία της ανάλυσης. Επιδίωξη είναι το εκχυλιστικό μέσο που θα χρησιμοποιηθεί να διαθέτει μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα, ώστε να μπορεί να «βγάλει» τα μόρια των προς προσδιορισμό ουσιών από το τρόφιμο, παράλληλα όμως να είναι αρκετά εκλεκτικό για να αποφεύγεται η εκχύλιση ανεπιθύμητων

ουσιών από το υπό μελέτη υποστρώμα (το προς ανάλυση προϊόν), ώστε το εκχύλισμα να είναι όσο το δυνατόν πιο καθαρό. Έτσι, η επιλογή της διεργασίας της εκχύλισης των αναλυτών (προς προσδιορισμό ουσιών) στα διάφορα υποστρώματα απαιτεί την προσεκτική μελέτη των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αναλυτών, σε συνδυασμό με τη σύσταση του υποστρώματος. Για παράδειγμα στην εκχύλιση υγρού υγρού ο κατάλληλος διαλύτης εκχύλισης (εκχυλιστικό μέσο) είναι εκείνος που θα έχει συγγενείς ιδιότητες και κυρίως παρόμοια πολικότητα με τα υπό μελέτη φυτοφάρμακα, αλλά να μην αναμιγνύεται με το υδατικό υπόστρωμα.

Γενικά, για την εκχύλιση υδρόφιλων φαρμάκων χρησιμοποιούνται πιο πολικοί διαλύτες και, αντίστοιχα, λιπόφιλοι, για τα λιπόφιλα φάρμακα. Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην εκχύλιση στο μέλι είναι μεθανόλη, διχλωρομεθάνιο, εξάνιο, ακετονιτρίλιο. Το ακετονιτρίλιο δίνει καθαρότερα εκχυλίσματα (πιο πολικό), είναι όμως περισσότερο τοξικό και για το λόγο αυτό αντικαθίσταται συχνά από την ακετόνη. Η ακετόνη εξατμίζεται ευκολότερα (πιο πτητική), είναι λιγότερο τοξική και σχετικά φθηνή, αλλά έχει μεγάλη συνεκχυλιστική ικανότητα. Συχνά χρησιμοποιούνται ως εκχυλιστικά μέσα μίγματα διαλυτών όπως ισοπροπανόλη με τολουόλιο, διχλωρομεθάνιο με ακετόνη κ.α. (Tsipi D. et al, 1999, Karazafiris et al, 2008).

Έτσι λοιπόν τα κριτήρια που λαμβάνονται υπόψη για την επιλογή του διαλύτη εκχύλισης είναι:

- ⇒ Έλλειψη αντίδρασης μεταξύ του διαλύτη και των αναλυτών
- ⇒ Η πολικότητα των προς προσδιορισμό αναλυτών
- ⇒ Η διαλυτότητα των αναλυτών στους διάφορους διαλύτες
- ⇒ Ο τύπος του προς ανάλυση δείγματος
- ⇒ Η τοξικότητα του διαλύτη
- ⇒ Η πτητικότητα του διαλύτη
- ⇒ Η καθαρότητα του διαλύτη
- ⇒ Ο τύπος της μεθόδου (ειδική ή πολυπολειμματική)

### 3.3 Καθαρισμός

Η επιλογή της τεχνικής καθαρισμού (clean-up) εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου και τη φύση των συνεκχυλισμάτων. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες τεχνικές είναι η κατανομή μεταξύ δυο υγρών φάσεων (Liquid-Liquid partitioning - δυο μη αναμειγνυόμενων οργανικών διαλυτών) και η χρωματογραφία στήλης, όπου το δείγμα διαβιβάζεται μέσα από στήλη με κατάλληλο υλικό για το διαχωρισμό των ενώσεων ανάλογα με την πολικότητα τους. Τέτοια υλικά είναι το διοξείδιο του πυριτίου, η αλουμίνα, το florisil κ.α.. (Παπαδή-Ψύλλου, 2009<sup>11</sup>)

#### 3.3.1 Τεχνικές εκχύλισης

##### 3.3.1.1 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction - LLE)



Η εκχύλιση αυτού του τύπου είναι μια από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες μεθόδους παραλαβής των φυτοφαρμάκων αλλά και άλλων ουσιών από τα διάφορα περιβαλλοντικά και διατροφικά υποστρώματα. Αποτελεί την επίσημη μέθοδο εκχύλισης σε πολλά πρωτόκολλα αναλυτικών μεθόδων. Η εκχύλιση υγρού-υγρού πραγματοποιείται με την προσθήκη μη αναμίξιμου οργανικού διαλύτη στο δείγμα. Οι αναλύτες κατανομούνται σύμφωνα με το συντελεστή κατανομής τους στο σύστημα δυο φάσεων. Διακρίνεται σε συνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται εν θερμώ με τη συσκευή Soxhlet και σε ασυνεχή εκχύλιση, όπου το δείγμα εκχυλίζεται με επαναληπτικές δόσεις διαλύτη με μηχανική ανάδευση ή σε συσκευή υπερήχων.

Μετά την εκχύλιση συνήθως ακολουθεί καθαρισμός (προαιρετικά) και συμπύκνωση του εκχυλίσματος, ώστε να μειωθεί ο όγκος της οργανικής φάσης ή/και η πιθανή αλλαγή του διαλύτη. Η συμπύκνωση του εκχυλίσματος επιτυγχάνεται είτε στον περιστροφικό εξατμιστήρα (Rotary evaporator) υπό ελαττωμένη πίεση είτε με διέλευση ρεύματος καθαρού αερίου, συνήθως αζώτου, για μικρούς όγκους εκχυλίσματος.

Η υψηλή εκλεκτικότητά της *εκχύλισης υγρού-υγρού* και η ευρεία χρήση της στην απομόνωση διαφορετικών φυτοπροστατευτικών ουσιών με μεγάλο εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων, την κάνουν να βρίσκει ευρεία εφαρμογή παρά τα μειονεκτήματά της, τα οποία είναι το σχετικά υψηλό της κόστος λόγω κατανάλωσης σχετικά ικανών όγκων διαλυτών που πολλές φορές είναι και επιβλαβείς τόσο για τους χειριστές όσο και για το περιβάλλον και το ότι είναι χρονοβόρα. Τα μειονεκτήματά αυτά οδήγησαν σε βελτιωμένες εκδόσεις της τεχνικής με χρήση μικρών ή πολύ μικρών όγκων διαλυτών και τα τελευταία χρόνια στην υγρού-υγρού μικροεκχύλιση (*liquid-liquid microextraction- LLME*), η οποία είναι και πιο φιλική προς το περιβάλλον, αφού χρησιμοποιούνται πολύ μικρές ποσότητες οργανικών διαλυτών (μL ή mL) αλλά και δείγματος (1,5-10 mL).

Οι Blasco και άλλοι (2004<sup>24</sup>) προσδιόρισαν 9 οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα ( $\alpha$ -,  $\beta$ - και  $\gamma$ -HCB, HCB, aldrin, *p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, *p,p'*-DDT και *p,p'*-DDT) σε 49 εμπορικά δείγματα μελιού με εκχύλιση υγρού-υγρού και αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων. Τα όρια ποσοτικοποίησης κυμαίνονταν ανάμεσα μεταξύ 0.01-0.10 mg/Kg, ενώ τα όρια ανίχνευσης μεταξύ 0.001-0.02 mg/Kg. Η επιβεβαίωση έγινε με ανιχνευτή μάζας.

### 3.3.1.2 Εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid phase Extraction-SPE)

Σκοπός της εκχύλισης αυτής είναι η απομόνωση των αναλυτών με ταυτόχρονη προσυγκέντρωση τους ή/και καθαρισμός του εκχυλίσματος από παρεμποδιστές. Χαρακτηρίζεται ως γενική τάξη μετασχηματισμών φάσεων ή διαδικασία μοριακής κατανομής. Η εκχύλιση δια της στερεάς φάσης μπορεί να θεωρηθεί ως μια απλή χρωματογραφική διαδικασία όπου το προσροφητικό υλικό αποτελεί τη στατική φάση, ενώ την κινητή φάση αποτελεί ο οργανικός διαλύτης. Ο διαχωρισμός των ενώσεων στηρίζεται στη διαφορετική ικανότητα κατακράτησης των ουσιών στην επιφάνεια του προσροφητικού. Τα υλικά που χρησιμοποιούνται είναι είτε μικροστίλες, οι οποίες περιέχουν κατάλληλο χρωματογραφικό υλικό (C-18, diol, silica, florisil), είτε δίσκοι στους οποίους το χρωματογραφικό υλικό είναι με μορφή μεμβράνης ενσωματωμένης πάνω σε ένα δίκτυο μικροϊνιδίων πολυτετραφθοροαιθυλαινίου (PTFE).

Οι τύποι-μηχανισμοί SPE είναι οι εξής:

- Αντίστροφη φάση (Reversed Phase – RP) με άπολα υλικά στατικής φάσης (C-18, C-8)
- Κανονική φάση (Normal Phase – NP) με πολικά υλικά στατικής φάσης (Silica, Florosil, Alumina)
- Ιοντοανταλλαγή με στατική φάση ιοντοανταλλαγής

Η κατακράτηση των ενώσεων επιτυγχάνεται με ισχυρές, ωστόσο αντιστρεπτέες αλληλεπιδράσεις, εφόσον μετά το στάδιο της φόρτισης του υγρού δείγματος στις μικροστήλες ή στους δίσκους οι ενώσεις μεταφέρονται σε κάποιο οργανικό διαλύτη για τον οποίο ο συντελεστής έκλυσης της προς εκχύλισης ένωσης είναι μεγαλύτερος. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι υδρόφοβες (μη πολικές αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις διασποράς), που λαμβάνουν χώρα στα συστήματα SPE αντίστροφης φάσης, ή υδρόφιλες (πολικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου, αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου), που συνήθως παρατηρούνται στα συστήματα SPE κανονικής φάσης. Τέλος, αναπτύσσονται και αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσεως μεταξύ φορτισμένων ομάδων της ένωσης και της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού, οι οποίες εντοπίζονται στα συστήματα SPE ιοντοανταλλαγής.

Η εκχύλιση δια της στερεάς φάσης είναι αποτέλεσμα ανταγωνιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ δυνάμεων που συγκρατούν τις οργανικές ενώσεις στο υγρό δείγμα ή οργανικό εκχύλισμα και των δυνάμεων διάχυσης που προάγουν τη μεταφορά των ενώσεων από το δείγμα στα προσδεδεμένα οργανικά μόρια που εντοπίζονται στην προσροφητική επιφάνεια. Υπάρχουν πολλοί συνδυασμοί προσροφητή/διαλύτη για εκλεκτικές εκχυλίσεις. Για την επιλογή του κατάλληλου συνδυασμού θα πρέπει να μελετηθούν η φύση του αναλύτη, το υπόστρωμα, το οποίο σχετίζεται με το διαλύτη στον οποίο έχουμε το δείγμα.

Τα στάδια της εκχύλισης δια της στερεάς φάσης είναι τα ακόλουθα:

**-Προετοιμασία του προσροφητικού υλικού (conditioning):** Μικρή ποσότητα οργανικού διαλύτη διέρχεται μέσω της μικροστήλης ή του δίσκου εκχύλισης. Ένα μέρος αυτής της ποσότητας προσροφάται στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και την καθιστά πιο συμβατή με το διάλυμα του δείγματος, έτσι ώστε να επιτυγχάνεται καλύτερη επιφανειακή επαφή μεταξύ τους. Με αυτή τη διαδικασία απομακρύνονται και ξένες προς την ανάλυση οργανικές ουσίες οι οποίες βρίσκονται προσροφημένες στο στρώμα του προσροφητικού (Mayer et al., 1994, Thurman et al., 1998).

**- Φόρτιση του δείγματος:** Το προς ανάλυση δείγμα διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης, με εφαρμογή πίεσης ή κενού. Στο στάδιο αυτό θα πρέπει ο ρυθμός της ροής να διατηρείται κατά το δυνατό σταθερός. Το δείγμα που βρίσκεται σε υγρή μορφή διέρχεται από το φυσίγγιο ή από το δίσκο με τη βοήθεια της βαρύτητας, της πίεσης (θετική πίεση με έμβολο), της υποπίεσης (δημιουργία κενού) και φυγοκέντρωσης.

**-Έκπλυση:** Σκοπός αυτής της διαδικασίας είναι η απομάκρυνση των παρεμποδιστικών ουσιών, που πιθανόν να υπάρχουν, χωρίς όμως να γίνει έκλυση των αναλυτών.

**-Έκλυση:** Κατάλληλος όγκος οργανικού διαλύτη ή μίγμα διαλυτών διέρχεται από τη μικροστήλη ή το δίσκο εκχύλισης με σκοπό την ποσοτική εκρόφηση των αναλυτών και τη μεταφορά τους στην υγρή φάση. Η επιλογή του διαλύτη έκλυσης καθορίζεται από τη φύση του ίδιου του διαλύτη και της προς εκρόφηση ένωσης. Ο συντελεστής κατανομής θα πρέπει να ευνοεί τη μεταφορά του αναλύτη στο διαλύτη έκλυσης.

Εφαρμογές στο μέλι έχουν γίνει από τους *D. Tsipi, et al 1999*<sup>51</sup>, με μη πολική στατική φάση C-18. Συγκεκριμένα, αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος καθαρισμού για τον πολλαπλό προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Οι ουσίες στόχοι ήταν *α-HCH*, *β-HCH*, *lindane*, *δ-HCH*, *heptachlor*, *aldrin*, *heptachlor epoxide*, *α-endosulfan*, *4,4-DDE*, *dieldrin*, *endrin*, *β-endosulfan*, *4,4-DDD*, *endrin aldehyde*, *endosulfan sulfate*, *4,4-DDT*, *methoxychlor* και *endrin ketone*. Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξάνιο. Ο προσδιορισμός των ουσιών έγινε με αέρια χρωματογραφία και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων.

### 3.3.1.3 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction-SPME)

Η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (*Solid phase Micro Extraction-SPE*) είναι μια νέα τεχνική εκχύλισης η οποία αναπτύχθηκε από τον Pawlitzyn και τους συνεργάτες του (*Berlardi and Pawlitzyn, 1989*). Πρόκειται για μια εξαιρετικά απλή και γρήγορη τεχνική που θεωρείται αποτελεσματική κυρίως για τις ημιπηκτικές και τις πτητικές οργανικές ενώσεις, οι οποίες πολλές φορές παρουσιάζουν απώλειες με άλλες τεχνικές. Με τη μικροεκχύλιση στερεάς φάσης οι αναλύτες προσροφούνται στην επιφάνεια λεπτής ίνας που εισέρχεται απ' ευθείας στο δείγμα, ενώ η εκχύλιση μπορεί να γίνει επί τόπου στο πεδίο δειγματοληψίας. Στη συνέχεια η ίνα τοποθετείται στον εισαγωγέα του χρωματογράφου, όπου και συντελείται θερμική εκρόφηση των προσροφημένων αναλυτών και χρωματογραφική ανάλυση (*SPME-GC*). Είναι επίσης δυνατό οι προσροφηθέντες ουσίες στην ίνα να εκλουστούν με διαλύτες και κατόπιν το εκχύλισμα να αναλυθεί με υγρή χρωματογραφία (*SPME-HPLC*).

Η ίνα αποτελείται από πηκτή πυριτίου και είναι επικαλυμμένη από μια στατική φάση. Υπάρχει ποικιλία στατικών φάσεων στις εμπορικά διαθέσιμες ίνες με πιο συνηθισμένες τις polydimethylsiloxane και polyacrylate. Ανάλογα με το πάχος και την πολικότητα της στατικής φάσης που φέρουν οι ίνες αυτές (οι ίνες) παρουσιάζουν μεγάλη επιλεκτικότητα για διάφορες ομάδες οργανικών ουσιών με διευρυμένη πολικότητα καθώς και πτητικότητα. Πρόκειται για μια διαδικασία εξισορρόπησης κατά την οποία πραγματοποιείται κατανομή των αναλυτών μεταξύ του υδατικού δείγματος και της στερεάς στατικής φάσης της ίνας με βάση το συντελεστή κατανομής τους *K*. Έτσι ο συντελεστής κατανομής της κάθε ουσίας μεταξύ υδατικής και στατικής φάσης και, κατά συνέπεια, η επιλογή στατικής φάσης παίζουν σημαντικό ρόλο στο αποτέλεσμα της εκχύλισης. Επίσης η απόδοση της εκχύλισης επηρεάζεται και από άλλους παράγοντες, όπως ο ρυθμός ανάδευσης, η ιοντική ισχύς και το pH του διαλύματος, αλλά και η σύσταση του διαλύτη και ο ικανοποιητικός χρόνος εκχύλισης. Εφαρμογές στο μέλι έχουν γίνει από τους *C. Blasco et al 2004*<sup>23</sup>. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν οχτώ οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, το *chlorpyrifos methyl*, *diazinon*, *fonofos*, *phenthoate*, *phosalone* και το *pirimiphos ethyl* σε 15 εμπορικά δείγματα μελιού στην Ισπανία. Η ίνα που χρησιμοποιήθηκε ήταν 100-μm PDMS. Οι παράμετροι που μελετήθηκαν και εκτιμήθηκαν ήταν ο όγκος του δείγματος, οι χρόνοι εκχύλισης, η ιοντική ισχύς, ο διαλύτης εκχύλισης και η αναλογία νερού/μελιού. Ο χρωματογραφικός προσδιορισμός έγινε με υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή μάζας.

### 3.3.1.4 Μικροεκχύλιση δια της υγρής φάσης (*Liquid Phase Microextraction - LPME*)

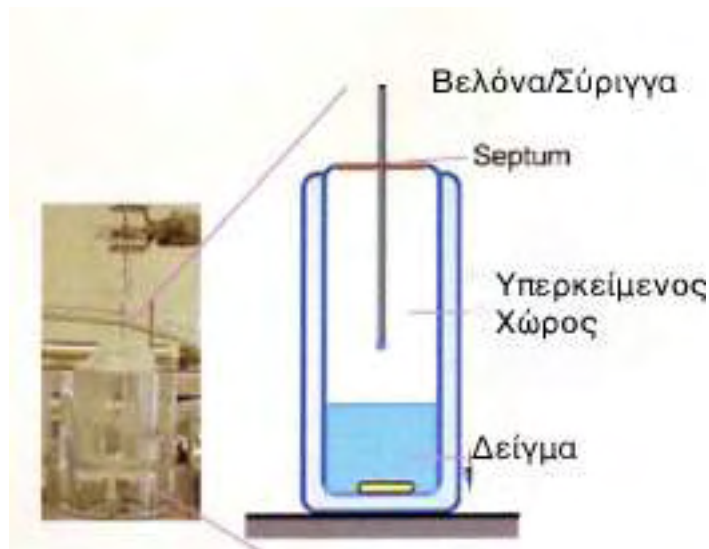
Η υγρή-υγρή μικροεκχύλιση (εκχύλιση δια μέσου μικροποσότητας διαλύτη, γνωστή και ως *Single Drop Microextraction – SDME*) είναι μια νέα πολύ δυναμική και προσαρμόσιμη τεχνική εκχύλισης, καθαρισμού και προσυγκέντρωσης δείγματος, ειδικά για την ανάλυση οργανικών συστατικών σε υδατικά διαλύματα. Αναπτύχθηκε το 1996 από τους Jeannot και Cantwell (*M. Jeannot and F. Cantwell, 1996<sup>29</sup>, M. Jeannot and F. Cantwell, 1997<sup>30</sup>*). Πολλές πρόσφατες εξελίξεις στην υγρή-υγρή μικροεκχύλιση έχουν επικεντρωθεί στην ανάπτυξη νέων τεχνικών, οι οποίες μειώνουν σημαντικά την ποσότητα του χρησιμοποιούμενου διαλύτη και διευκολύνουν την αυτοματοποίηση της διαδικασίας σε συνδυασμό με τη χρωματογραφική ανάλυση. Η ελαχιστοποίηση της ποσότητας του εκχυλιστικού μέσου μπορεί να πάρει τη μορφή μιας και μοναδικής σταγόνας ( $1\mu\text{L} = 10^{-9}\text{ mL}$ ) του εκχυλιστικού μέσου-διαλύτη αιωρούμενης ή ευρισκόμενης μέσα σε σύριγγα με ή χωρίς πόρους υδροφοβικής προστατευτικής μεμβράνης.

Η *SDME* είναι μια διαδικασία παραπλήσια της *SPME* στην οποία μια σταγόνα χρησιμοποιείται ως φάση συλλογής, αντικαθιστώντας την ίνα (**σχήμα 1.**).

Σε αυτή την απλή τεχνική, η οποία επίσης έχει ονομαστεί και υγρού/υγρού μικροεκχύλιση (*liquid/liquid microextraction*) ή μικροεκχύλιση διαλύτη (*solvent microextraction*) ή μικροεκχύλιση υγρής φάσης (*liquid phase microextraction*), μια μικροσταγόνα διαλύτη αιωρείται από την άκρη της βελόνας μίας μικροσύριγγας και εμβαπτίζεται σε υδατικό διάλυμα δείγματος στο οποίο είναι μη αναμιξιμο (*direct SDME*) ή εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο (*headspace SDME*). Τυπικοί οργανικοί διαλύτες κατανέμονται στη σταγόνα με παρόμοιο τρόπο όπως στην ίνα. Σε αντίθεση με τις ίνες, οι σταγόνες μπορούν να ανανεώνονται για κάθε εκχύλιση και είναι μια κομψή μέθοδος για να ξεπεραστεί το όριο διαθεσιμότητας της ίνας για ένα ευρύ φάσμα διαλυτών και διαφόρων άλλων παραγόντων. Η ίδια η σύριγγα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά για τη λήψη σταγόνας μετά την εκχύλιση και να εισαχθεί στην αέρια χρωματογραφία για ανάλυση. (*Lampropoulou et al, 2007<sup>37</sup>*).

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι οι μικρές ποσότητες οργανικών διαλυτών που απαιτούνται, καθώς επίσης και τα απλά πειραματικά σκεύη και εργαλεία που χρησιμοποιούνται. Επίσης πλεονέκτημα θεωρείται το ότι εκχύλιση, προσυγκέντρωση και εισαγωγή του δείγματος έχουν ενσωματωθεί σε ένα και μοναδικό βήμα.

Σήμερα, *SDME* συναντάται σε μεγάλο αριθμό αναφορών σε ένα ευρύτατο πεδίο εφαρμογών, εμπεριέχοντας διαφορετικές διατάξεις εκχύλισης. Η πιο δυναμική απ' όλες είναι αυτή με την εμβάπτιση της μικροσταγόνας σε αναδευόμενο υπόστρωμα (**σχήμα 1.**) απευθείας *SDME*.



**Σχήμα 1.** Απλός μηχανισμός για την εκχύλιση στον υπερκείμενο χώρο. Η θερμική ανάδευση είναι προαιρετική

Στη μικροεκχύλιση υγρής φάσης, οι αρχές της εκχύλισης υγρού-υγρού (*LLE*) και η μινιατουριστική φύση της *SPME* συνδυάζονται ώστε να δώσουν τα πλεονεκτήματα και των δυο τεχνικών. Στην τεχνική των δύο φάσεων οι αναλύτες εκχυλίζονται από το υγρό υπόστρωμα - δότη (donor phase) στον οργανικό διαλύτη-δέκτη (acceptor phase), που αποτελείται είτε από μια μικροσταγόνα (1-3  $\mu\text{l}$ ), που αιωρείται από την άκρη της βελόνας μιας μικροσύριγγας, είτε βρίσκεται στους πόρους μιας υδροφιλικής μεμβράνης ή/και μέσα στην κοιλότητα ενός σωληνίσκου. Η διαδικασία εκχύλισης στη δυο-φάσεων *LPME* για τον αναλύτη A, μπορεί να παρουσιαστεί όπως φαίνεται παρακάτω:



Κατά την ισορροπία, ο λόγος διασποράς για τους αναλύτες στο σύστημα των δύο φάσεων είναι:

$$K = C_{o, eq} / C_{a, eq} \quad (2)$$

όπου  $C_{o, eq}$  είναι η συγκέντρωση ισορροπίας αναλυτών στην οργανική φάση και  $C_{a, eq}$  είναι συγκέντρωση ισορροπίας αναλυτών στην υγρή φάση.

Σύμφωνα με τη σχέση της ισορροπίας μαζών ισχύει

$$C_t V_a = C_{o, eq} V_o + C_{a, eq} V_a \quad (3)$$

όπου  $C_t$  είναι η αρχική συγκέντρωση των αναλυτών,  $V_o$  ο όγκος του οργανικού διαλύτη και  $V_a$  είναι ο όγκος του υδατικού υποστρώματος/δείγματος.

Έτσι, η *LPME* είναι μια διαδικασία ισορροπίας και μπορεί να είναι πολύ αποτελεσματική για την προσυγκέντρωση και τον εμπλουτισμό των αναλυτών. Ο παράγοντας εμπλουτισμού (Enrichment Factor, EF) ορίζεται ως ο λόγος  $C_{o, eq} / C_t$  και υπολογίζεται από τις σχέσεις (2) και (3)

$$EF = 1 / (V_o / V_a + 1 / K) \quad (4)$$

Η εξίσωση (4) δείχνει ότι για να επιτευχθεί υψηλή τιμή του EF, απαιτούνται μια χαμηλή τιμή του λόγου  $V_o / V_a$  και μια υψηλή τιμή του συντελεστή κατανομής. Η δυο φάσεων LPME μπορεί να εφαρμοστεί σε αναλύτες μέτριας ή μηδενικής πολικότητας και σε αυτούς των οποίων η πολικότητα μπορεί να μειωθεί πριν την εκχύλιση. Η κύρια απαίτηση για επιτυχή εκτέλεση αυτής της διαδικασίας είναι η μη ανάμιξη του εκχυλιστικού μέσου-διαλύτη (δέκτης) με το υδατικό μέσο (δότης). Η δυο φάσεων LPME ταιριάζει καλύτερα για ανάλυση με αέρια χρωματογραφία καθώς εκγχύεται άμεσα στο σύστημα της αέριας χρωματογραφίας, ενώ για την ανάλυση με την υγρή χρωματογραφία απαιτείται εξάτμιση του άπολου διαλύτη δέκτη και επαναφορά σε ένα υδατικό μέσο.

Οι μέθοδοι των μικροεκχλίσεων δια της υγρής φάσης για την ανάλυση των φυτοφαρμάκων σε υγρά και στερεά υποστρώματα περιλαμβάνει διάφορους τρόπους εκχύλισης. Η μικροεκχύλιση σταγόνας (*SDME, single drop microextraction*), μικροεκχύλιση σταγόνας σε υπερκείμενο χώρο (*headspace SDME* ή *HS-SDME*), η μικροεκχύλιση συνεχούς ροής (*continuous-flow microextraction, CFME*), η μικροεκχύλιση με προστασία της υγρής φάσης σε σωλινίσκο (*hollow fiber LPME*), η μικροεκχύλιση υγρού/υγρού με μεμβράνη μικροπόρων (*microporous-membrane liquid/liquid extraction, MMLLE*) και η μικροεκχύλιση με διαλύτη παρουσία μεμβράνης (*membrane-assisted solvent extraction, MASE*) είναι κάποιες από τις πιο αντιπροσωπευτικές διαδικασίες μικροεκχύλισης υγρού-υγρού, οι οποίες είναι εύκολες και γρήγορες, ενώ χρησιμοποιούν μόνο πολύ μικρές ποσότητες (μικρόλιτρα) διαλυτών. (*Lambropoulou-Albanis, 2006*<sup>37</sup>).

Η τεχνική της μικροεκχύλισης με σταγόνα (*SDME*) εφαρμόστηκε σε αρκετές εργασίες τα τελευταία 10 χρόνια, όπως για την εκχύλιση έντεκα οραγοαυλοχλωριωμένων (OSP) φυτοφαρμάκων από νερό ποταμών (*de Jager και Andrews, 2000*). Η μέθοδος της μικροεκχύλισης με απλή σταγόνα τολουόλιου έχει χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε λαχανικά, (*Amvrazi και Tsiropoulos, 2009*<sup>4</sup>) κύρια ακολουθούμενες από τη χρήση αέριας χρωματογραφίας με διάφορους ανιχνευτές (GC-ECD, GC-NPD και GC-MS).

### 3.3.2 Μικροτεχνικές εκχύλισης στον υπερκείμενο χώρο

Οι τεχνικές μικροεκχύλισης, όπως μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο (*HS-SPME*) και μικροεκχύλιση σταγόνας στον υπερκείμενο χώρο (*Headspace single drop microextraction-HS-SDME*) χρησιμοποιούνται κυρίως για την εκχύλιση περιβαλλοντικών οργανικών μικρορυπαντών μέσης ή μεγάλης πτητικότητας από υδατικά, κολλώδη, ημιστερεά και στερεά περιβαλλοντικά και βιολογικά υποστρώματα.

Οι διάφορες τεχνικές ανάλυσης υπερκείμενου χώρου μπορούν να κατηγοριοποιηθούν (*Lampropoulou et al, 2007*<sup>37</sup>) ως:

- α) διαδικασίες ενός βήματος, όπως στατική (ή σε εξισορρόπηση) ανάλυση υπερκείμενου χώρου αέριας χρωματογραφίας (*HS-GC*), όπου ένα συστατικό της αέριας φάσης σε ένα κλειστό φιαλίδιο μεταφέρεται απευθείας στην αέρια χρωματογραφία ή ανάλυση δυναμικού υπερκείμενου χώρου όταν πτητικά συστατικά αφαιρούνται με μια συνεχή ροή ενός αδρανούς αερίου και
- β) διαδικασίες δυο βημάτων, όπου οι πτητικοί αναλύτες, διαχωρίζονται πρώτα από το

υπόστρωμα από τον περιβάλλοντα αέρα του υπερκείμενου χώρου.

### **3.3.2.1 Μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο (Headspace Solid Phase Microextraction HS-SPME)**

Η μικροεκχύλιση δια της στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο (*HS-SPME*) πραγματοποιείται με ίνα, η οποία είναι επιστρωμένη με μια πολυμερή στατική φάση, και η οποία εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο πάνω από το υγρό ή στερεό υπόστρωμα του δείγματος. Η απορρόφηση των αναλυτών στην ίνα, προσθέτει μια περισσότερο εξισορροπημένη διεργασία στην ήδη υπάρχουσα μεταξύ του δείγματος στο φιαλίδιο και της αέριας φάσης του περιβάλλοντα χώρου.

Το κλειδί του προβλήματος, όταν εφαρμόζεται η *HS-SPME*, παραμένει η ανάπτυξη της μεθόδου, κατά την οποία πρέπει να ληφθούν πολλοί παράγοντες υπόψη εξαιτίας των διαφόρων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών των συστατικών που περιέχονται. Η κύρια απόφαση του αναλυτή είναι η επιλογή του καλύτερου προσροφητικού υλικού. Διάφοροι τύποι στατικής φάσης έχουν δοκιμαστεί για αυτό το σκοπό, όπως πολυακρυλική (*PA*), πολυδιμεθυσιλοξάνιο (*PDMS*), κηροί άνθρακας-πολυδιμεθυσιλοξάνιο (*CAR-PDMS*), πολυδιμεθυσιλοξάνιο-διβινυλοβενζόλιο (*PDMS-DVB*). Οι περισσότερες από τις *HS* εκχυλίσεις γίνονται με *PDMS* ίνα με στατική φάση πάχους 100 μm, η οποία εμφανίζει μεγαλύτερη ικανότητα για άπολα μίγματα και μπορεί να συλλέξει αποτελεσματικά διάφορα συστατικά από το αέριο περιβάλλον του δείγματος. Ως επόμενο βήμα, θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν οι συνθήκες στο φιαλίδιο. Τα πρόσθετα αλάτων, το pH, οι θερμοκρασίες εκχύλισης, η αναλογία του υπερκείμενου χώρου με το δείγμα και ο χρόνος επώασης είναι σημαντικοί παράγοντες για να πετύχει κανείς τη μεγαλύτερη απόδοση της εκχύλισης. Επίσης, ο χρόνος και η θερμοκρασία εκρόφησης των αναλυτών από την ίνα εξαρτώνται από την πτητικότητα του αναλύτη και από το πάχος της επίστρωσης, το οποίο κυμαίνεται μεταξύ 7 μm και 100μm.

### **3.3.2.2. Μικροεκχύλιση μιας σταγόνας στον υπερκείμενο χώρο (Headspace single drop microextraction, HS-SDME)**

Η μικροεκχύλιση με σταγόνα στον υπερκείμενο χώρο (*HS-SDME*), είναι ένας άλλος συνδυασμός της ιδέας της μικροσταγόνας. Στην *HS-SDME* οι πτητικές ουσίες του διαλύματος δότη μετά την πτητικοποίησή τους βρίσκονται στον χώρο πάνω από το διάλυμα και συλλέγονται από τη σταγόνα που βρίσκεται στον υπερκείμενο του διαλύματος χώρο, αποφεύγοντας έτσι την παρέμβαση του υποστρώματος. Σήμερα υπάρχει περιορισμένος αριθμός δημοσιεύσεων στη βιβλιογραφία που αναπτύσσουν και εφαρμόζουν την τεχνική αυτή. Οι περισσότερες εργασίες επικεντρώνοντας σε πτητικά συστατικά, όπως είναι οι αλκοόλες, χλωροβενζόλια, φαινόλες, αμίνες, τριαλογονομεθάνια και τα BTEX (βενζόλιο, τολουόλιο, αυθυλοβενζόλιο και ξυλένιο). Τα φυτοφάρμακα είναι συνήθως μέσης πτητικότητας ουσίες και γι' αυτό το λόγο απαιτούν πιο αποτελεσματικές συνθήκες από τις πτητικές ουσίες, ώστε να προσυγκεντρωθούν στον υπερκείμενο χώρο με την τεχνική headspace. Παρόλα αυτά, ακολουθώντας τις εφαρμογές της τεχνικής *HS-SPME* στον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και με δεδομένο ότι η *HS* έχει το πλεονέκτημα του χρόνου ισορροπίας πριν την εκχύλιση, η συνδυασμένη τεχνική *HS-SDME* θα μπορούσε

να εφαρμοστεί στην ανάλυση φυτοφαρμάκων εφαρμόζοντας ήπια θέρμανση, ανάδευση και πιθανώς τροποποίηση του υποστρώματος. Οι μέθοδοι της *HS-SDME* είναι ακόμα στα αρχικά επίπεδα ανάπτυξης, αλλά τα αποτελέσματα που ήδη έχουν αποκτηθεί (οργανοχλωριωμένα και οργανοφωσφορικά) είναι ενθαρρυντικά και πολλά υποσχόμενα όσον αφορά την εφαρμογή της τεχνικής σε αυτό το πεδίο. (Lambropoulou et al, 2007<sup>37</sup>).

Για τους παραπάνω λόγους επιλέχτηκε και το θέμα της παρούσας εργασίας ώστε να δοκιμαστεί η ανάπτυξη της τεχνικής της μικροεκχύλισης μιας σταγόνας σε υπερκείμενο χώρο με στόχο τον προσδιορισμό μιας σειρά φυτοπροστατευτικών ουσιών διαφορετικών ομάδων σε ένα υγρό υπόστρωμα, όπως είναι το μέλι.

### **3.3.3 Εκτίμηση των παραγόντων που επηρεάζουν την LDME στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων**

Η ανάπτυξη μιας συγκεκριμένης διαδικασίας για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων με την τεχνική της *LPME* (συμπεριλαμβανομένης της *SDME*) απαιτεί συνήθως την εκτίμηση μεταβλητών που σχετίζονται με το βήμα της εκχύλισης, όπως

- ο Τα χαρακτηριστικά της φάσης του δέκτη (acceptor phase)
- ο Τους όγκους του διαλύματος δότη (donor solution) και του δέκτη(acceptor)
- ο Το χρόνο έκθεσης της σταγόνας
- ο Την ένταση της ανάδευσης του διαλύματος δότη
- ο Την τιμή της ιονικής ισχύος του διαλύματος δότη
- ο Την τιμή pH του διαλύματος δότη
- ο Τη θερμοκρασία του διαλύματος δότη

#### **3.3.3.1 Χαρακτηριστικά του δέκτη (acceptor phase) στην LPME**

Ο τύπος του οργανικού διαλύτη στην *SDME* είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για την αποτελεσματική προσυγκέντρωση των ουσιών στόχου. Όπως στη συμβατική τεχνική *LLE*, η αρχή «όμοια διαλύουν όμοια», εφαρμόζεται και εδώ. Ο μη αναμίξιμος διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί, θα πρέπει να πληρεί κάποιες απαιτήσεις, όπως υψηλή διαλυτική ικανότητα για της ουσίες στόχους, χαμηλή διαλυτότητα στο νερό και συμβατότητα με το σύστημα της χρωματογραφίας που θα χρησιμοποιηθεί. Διάφορα είδη οργανικών διαλυτών ή μίγματα διαφορετικής πολικότητας, σημείου ζέσεως και διαλυτότητας στο νερό έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των επιδράσεων εμπλουτισμού τους σε διάφορες διαδικασίες *LPME*. Διαλύτες όπως n-εξάνιο, 1-οκτανόλη, τετραχλωράνθρακας, χλωροβενζόλιο, ενδεκάνιο, 1-χλωροβουτάνιο και κυκλοεξάνιο έχουν χρησιμοποιηθεί στην *LPME* για την ανάλυση φυτοφαρμάκων. Το τολουόλιο φαίνεται να είναι το πιο κοινό στη χρήση, διότι δίνει υψηλή διαλυτότητα στις ουσίες στόχους, είναι μη αναμίξιμο με το νερό και σταθερό στο χρόνο της εκχύλισης και παρουσιάζει καλή ακινητοποίηση στους πόρους της HF και (Shen G et al, 2002, Arthur CL et al, 1990, Basheer C et al, 2005, Lambropoulou DA et al, 2004, Pan HJ et al, 2004, Basheer C et al, 2004, Basheer C et al, 2003, Basheer C et al, 2002, Zhao E et al, 2006, Xiao Q et al, 2005, Lambropoulou DA et al, 2004). Το εξάνιο έχει χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση μη πολικών συστατικών, όπως οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα σε νερό, διότι επηρεαζόταν λιγότερο από τη διάρκεια της εκχύλισης (Zhao et al, 2003). Επίσης χρησιμοποιήθηκε το εξάνιο και στον προσδιορισμό του οργανοφωσφορικού φυτοφάρμακου



phoxim σε δείγματα νερού (Liang et al, 2005). Επίσης ο τετραχλωράνθρακας έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην εκχύλιση οργανοφωσφορικών, απλά είναι πιο επιρρεπής στο να διαλυθεί όταν χρησιμοποιούνται μεγάλοι χρόνοι εκχύλισης. Η οκτανόλη και το κυκλοεξάνιο έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών, τριαζινών και οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων. (Schellin et al, 2005, Yuin et al, 2006, Lüpez-Blanco et al, 2003, Liu et al 2004). Το ενδεκάνιο καθώς και αιθέρες (n-hexyl ether και dihexyl ether) έχουν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με *SLME* εκχύλιση και σύστημα HPLC για τον προσδιορισμό καταλοίπων φυτοφαρμάκων.

Μια ομάδα διαλυτών με δυναμικότητα στην *LPME* είναι τα ιοντικά υγρά. Παρόλη τη δεδομένη ικανότητα τους να εκχυλίζουν περισσότερο πολικούς αναλύτες, χρησιμοποιούνται και στις δυο μεθόδους μικροεκχύλισης υγρής φάσης, τόσο στην απευθείας όσο και σε αυτήν του υπερκείμενου χώρου για τον προσδιορισμό οργανικών μικρορυπαντων, όπως PAH, αλκυλοφαινολικά συστατικά και χλωροανιλίνες (Liu et al, 2003).

### 3.3.3.2 Όγκοι του διαλύματος δότη (*V donor solution*) και του δέκτη (*acceptor*)

Η αναλογία του δείγματος προς τη σταγόνα του διαλύτη, είναι υψίστης σημασίας για την *LPME*. Έτσι, μετά την επιλογή του οργανικού διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί ως δέκτης στην σταγόνα (*acceptor phase*), το δεύτερο βήμα είναι να ορισθούν οι όγκοι τόσο του προς εκχύλιση δείγματος (διαλύματος δότη – *donor solution*) μέσα στο φιαλίδιο όσο και αυτός της σταγόνας (διάλυμα δέκτης).

Λίγες μελέτες έχουν ασχοληθεί με την εκτίμηση του όγκου του δότη, προσαρμόζοντας οι περισσότερες από τις εργασίες τον όγκο του δείγματος στα 5ml. Όσον αφορά τον όγκο της σταγόνας, αυτός εξαρτάται από την διαδικασία της *LPME* που θα χρησιμοποιηθεί και από την αναλυτική τεχνική που θα εφαρμοστεί. Για παράδειγμα, στη διαδικασία της *SDME* χρησιμοποιούνται όγκοι μικρότεροι από 3μl, λόγω της αστάθειας της μικροσταγόνας σε μεγαλύτερο όγκο, καθώς επίσης και της συμβατότητας με τα όργανα της αέριας χρωματογραφίας. Στην *HF-LPME* διαδικασία, ο όγκος του δείγματος που εισέρχεται μέσα στο σωλήνα είναι 3-7 μl (Lampropoulou et al, 2007<sup>35</sup>).

### 3.3.3.3 Χρόνος έκθεσης

Όπως ήδη έχει αναφερθεί, η *LPME* περιλαμβάνει δυναμικό διαχωρισμό των ουσιών στόχου ανάμεσα στη σταγόνα και στο υδατικό δείγμα και η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης εξαρτάται από τη μεταφορά του αναλύτη από την υδατική φάση στην οργανική. Γενικά, η εκχύλιση αυξάνει όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος έκθεσης. Επειδή η *LPME* δεν είναι μια εξαντλητική τεχνική, δεν είναι πάντα εύκολο να ρυθμιστεί ο χρόνος έκθεσης με το χρόνο ισορροπίας, γιατί η δυναμικότητα του διαλύτη μειώνεται λόγω της αύξησης της δυσδιαλυτότητας του με τον χρόνο. Έτσι, οι χρόνοι έκθεσης σπάνια ρυθμίζονται στο σημείο ισορροπίας, αλλά σε σημείο όπου η ευαισθησία και η ακρίβεια είναι στα ανώτερα επίπεδα σε έναν αποδεκτό πειραματικό χρόνο. Για ανάλυση εκχύλισης φυτοφαρμάκων, οι χρόνοι εκχύλισης κυμαίνονται από 15-30 min και δεν ξεπερνάνε τα 60 min.

### 3.3.3.4 Ανάδευση

Η ανάδευση είναι μια σημαντική παράμετρος στις διαδικασίες της *SDME*. Η μάζα μεταφοράς των ουσιών στόχων στην οργανική φάση, μπορεί να αυξηθεί με ανάδευση του υδατικού δείγματος, μειώνοντας έτσι το χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί η θερμοδυναμική ισορροπία, ειδικότερα για τους αναλύτες μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Παρόλο που ο χρόνος ισορροπίας είναι αντιστρόφως ανάλογος με το ρυθμό ανάδευσης, υπερβολική ανάδευση μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το χρόνο ισορροπίας και την ακρίβεια. Για την *SDME*, ταχύτητα ανάδευσης πάνω από 600 rpm, είχε αρνητική επίδραση στην ικανότητα του διαλύτη-σταγόνα στο να εκχύλισε τις ουσίες ιδιαίτερα σε συνδυασμό με παρατεταμένο χρόνο έκθεσης (*Lampropoulou et al, 2007*<sup>37</sup>).

### 3.3.3.5 Ιονική ισχύς

Η προσθήκη άλατος, δηλαδή η αλλαγή της ιονικής ισχύος του υποστρώματος έχει μελετηθεί σχεδόν σε όλες τις εκχυλιστικές τεχνικές τόσο στην *SPME* όσο και στην *LLE*. Γενικά, η προσθήκη άλατος μπορεί να μειώσει τη διαλυτότητα των αναλυτών στο υδατικό διάλυμα και να αυξήσει την κατανομή τους στην οργανική φάση. Η επίδραση της προσθήκης άλατος έχει συζητηθεί εκτενώς καθώς έχουν προκύψει αντιφατικά αποτελέσματα. Γενικά, στις *LPME* διαδικασίες, η ιονική ισχύς δεν έχει κάποια επίδραση ή μειώνει την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης ορισμένων αναλυτών και οι περισσότερες εργασίες έχουν πραγματοποιηθεί χωρίς την προσθήκη άλατος, (*Hou L. et al, 2004, Hou L. et al, 2003, 55 Zhao L. et al, 2001, Basheer C. et al, 2005, Lampropoulou et al, 2004, Pan HJ et al, 2004, Xiao Q et al, 2005, Lampropoulou et al, 2004, Liang P et al, 2005, Wu J. et al, 2005, Zhu L. et al, 2002, Almadi F. et al, 2006*).

Μελετώντας την επίδραση της ιονικής ισχύος ενός υδατικού δείγματος στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης οι *Lampropoulou et al, 2004*, παρατήρησαν διαφορετικές τάσεις (συμπεριφορές), οι οποίες αποκάλυψαν πως εκτός από την επίδραση του άλατος, μπορεί να εμφανιστεί και μια δευτερογενής επίδραση, η οποία να είναι δυσμενής για την εκχύλιση. Με αυτή την επίδραση, η προσθήκη άλατος μπορεί να αλλάξει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της ζώνης εκχύλισης, μειώνοντας έτσι τα ποσοστά διάχυσης των αναλυτών στην οργανική φάση. Επειδή η εκχύλιση εξαρτάται από τις ιδιότητες του αναλύτη και την περιεκτικότητα του υδατικού διαλύματος σε άλας, μπορεί ένας από αυτούς τους παράγοντες να είναι σημαντικός και να αυξήσει ή να μειώσει την εκχύλιση. Είναι επίσης πιθανό αυτοί οι δυο παράγοντες να ακυρώσουν ο ένας τον άλλον και σε αυτή την περίπτωση, οι αλλαγές στην ιονική ισχύ του υδατικού διαλύματος δεν επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης. Επιπλέον, θα πρέπει να λαμβάνεται ιδιαίτερη προσοχή, όταν χρησιμοποιείται υψηλή συγκέντρωση άλατος στο υπόστρωμα δείγματος σε συνδυασμό με την ανάδευση του δείγματος, να μην παρατηρείται σχηματισμός φυσαλίδων αέρα, γεγονός που μπορεί να συμβάλει στην απώλεια της σταγόνας και/ή στην εκτόπιση του οργανικού διαλύτη.

### 3.3.3.6 Επίδραση του pH

Είναι κοινή πρακτική, να γίνεται ρύθμιση της οξύτητας των φυσικών δειγμάτων λίγο μετά τη συλλογή τους, ώστε να περιοριστεί η βιοτική και αβιοτική υποβάθμιση των οργανικών μικρορυπαντών. Υπάρχουν πολλές αναφορές, όπου οι αλλαγές του pH στα προς ανάλυση υδατικά δείγματα είχαν ως αποτέλεσμα υψηλότερη προσυγκέντρωση των αναλυτών. Στη *SDME* η ρύθμιση του pH, έγκειται στην προσπάθεια σχηματισμού της μοριακής κατάστασης των ουσιών στόχων και όχι της ιοντικής (για όξινα φυτοφάρμακα, το pH θα πρέπει να διαφέρει τουλάχιστον 2-3 μονάδες από την  $pK_a$ ). Γενικά, η σχέση μεταξύ του pH και της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης δεν έχει μελετηθεί εκτενώς και έχουν αναφερθεί αντιφατικά αποτελέσματα. Στις περισσότερες μελέτες στην ανάλυση φυτοφαρμάκων δε γίνεται ρύθμιση του pH (*Lampropoulou et al, 2007*<sup>37</sup>), ενώ στην περίπτωση που εφαρμόζεται ρύθμιση θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη και η σταθερότητα του κάθε μορίου στο συγκεκριμένο pH.

### 3.3.3.7 Θερμοκρασία

Η εκτίμηση της θερμοκρασίας εκχύλισης είναι περισσότερο σημαντική στην τεχνική εκχύλισης στον υπερκείμενο χώρο. Παρόλα αυτά, η ρύθμιση της θερμοκρασίας στις τεχνικές *SDME* δεν έχει μελετηθεί αρκετά και οι περισσότερες αναλύσεις που έχουν πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου ( $25\pm 3^\circ\text{C}$ ) στον άμεσο τρόπο. Ωστόσο, οι Zhao και Lee, 2001, μελέτησαν την επίδραση της θερμοκρασίας στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης με την τεχνική *SDME* για οκτώ οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα σε υδατικά δείγματα. Σε διαφορετικές θερμοκρασίες, μεταξύ  $23^\circ\text{C}$  και  $55^\circ\text{C}$ , παρατήρησαν ότι σε αυτή την περίπτωση είναι προτιμότερο να αυξηθεί η θερμοκρασία γύρω στους  $50^\circ\text{C}$ , ώστε να υπάρχει καλύτερη εκχυλιστική αποτελεσματικότητα. Επίσης μελέτησαν το φαινόμενο της επίδρασης της θερμοκρασίας στη μείωση της σταγόνας, παρατηρώντας ότι εξάτμιση του διαλύτη και αστάθεια της σταγόνας εμφανίζεται σε μια θερμοκρασία πάνω από τους  $50^\circ\text{C}$  (*Lampropoulou et al, 2007*<sup>37</sup>).

Με βάση τις παραπάνω μελέτες μπορούν να ειπωθούν κάποια συμπεράσματα. Παρόλο που ο χρόνος ισορροπίας και ο διαχωρισμός των αναλυτών στον δέκτη/σταγόνα είναι αντιστρόφως ανάλογος της θερμοκρασίας εκχύλισης, η υπερβολική αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη δυσδιαλυτότητα της οργανικής φάσης προκαλώντας καταστροφή της σταγόνας στην περίπτωση της *SDME*.

## 3.4 Χρωματογραφικές τεχνικές ανάλυσης

Για τον προσδιορισμό των ενώσεων στο τελικό εκχύλισμα, μετά τις διεργασίες παραλαβής και καθαρισμού στις οποίες υποβλήθηκε το αρχικό δείγμα, χρησιμοποιούνται χρωματογραφικές τεχνικές και συγκεκριμένα αέρια ή υγρή χρωματογραφία με κατάλληλους ανιχνευτές. Η επιλογή μεταξύ των μεθόδων καθορίζεται από τις χημικές ιδιότητες των προς προσδιορισμό ενώσεων. Η χρωματογραφία είναι αποτέλεσμα της σχετικής κίνησης δυο φάσεων, από τις οποίες εκείνη που μένει ακίνητη ονομάζεται **στατική** (stationary) φάση, ενώ η άλλη που μετακινείται **κινητή** (mobile). Ο μηχανισμός διαχωρισμού στηρίζεται είτε στη

διαφορετική προσρόφηση των συστατικών του μίγματος από τη στατική φάση είτε στη διαφορετική κατανομή ανάμεσα στη στατική και κινητή φάση είτε, τέλος στην ιοντοανταλλαγή. (Πολυχρονιάδου-Αληχανίδου, 1996<sup>9</sup>).

### 3.4.1 Αέρια Χρωματογραφία

Η *αέρια χρωματογραφία* (gas chromatography) είναι μια χρωματογραφία στήλης στην οποία η κινητή φάση είναι αέριο. Εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ενώσεων που μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να θερμοδιασπασθούν (Πολυχρονιάδου-Αληχανίδου, 1996<sup>9</sup>).

Στην αέρια χρωματογραφία, μικρή ποσότητα (1- 2  $\mu\text{L}$ ) από το τελικό εκχύλισμα εγχέεται στην ειδική στήλη χρωματογραφίας, η οποία είναι τοποθετημένη σε κλίβανο, ώστε το εκχύλισμα να μεταπέσει στην αέρια φάση. Μέσα στη στήλη κινείται ένα αδρανές αέριο, το οποίο παρασύρει τους ατμούς του δείγματος. Ο χρόνος κάθε ουσίας στη στήλη ( χρόνος κατακράτησης- Retention time), είναι συνάρτηση των ιδιοτήτων της ουσίας και της στήλης και αποτελεί ένα από τα κριτήρια για τον ποιοτικό προσδιορισμό της ουσίας. Για τον ποσοτικό διαχωρισμό κριτήριο αποτελεί το μέγεθος του σήματος που καταγράφεται από τους ανιχνευτές στην έξοδο της στήλης. Το σήμα καταγράφεται ως κορυφή, ενώ το ύψος ή η επιφάνεια της κορυφής χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό.

Τα βασικά μέρη ενός συστήματος αέριας χρωματογραφίας είναι οι φιάλες παροχής αερίων (οβίδες), ο εγχυτής, ο φούρνος, η χρωματογραφική στήλη, οι ανιχνευτές και το καταγραφικό (Παπαδή-Ψύλλου, 2009<sup>11</sup>).

Ο *εγχυτής* είναι το εξάρτημα μέσα στο οποίο γίνεται η έγχυση του δείγματος. Στα σύγχρονα μηχανήματα οι εγχυτές μπορεί να είναι δυο τύπων, split-splitless ή on-column. Στις τεχνικές *αέριας χρωματογραφίας* χρησιμοποιούνται πλέον τριχοειδής στήλες (capillary columns). Η επιλογή του υλικού πλήρωσης γίνεται λαμβάνοντας υπόψη τη φύση του προς διαχωρισμό αναλυτών. Συνεπώς, για τον προσδιορισμό των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων συνήθως χρησιμοποιούνται μη πολικές στατικές φάσεις, όπως οι DB-1 και DB-5. Για τον προσδιορισμό των πιο πολικών οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων χρησιμοποιούνται σχετικά πιο πολικές στατικές φάσεις όπως DB-608 ή DB-35.

Ο *ανιχνευτής* είναι το εξάρτημα που ανιχνεύει τις ουσίες κατά την έξοδο από την στήλη. Οι ανιχνευτές μπορεί να είναι εξειδικευμένοι για ορισμένα μόρια και μη εξειδικευμένοι. Οι πιο συνήθεις εκλεκτικοί ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων στην αέρια χρωματογραφία (Αμβράζη, 2007<sup>1</sup>) είναι:

- Ανιχνευτής συλλήψεως ηλεκτρονίων (Electron capture detector-ECD) για οργανοαλογονούχες ενώσεις οι οποίες περιέχουν φθόριο ή χλώριο στο μόριό τους π.χ. οργανοχλωριωμένα.
- Ανιχνευτής αζώτου φωσφόρου (Nitrogen phosphorus detector), ο οποίος είναι εξειδικευμένος για ουσίες που περιέχουν άζωτο ή φώσφορο στο μόριό τους π.χ. οργανοφωσφορικά, τριαζίνες.
- Ανιχνευτής φωτομετρίας φλόγας (Flame fotometric detector-FDP), ο οποίος με το κατάλληλο φίλτρο προσδιορίζει ουσίες που περιέχουν στο μόριό τους θείο ή φώσφορο π.χ. οργανοφωσφορικά.
- Ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας.

Το **καταγραφικό** είναι το εξάρτημα που καταγράφει το σήμα υπό μορφή κορυφής. Οι παράμετροι καταγράφονται με ηλεκτρονικό υπολογιστή, όπου καταγράφονται και οι κορυφές. Με κατάλληλο λογισμικό γίνεται η επεξεργασία των χρωματογραφικών σημάτων και προκύπτουν τελικά τα αποτελέσματα για κάθε ουσία.

### 3.4.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

Η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (*High performance liquid chromatography, HPLC*) χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων τα οποία δεν μπορούν να προσδιοριστούν με την αέρια χρωματογραφία, είτε λόγω θερμικής αστάθειας, είτε λόγω μεγάλης πολικότητας. Το κύριο πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες, οπότε χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ουσιών ευπαθών στις υψηλές θερμοκρασίες της αέριας χρωματογραφίας. Επομένως η υγρή χρωματογραφία πλεονεκτεί σε σχέση με την αέρια στον προσδιορισμό πολικών, μη πτητικών και θερμοευαίσθητων ενώσεων. Μειονεκτεί στη διακριτική ικανότητα και συνεπώς στην εξειδίκευση. Συνήθως στην ανάλυση φυτοφαρμάκων χρησιμοποιούνται στήλες αντίστροφης φάσης ( $C_8$ ,  $C_{18}$  κτλ). (Παπαδή-Ψύλλου, 2009<sup>8</sup>).

Η HPLC αποτελείται από τις φιάλες αποθήκευσης των διαλυτών (κινητή φάση), τα συστήματα απαέρωσης της κινητής φάσης, το σύστημα αντλιών, τον εγχυτή, τη χρωματογραφική στήλη, τη μονάδα θερμοστάτησης της στήλης, τον ανιχνευτή και τέλος το καταγραφικό με τη μονάδα επεξεργασίας του χρωματογραφικού σήματος. Στην υγρή χρωματογραφία η ουσία παραμένει στην ίδια φυσική κατάσταση που είχε τόσο κατά την έγχυση όσο και κατά το διαχωρισμό της στη στήλη και δεν αδρανοποιείται. Η κινητή φάση είναι υγρή (διαλύτης ή μίγμα διαλυτών και ρυθμιστικών διαλυμάτων), ενώ στην αέρια χρωματογραφία είναι αέρια.

Διακρίνουμε δυο είδη υγρής χρωματογραφίας ανάλογα με τις σχετικές πολικότητες μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης:

- Τη χρωματογραφία κατανομής φάσης (normal phase chromatography), όπου η στατική φάση είναι πιο πολική από την κινητή, με αποτέλεσμα οι λιγότερο πολικές ενώσεις να εκλύονται πρώτες και η έκλυση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με σχετική αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης και
- Τη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reverse phase chromatography), όπου η στατική φάση είναι λιγότερο πολική από την κινητή, με αποτέλεσμα οι πιο πολικές ενώσεις να εκλύονται πρώτες και η έκλυση μιας ένωσης να γίνεται ευκολότερα με σχετική μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης. (Παπαδή-Ψύλλου, 2009<sup>11</sup>)

Η πιο πρόσφατη εξελιγμένη τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων είναι ο συνδυασμός των τεχνικών υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών (*Liquid chromatography/mass spectrometry- LC/MS*). Η τεχνική συνδυάζει την εγκυρότητα της ταυτοποίησης των υπολειμμάτων που προσδίδει η φασματοσκοπία μάζας και την ευελιξία του διαχωρισμού πλήθους ενώσεων που παρέχει η υγρή χρωματογραφία ενώ η υψηλή τεχνολογία που σήμερα διαθέτει επί της τεχνικής επιτρέπει τον υψηλής ευαισθησίας ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων.

## Κεφάλαιο 4

### 4.1 Χημειομετρική προσέγγιση στη μελέτη των τεχνικών μικροεκχύλισης

Η χημειομετρία, όρος που εισείχθηκε από τον Wold, 1971, είναι «ένας χημικός κλάδος, ο οποίος χρησιμοποιεί μαθηματικά, στατιστική και τυπική λογική (formal logic), α) ώστε να σχεδιάσει ή να συλλέξει ιδανικές πειραματικές διαδικασίες, β) να εξασφαλίσει περισσότερες χημικές πληροφορίες αναλύοντας τα χημικά δεδομένα και γ) να αποκτήσει γνώση στα χημικά συστήματα».

Τα χημειομετρικά παραγοντικά πειράματα παίζουν κρίσιμο ρόλο στο να επιτύχουν την υψηλότερη ποιότητα των δεδομένων ανάλυσης, ενώ τελευταία, χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο τόσο στην εκτίμηση των αναλυτικών μεθοδολογιών, όσο και στη μελέτη τους. Μια από τις προαναφερθείσες εφαρμογές των παραγοντικών πειραμάτων είναι και στη μελέτη των διαφόρων πειραματικών παραγόντων που επιδρούν στις διάφορες τεχνικές μικροεκχύλισης και οι οποίοι θα εξασφαλίσουν μια αποδεκτή ανταπόκριση των αναλυτών σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Η πρόκληση που έχουν να αντιμετωπίσουν οι πειραματιστές είναι να αυξήσουν την κατανόηση τους στις τεχνικές της μικροεκχύλισης αποκτώντας καλύτερη αντίληψη της φύσης και της δυναμικής των χαρακτηριστικών της διαδικασίας της. Η έκβαση καθιστά δυνατή την εκτίμηση σχετικών μεταβλητών, η οποία θα οδηγήσει στην ανακάλυψη τρόπων, οι οποίοι θα βελτιώσουν τη μέθοδο.

Όλοι οι τρόποι μικροεκχύλισης απαιτούν τη χρήση μικρών όγκων κάτω από αυστηρή καθορισμένη εκχύλιση και/ή συνθήκες αντίδρασης. Ως εκ τούτου, εμπλέκεται ένας μεγάλος αριθμός μεταβλητών και λαμβάνοντας υπόψη και τη σχέση μεταξύ τους, αποκλείουν την πιθανότητα προσέγγισης της κλασσικής εκτίμησης, η οποία αποτυγχάνει να λάβει υπόψη επιδράσεις μεταξύ των μεταβλητών. Έτσι, η χημειομετρία προσφέρει μια δυνατή θεωρητική βάση για την εκτίμηση χημικών συστημάτων και διαδικασιών. Τα χημειομετρικά εργαλεία μέσω της ανάπτυξης των μαθηματικών μοντέλων μπορούν να προσδιορίσουν τη στατιστική σημαντικότητα των επιδράσεων των ανεξάρτητων μεταβλητών, οι οποίες ερευνώνται για να προσδιοριστούν οι επιδράσεις αλληλεπίδρασής τους. Εάν υπάρχουν σημαντικές αλληλεπίδρασεις μεταξύ των εξεταζόμενων μεταβλητών, οι ιδανικές συνθήκες που θα προκύψουν από τη μελέτη μιας και μοναδικής μεταβλητής (μονοπαραμετρικά) θα είναι πολύ διαφορετικές από τα «σωστά» αποτελέσματα της μελέτης των πολλαπλών μεταβλητών. Όσο μεγαλύτερες είναι οι επιδράσεις των αλληλεπίδρασεων, τόσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά όταν χρησιμοποιούνται στρατηγικές εκτίμησης μίας ή πολλών μεταβλητών μονοπαραμετρικά, και για το λόγο αυτό η εκτίμηση με πολλαπλές μεταβλητές υιοθετεί πειράματα, στα οποία τα επίπεδα όλων των μεταβλητών αλλάζουν ταυτόχρονα. Επιπλέον, η χρήση των χημειομετρικών παραγοντικών πειραμάτων στη μελέτη της μικροεκχύλισης, απαιτεί σημαντικά μικρότερο αριθμό πειραμάτων και συνεπώς απαιτεί λιγότερους πόρους (χρόνος, διαλύτες, πειραματική εργασία).

Τα σημαντικότερα σημεία για τη διεξαγωγή μιας απλής χημειομετρικής μελέτης της μικροεκχύλισης (Stalikas C., et al, 2009<sup>49</sup>) είναι:

- 1) ο ορισμός του προβλήματος και η επιλογή των κατάλληλων μεταβλητών και ανταποκρίσεων (responses) τους με τη χρήση κατάλληλων μελετών γρήγορου ελέγχου (screening),

- 2) επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού,
- 3) επιλογή των επιπέδων των μεταβλητών και κωδικοποίησή τους
- 4) εφαρμογή του κατάλληλου μαθηματικού μοντέλου,
- 5) έλεγχος επάρκειας του μοντέλου
- 6) ανάλυση του μοντέλου και εκτίμηση των επιδράσεων,
- 7) κατανομή του καλύτερου αποτελέσματος,
- 8) σωστός και δυνατός έλεγχος.

## **4.2 Επιλογή του πειραματικού μοντέλου**

Στις ακόλουθες παραγράφους περιγράφονται συνοπτικά τα σημαντικότερα παραγοντικά μοντέλα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν τις διάφορες τεχνικές μικροεκχύλισης.

### **4.2.1 $2^k$ παραγοντικά πειράματα**

Τα πιο διαδεδομένα παραγοντικά πειράματα είναι τα  $2^k$  παραγοντικά πειράματα. Το  $k$  αναφέρεται στον αριθμό των παραγόντων που συμμετέχουν στο πρόβλημα που μελετάμε και το 2 στον αριθμό των επιπέδων που έχουν οι παράγοντες αυτοί. Δηλαδή στα  $2^k$  παραγοντικά πειράματα, υπάρχουν  $k$  παράγοντες που έχουν δύο επίπεδα τιμών ένα «χαμηλό», και ένα «υψηλό». Επομένως ένα ολοκληρωμένο πείραμα αυτής της μορφής θα πρέπει να έχει τουλάχιστον  $2^k$  παρατηρήσεις.

### **4.2.2 Πλήρες παραγοντικό μοντέλο τριών επιπέδων**

Μια ακόμα κατηγορία παραγοντικών πειραμάτων, που έχουν προτιμηθεί ιδιαίτερα στη μελέτη των διαφόρων μεθόδων εκχύλισης είναι αυτά των τριών επιπέδων  $3^k$ , όπου  $k$ , ο αριθμός των παραγόντων που συμμετέχουν στο πρόβλημα που μελετάμε και τρία, τα επίπεδα τιμών της κάθε παραμέτρου που διερευνάται. Ένα τέτοιο μοντέλο μπορεί να δώσει πληροφορίες που αφορούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεταβλητών. Παρόλαυτα, αυτό το παραγοντικό μοντέλο έχει περιορισμένη εφαρμογή. Γι'αυτό το λόγο, μοντέλα τα οποία παρουσιάζουν μικρότερο αριθμό πειραματικών σημείων, όπως το *Box-Behnken*, το *Plackett-Burman*, το *Central Composite* και το *Doehlert* χρησιμοποιούνται με μεγαλύτερη συχνότητα. Αυτά τα μοντέλα ερμηνεύονται πιο εύκολα και παρόλο που δεν είναι ικανά να μελετήσουν μεγάλο εύρος παραγόντων, είναι ικανά να σημειώσουν σημαντικές τάσεις.

### **4.2.3 Μοντέλο Doehlert**

Στα μοντέλα *Doehlert*, ο αριθμός των επιπέδων δεν είναι ίδιος για όλες τις μεταβλητές. Για παράδειγμα, σε ένα μοντέλο *Doehlert* δυο μεταβλητών, η μια μεταβλητή μελετάται σε πέντε επίπεδα, ενώ η άλλη μόνο σε τρία. Αυτή η ιδιότητα επιτρέπει την ελεύθερη επιλογή των παραγόντων που θα προσδιοριστούν σε ένα μεγάλο ή μικρό αριθμό επιπέδων. Ο αριθμός των

πειραμάτων που απαιτείται (N) δίνεται από την εξίσωση  $N = k^2 + k + C_0$ , όπου k είναι ο αριθμός των μεταβλητών και  $C_0$  ο αριθμός των κεντρικών σημείων. Οι C. Aguilar et al, (1999<sup>11</sup>), χρησιμοποίησαν αυτό το παραγοντικό μοντέλο, για τον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγματα νερού με SPME και αέρια χρωματογραφία.

#### 4.2.4 Μοντέλο Box-Behnken (BBD)

Στη στατιστική, το Μοντέλο Box-Behnken (BBD) είναι ένα πειραματικό μοντέλο για μεθοδολογία επιφανειακής ανταπόκρισης (δηλαδή η εξερεύνηση της σχέσης ανάμεσα σε διάφορες μεταβλητές εξερεύνησης και μια ή περισσότερων μεταβλητών ανταπόκρισης), το οποίο επινοήθηκε από τους George E. P. Box και Donald Behnken το 1960.

Σε διάφορες μελέτες, πολλοί ερευνητές, έχουν την τάση να απαιτούν τρία εξίσου μοιρασμένα επίπεδα. Το BBD είναι μια αποτελεσματική επιλογή, (τρία επίπεδα παραγόντων), στο οποίο τα πειραματικά σημεία βρίσκονται στα μέσα σημεία των άκρων ενός κύβου και στο κέντρο (κεντρικά σημεία). Η ειδική ρύθμιση των επιπέδων του BBD, επιτρέπει τον αριθμό των πειραματικών σημείων για να αυξηθεί στον ίδιο βαθμό με τον αριθμό των συντελεστών. Η σφαιρική φύση του BBD σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το μοντέλο είναι εναλλακτικό ή σχεδόν εναλλακτικό/περιστροφικό, προτείνει ότι αρκετές κεντρικές δοκιμές πρέπει να χρησιμοποιηθούν. Ο αριθμός των πειραματικών δοκιμών (N) δίνεται από την εξίσωση  $N = 2k + (k-1) + C_0$ . Οι Sergio Luis Costa Ferreira et al (2007<sup>31</sup>) ασχοληθήκαν με αυτό το μοντέλο σε έρευνα τους.

#### 4.2.5 Μοντέλο Plackett-Burman

Όταν πρόκειται να εξεταστεί μεγάλος αριθμός παραγόντων, για να διαπιστωθεί ποιοι απ' αυτούς είναι σημαντικοί (π.χ. αυτοί που σχετίζονται με την εξαρτημένη μεταβλητή που μας ενδιαφέρει) πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένας παραγοντικός σχεδιασμός ο οποίος θα επιτρέψει τον έλεγχο των επιδράσεων των πολλών παραγόντων με τις όσο το δυνατό λιγότερες δοκιμές (runs). Ένας τρόπος για να σχεδιαστεί ένα τέτοιο μοντέλο είναι να προκληθεί αμφιβολία (confound) σε όλες τις αλληλεπιδράσεις με νέες σημαντικές «επιδράσεις». Αυτά τα μοντέλα είναι γνωστά και ως κεκορεσμένα (saturated), γιατί όλες οι πληροφορίες χρησιμοποιούνται για να εκτιμήσουν τους παράγοντες, μην αφήνοντας περιθώρια ελευθερίας στην εκτίμηση των σφαλμάτων της ANOVA. Επειδή οι προστιθέμενοι παράγοντες δημιουργούνται με εξίσωση, οι νέοι παράγοντες με τις αλληλεπιδράσεις ενός πλήρους παραγοντικού σχεδίου που θα έχει πάντα  $2^k$  δοκιμές (runs) (π.χ. 4, 8, 16, 32 κτλ.).

Οι Plackett και Burman (1946) έδειξαν πώς ένα πλήρως παραγοντικό μοντέλο μπορεί να κλασματοποιηθεί με διαφορετικό τρόπο, ώστε να δώσει κεκορεσμένα σχέδια, όπου ο αριθμός των δοκιμών είναι πολλαπλάσιος του 4, και όχι δύναμη του 2.

Οι Arambarri et al, (2004<sup>12</sup>) εφάρμοσαν αυτό το παραγοντικό μοντέλο για τον προσδιορισμό διαλυτικότητας και BTEX με την τεχνική HS-SPME ακολουθούμενη από αέριοχρωματογραφικό προσδιορισμό των παραμέτρων (GC/FID).



#### 4.2.6 Central Composite Design (CCD)

Το *Central Composite Design (CCD)* παρουσιάστηκε από τους Box και Wilson, 2002. Το σχέδιο αυτό εμπεριέχει ένα δυο-επιπέδων πλήρως παραγοντικό ή κλασματικό σχεδιασμό, ένα σχεδιασμό αστεριού, στο οποίο όλα τα πειραματικά σημεία βρίσκονται σε απόσταση  $\alpha$  από το κέντρο και ένα πειραματικό σημείο στο κέντρο.

Τα κεντρικά σημεία (central runs) δίνουν πληροφορίες για την ύπαρξη καμπυλότητας του συστήματος. Με αυτή την έννοια το CCD διαθέτει ιδιότητες, όπως περιστροφικότητα και ορθογωνικότητα, ώστε να προσαρμοστεί σε δευτεροβάθμιες εξισώσεις. Συνήθως το CCD αποτελείται από μια  $2^k$  factorial run και  $2k$  axial runs και  $c_0$  κεντρικά σημεία. Ο συνολικός αριθμός των πειραματικών σημείων, δίνεται από τον τύπο  $N=2^k + 2k + c_0$ , όπου  $k$  είναι ο αριθμός των μεταβλητών και  $c_0$  ο αριθμός των κεντρικών σημείων (Stalikas C., et al, 2009<sup>49</sup>).

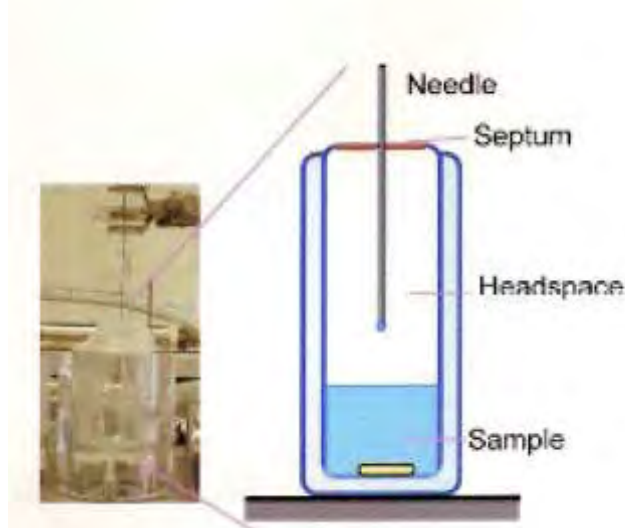
#### 4.3 Ανάλυση του μοντέλου και εκτίμηση των επιδράσεων - Pareto chart

Οι γραφικές μέθοδοι πλεονεκτούν για την ανάλυση των παραγοντικών μοντέλων, διότι απεικονίζουν εύκολα ένα ευρύ φάσμα πολύπλοκων απόψεων της σχέσης μεταξύ του μοντέλου και των δεδομένων.

Τα πιο δημοφιλή και χρήσιμα για την επισκόπηση ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων και για την παρουσίαση των αποτελεσμάτων ενός πειράματος στο κοινό που δεν έχει επαφή με τη στατιστική ορολογία, είναι τα **διαγράμματα Pareto**. Χρησιμοποιώντας τις σημαντικές επιδράσεις του διαγράμματος Pareto, το μήκος της ράβδου είναι αναλογικό με την απόλυτη τιμή της επίδρασης/παράγοντα που έχει εκτιμηθεί, ενώ μια κατακόρυφη γραμμή αναφοράς αντιστοιχεί σε ένα ειδικό εμπιστευτικό διάστημα το οποίο συνήθως ορίζεται στο 95%. Σημαντικός είναι ο παράγοντας ο οποίος υπερβαίνει αυτή τη γραμμή αναφοράς, ενώ θετικό ή αρνητικό σήμα φανερώνει τις περιπτώσεις οι οποίες είναι εμπλουτισμένες ή ελαττωμένες αντίστοιχα, όταν περνάνε από το χαμηλότερο στο υψηλότερο επίπεδο μιας συγκεκριμένης μεταβλητής. (Stalikas C., et al, 2009<sup>49</sup>)

## Σκοπός της μελέτης

Σκοπός της μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ουσιών στο μέλι με την τεχνική της μικροεκχύλισης σε μια σταγόνα στον υπερκείμενο χώρο (*Head Space Single Drop Microextraction –HS-SDME*). Η τεχνική *SDME* είναι η πιο απλή διαδικασία μικροτεχνικής εκχύλισης υγρής φάσης με χρήση σταγόνας (*SDME*) και περιλαμβάνει την απλή αιώρηση μιας σταγόνας διαλύτη από την άκρη της βελόνας μιας μικροσύριγγας μέσα στο υδατικό διάλυμα του δείγματος (*direct SDME*) ή στον υπερκείμενο χώρο (*headspace SDME*). Τυπικοί οργανικοί διαλύτες προσκολλώνται πολύ καλά στην ανοξειδωτή βελόνα, ιδιαίτερα αν η άκρη της είναι λοξότμητη, ακόμη και όταν το υδατικό διάλυμα είναι υπό ανάδευση. Η ίδια η σύριγγα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ξανά για τη λήψη σταγόνας μετά την εκχύλιση και να εισαχθεί στην αέρια χρωματογραφία για ανάλυση. Στο **Σχήμα 1**, παρουσιάζεται η τεχνική της μικροεκχύλισης σε μια σταγόνα που βρίσκεται στον υπερκείμενο χώρο, πάνω δηλαδή από το υδατικό διάλυμα (*HS-SDME*). Κατά την *HS-SDME*, οι αναλύτες περνάνε στην αέρια φάση και εκχυλίζονται στην οργανική σταγόνα του διαλύτη.



**Σχήμα 1.** Σχηματική παρουσίαση της μικροεκχύλισης στον υπερκείμενο χώρο (*HS-SDME*). Η σταγόνα του οργανικού διαλύτη εκχύλισης αιωρείται στον υπερκείμενο χώρο φιαλιδίου μέσα στον οποίο βρίσκεται το προς εκχύλιση υδατικό δείγμα. Το δείγμα μπορεί να αναδεύεται μαγνητικά ή/και να θερμοστατείται.

Από μελέτες που έχουν γίνει, έχει διαπιστωθεί πως οι κυριότερες ουσίες που ανιχνεύονται σε μέλι και σε προϊόντα κυψέλης ανήκουν στις ομάδες των οργανοχλωριωμένων και οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, πυρεθροειδή, καθώς επίσης και άλλα ακαρεοκτόνα, μυκητοκτόνα – *phenyl pirazole*, *p-DCB paramoth* (εντομοκτόνο) (*Piasenzotto et al 2002*, *Tsigouri et al 2003*, *C. Sanchez- Brunete et al 2008*, *Lu. C. and Buddhadasa 2008*). Από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, αρχικά δημιουργήθηκε μια λίστα δραστικών ουσιών φυτοφαρμάκων που έχουν προσδιοριστεί στο μέλι και σε άλλα προϊόντα κυψέλης και από αυτά επιλέχθηκαν να μελετηθούν, τα *diazinon*, *lindane*, *chlorpyrifos methyl*, *alpha endosulfan*, *DDT 4-4* και *beta endosulfan*. Στην τελική αυτή επιλογή των ενώσεων καθοριστικό ρόλο έπαιξαν οι φυσικοχημικές ιδιότητές τους, η εκλεκτικότητα του συστήματος αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε (αέρια χρωματογραφία, συζευγμένη με ανιχνευτή συλλήψεως/GC-μECD) στην ανάλυσή τους, η εκτεταμένη χρήση τους στη γεωργία και η συχνή αναφορά ύπαρξής τους στις μελέτες ελέγχου μελιού για ύπαρξη φυτοφαρμάκων.

Οι κύριες παράμετροι που επηρεάζουν την τεχνική *HS-SDME* είναι ο χρόνος έκθεσης της σταγόνας, η ταχύτητα ανάδευσης και η θερμοκρασία του δείγματος, το είδος και ο όγκος της σταγόνας του οργανικού διαλύτη, η ιονική ισχύς του υδατικού διαλύματος του δείγματος, το pH του υδατικού διαλύματος και η επίδραση των άλλων συστατικών του υποστρώματος στην εκχύλιση των αναλυτών. Για την ανάπτυξη του αναλυτικού προσδιορισμού που επιλέχθηκε να μελετηθεί στην παρούσα εργασία, ο προσδιορισμός των βέλτιστων τιμών των παραπάνω παραμέτρων έγινε χημειομετρικά, χρησιμοποιώντας αρχικά έναν *Plackett-Burman* παραγοντικό σχεδιασμό, για την επιλογή των παραμέτρων που επηρεάζουν περισσότερο τον προσδιορισμό των επιλεγθέντων φυτοφαρμάκων στο μέλι και ακολούθως ένα πιο ακριβές πειραματικό σχεδιασμό *Central Composite Design (CCD)* για τον προσδιορισμό των άριστων τιμών τους.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε, εκτιμήθηκε προσδιορίζοντας τα κύρια αναλυτικά χαρακτηριστικά της (τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των επιλεγθέντων αναλυτών, τη γραμμικότητα, επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου) και εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό των αναλυτών σε πέντε άγνωστα δείγματα μελιού. Τα ίδια δείγματα μελιού αναλύθηκαν και με μια κλασσική μέθοδο εκχύλισης υγρού-υγρού (*LLE*) η οποία έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση οργανοχλωριωμένων εντομοκτόνων στο μέλι (*Blasco et al* 2004) και με μια μεθοδολογία μικροεκχύλισης σε μια σταγόνα μέσα στο διάλυμα του αραιωμένου δείγματος μελιού (*SDME*) (*Tsiropoulos and Amvrazi* 2010) και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν και εκτιμήθηκαν.

## B. Πειραματικό μέρος

### Κεφάλαιο 5

#### Υλικά και μέθοδοι

##### 5.1 Υλικά

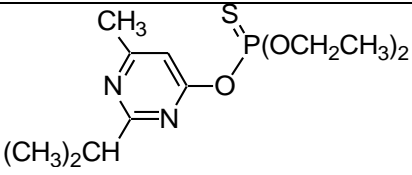
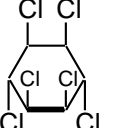
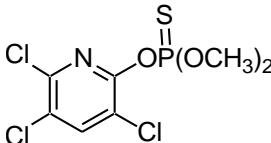
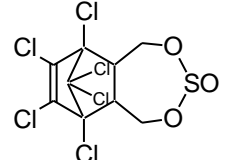
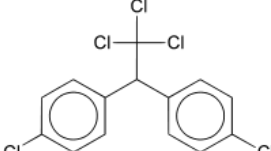
###### 5.1.1 Πρότυπες ουσίες και διαλύματα

Οι πρότυπες δραστικές ουσίες φυτοφαρμάκων που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν καθαρότητας > 95%, και αγοράστηκαν από την εταιρεία Riedel-de Haen (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany). Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα παρακαταθήκης 1000 µg/mL σε ακετόνη τα οποία φυλάσσονταν σε ερμητικά κλεισμένα φιαλίδια στους -18°C. Από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης, παρασκευάστηκε μικτό πρότυπο διάλυμα εργασίας σε ακετόνη, το οποίο ονομάστηκε *Mix HS Design* (µg/mL). Η συγκέντρωση του κάθε αναλύτη στο *Mix HS Design* (µg/mL) ήταν διαφορετική για το κάθε φυτοφάρμακο ανάλογα με την απόκριση του ανιχνευτή (µ-ECD) σε αυτό. Έτσι η συγκέντρωση του *diazinon* ήταν 40 µg/mL, του *chlorpyrifos methyl* 20 µg/mL, του *α-endosulfan* και του *β-endosulfan* 10 µg/mL και των *lindane* και *DDE 4-4* ήταν 5 µg/mL. Πιο αραιά διαλύματα του μίγματος των δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στους εμβολιασμούς των δειγμάτων, παρασκευάστηκαν με κατάλληλες αραιώσεις του *Mix HS Design* με ακετόνη. Οι δραστικές ουσίες που μελετήθηκαν και τα κύρια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους παρουσιάζονται στον **πίνακα 5.1**.

Επίσης χρησιμοποιήθηκαν:

- δεκάνιο, (CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>8</sub>CH<sub>3</sub>) από την εταιρεία Panreac, καθαρότητας 98%,
- οκτανόλη, (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>O) από την εταιρεία Panreac, καθαρότητας 98%,
- ξυλένιο, (C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) από την εταιρεία Panreac, καθαρότητας 99%,
- οκτάνιο, (C<sub>8</sub>H<sub>18</sub>) από την εταιρεία Panreac, καθαρότητας 98%,
- τολουόλιο, (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>CH<sub>3</sub>) από την εταιρεία Panreac, καθαρότητας 98%,
- ισοπροπανόλη, (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) από την εταιρεία Panreac, καθαρότητας 99%,
- ακετόνη (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O) από την εταιρεία Pestanal grade, Merck, καθαρότητας > 99%
- Isodrin, ως εσωτερικό πρότυπο, σε συγκέντρωση 0,05 ppm, από την εταιρεία Riedel-de Haen (Sigma-Aldrich, Seelze, Germany), καθαρότητας 98%
- νερό HPLC, από την εταιρεία Pestanal grade, Merck για την αραιώση των δειγμάτων

**Πίνακας 5.1 :** Φυτοφάρμακα που αναλύθηκαν και μελετήθηκαν στην παρούσα μελέτη και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά τους

<i>Δραστική ουσία</i>	<i>Χημική δομή</i>	<i>Χημική ομάδα/Χρήση</i>	<i>Βιολογικός τρόπος δράσης</i>	<i>Vapour Pressure (mPa)</i>	<i>Διαλυτότητα στο νερό (mg/L)</i>	<i>Log K<sub>ow</sub></i>
<b>Diazinon</b> (M.B. 304.3)		εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, οργανοφωσφορικό	Αναστέλλει την χολινεστεράση Συστηματικό εντομοκτόνο και ακαρεοκτόνο με επαφή και στομαχική δράση	1.2 $\times 10^1$ mPa (25 °C)	60 mg/l (20 °C)	3.30
<b>Lindane</b> (M.B. 290.8)		οργανοχλωριωμένο, εντομοκτόνο	Εντομοκτόνο μέσω επαφής, στομαχικής και αναπνευστικής οδού	4.4 mPa (24 °C)	8.52 (25 °C), 8.35 (pH 5, 25 °C) (και τα δύο mg/l)	3.5
<b>Chlorpyrifos methyl</b> (M. B. 322.5)		Ακαρεοκτόνο οργανοφωσφορικό	Αναστολέας χολινεστεράσης Δράση μέσω επαφής, στομαχικής και αναπνευστικής οδού	3 mPa (25 °C)	2.6 (20 °C)	4.24
<b>endosulfan</b> (α-endosulfan και β-endosulfan) (M.B. 406.9)		Ακαρεοκτόνο, Εντομοκτόνο, οργανοχλωριωμένο	Ανταγωνιστές του GABA	0.83 mPa (20 °C) για 2:1 μίγμα από α- and β- ισομερή	α-endosulfan 0.32, β-endosulfan 0.33 (και τα δύο στους 22 °C)	α- = 4.74 β- = 4.79 (και τα δύο σε pH 5)
<b>DDE 4-4</b> (M. B 318.02)		Εντομοκτόνο, οργανοχλωριωμένο	Εντομοκτόνο μέσω επαφής, στομαχικής και αναπνευστικής οδού	0.025 mPa (25 °C)	20 mg/l (20 °C)	6.51

### 5.1.2 Δείγματα μελιού

Για την ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας χρησιμοποιήθηκε μέλι ανθέων το οποίο βρέθηκε να είναι απαλλαγμένο από τις φυτοπροστατευτικές ουσίες που επιλέχθηκαν να αναλυθούν. Η αποτελεσματικότητα της *HS-SDME* μεθόδου που αναπτύχθηκε, ελέγχθηκε με την εφαρμογή της σε 5 εμπορικά δείγματα μελιού (**Πίνακας 5.2**). Τα ίδια δείγματα αναλύθηκαν για την ύπαρξη των ίδιων φυτοπροστατευτικών ουσιών με την εφαρμογή άλλων δυο αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού τους, μιας μεθόδου *SDME* και μιας *LLE*.

**Πίνακας 5.2** Εμπορικά δείγματα μελιού

Αριθμός	Είδος
1.	Μέλι Ανθέων
2.	Μέλι από άνθη πορτοκαλιάς
3.	Μέλι από άνθη ευκάλυπτου
4.	Κωνοφόρα και Άνθη
5.	Μέλι Ανθέων

### 5.1.3 Εξοπλισμός που χρησιμοποιήθηκε

#### 5.1.3.1 Όργανα και συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν στην προκατεργασία των δειγμάτων

- Σιφόνια πλήρωσης των 2, 3 και 4 ml
- Ποτήρια ζέσεως των 10 ml
- Ανοξειδωτά κουτάλια για την λήψη υποστρώματος και ανοξειδωτή ράβδο για την ομογενοποίηση των υδατικών διαλυμάτων μελιού
- Γυάλινα φιαλίδια των 12 mL, σφραγισμένα με βιδωτό καπάκι και PTFE-silicon septum (Supelco)
- Όργανο στήριξης
- Transsonic 460/H
- Thermoplate Nuova stir plate
- Ζυγός Sartorius
- 10-mL σύριγγα Hamilton, μοντέλο 701N, με λοξότμητη άκρη βελόνας (length: 51mm, i.d.: 0.13mm)
- Συσκευή φυγοκέντρισης
- Περιστροφικός εξατμιστήρας (Rotary evaporator)
- Γυάλινοι φυγοκεντρικοί σωλήνες για τη φυγοκέντριση

### **5.1.3.2 Σύστημα χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των φυτοπροστατευτικών ουσιών**

Σύστημα αέριας χρωματογραφίας της Hewlett Packard, μοντέλο 6890, με ανιχνευτή συλλήψης ηλεκτρονίων (μECD) και χρωματογραφική στήλη (25 mm x 250 μm x 22 μm) τύπου BPX-5 (5% Phenyl-Polysilphenylene-Siloxane).

Οι συνθήκες λειτουργίας του συστήματος της αέριας χρωματογραφίας ήταν οι ακόλουθες:

- Εγχυτής δείγματος σε λειτουργία «pulsed-splitless»
- Θερμοκρασία εγχυτή: 260 °C
- Όγκος έγχυσης δείγματος: 1 μl
- Θερμοκρασία ανιχνευτή: 310 °C
- Αέρια ανιχνευτή: H<sub>2</sub> (3,3 mL/min), Air (60 mL/min), make up He
- Φέρον αέριο: Ήλιο, με ροή 1 ml/min
- Θερμοκρασιακό πρόγραμμα ανάλυσης: αρχική θερμοκρασία φούρνου στους 70 °C και διατήρηση της για 2 min. Αύξηση με ρυθμό ανόδου 20 °C/min μέχρι τους 200 °C και διατήρηση της για 7 min, αύξηση με ρυθμό ανόδου 3 °C/min μέχρι τους 245 °C και διατήρηση της για 1 min. Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφικού προγράμματος ήταν 42,70 min.

## **5.2 Μέθοδοι εκχυλίσεων**

### **5.2.1 Φορτίσεις των δειγμάτων**

Οι εμβολιασμοί των δειγμάτων μελιού με τα κατάλληλα μικτά πρότυπα διαλύματα διαφόρων επιπέδων πραγματοποιήθηκαν σε ζυγισμένη ποσότητα υποστρώματος 2,0 g μελιού ή σε αραιωμένα δείγματα ζυγισμένης ποσότητας μελιού (2,0 g) με 5 ml νερό με κατάλληλη ποσότητα από το μικτό πρότυπο. Μετά τον εμβολιασμό τους τα δείγματα αφήνονταν να ισορροπήσουν για τουλάχιστον 30 min πριν την περαιτέρω κατεργασία τους.

### **5.2.2 Διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων με HS-SDME**

Για την ανάλυση των δειγμάτων μελιού για τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων, ακολουθήθηκε η παρακάτω πορεία προετοιμασίας του δείγματος στα πλαίσια της αναλυτικής μεθοδολογίας προσδιορισμού φυτοφαρμάκων:

- Ζύγιση 2,0 g μελιού μέσα σε ποτήρι ζέσεως
- Φόρτιση του δείγματος με κατάλληλη ποσότητα από ένα αραιωμένο μικτό πρότυπο διάλυμα *Mix HS Design* (τουλάχιστον κατά 20 φορές με ακετόνη)
- Αναμονή 15 min
- Προσθήκη 5 ml νερό και ομογενοποίηση με μια ανοξειδωτή ράβδο
- Προσθήκη 2,5 ml έτοιμου δείγματος στο γυάλινο φιαλίδιο όγκου 12 ml με βιδωτό

καπάκι και septum

- 10 min παραμονή του φιαλιδίου στο θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα, ώστε το δείγμα να πιάσει την επιθυμητή θερμοκρασία, 45°C, με ταυτόχρονη ανάδευση στις 1000 στροφές rpm
- Τοποθέτηση για 30 min σε συσκευή υπερήχων στους 45°C
- 10 min παραμονή του φιαλιδίου στο θερμαινόμενο μαγνητικό αναδευτήρα, με ταυτόχρονη εισαγωγή της βελόνας της μικροσύριγγας στον υπερκείμενο χώρο του δείγματος μέσα στο φιαλίδιο και αώρηση της σταγόνας του διαλύτη, 3μl δεκάνιο, στην άκρη της βελόνας, καθώς επίσης ταυτόχρονη ανάδευση στις 1000 στροφές rpm.

### 5.2.3 Διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων με LLE (υγρού-υγρού) (Blasco 2004)

- Ζύγιση 2,0 g μελιού
- Προσθήκη 25ml υδατικού διαλύματος θειϊκού νατρίου (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) συγκεντρώσεως 4%
- Ακολούθησαν τρεις διαδοχικές εκχυλίσεις με οξικό αιθυλεστέρα (8, 6, και 6 ml)
- Το δείγμα υποβλήθηκε σε φυγοκέντριση στις 3000 rpm για 10 min.
- Διήθηση της οργανικής φάσης με άνυδρο θειϊκό νάτριο
- Εξάτμιση σε περιστροφικό εξατμιστήρα και επαναδιάλυση σε 1 ml οργανικό διαλύτη

### 5.2.4 Διαδικασία εκχύλισης των δειγμάτων με SDME (Tsiropoulos and Amvrazi 2010)

- Ζυγίστηκαν 2,0 g μελιού μέσα σε ένα φιαλίδιο
- Προσθήκη 20 mL μείγματος από ακετονιτρίλιο/νερό σε αναλογία 5/95, v/v.
- Ομογενοποίηση του διαλύματος
- 5 ml του έτοιμου διαλύματος τοποθετήθηκαν σε ένα φιαλίδιο (6.5 cm ύψος× 1.8 cm πλάτος) μέσα στο οποίο υπήρχε ένα μαγνητάκι PTFE (7 mm × 2 mm) και το φιαλίδιο ήταν σφραγισμένο με ένα καπάκι και ένα PTFE silicone septum.

Το έτοιμο διάλυμα υποβλήθηκε στην ακόλουθη διαδικασία εκχύλισης SDME: Χρησιμοποιήθηκε μια μικροσύριγγα των 10 μL σύριγγα Hamilton, μοντέλο 701N, με λοξότμητη άκρη βελόνας (length: 51mm, i.d.: 0.13mm) ώστε να εισαχθεί σταγόνα ξυλενίου που περιείχε 0.125 mg/L Isodrin (I.S), στο δείγμα. Πριν από κάθε εκχύλιση, η μικροσύριγγα ξεπλενόταν τουλάχιστον 10 φορές με το διαλύτη της σταγόνας (περιείχε I.S.), με σκοπό να εξουδετερώσουμε τις φυσαλίδες στη μικροσύριγγα και στη βελόνα. Το δείγμα αναδευόταν πάνω σε ένα μαγνητικό αναδευτήρα. Ο όγκος του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε ήταν συγκεκριμένος (1.6 μL), ο οποίος με τη βοήθεια της μικροσύριγγας, εισερχόταν μέσα στο φιαλίδιο με το δείγμα. Η μικροσύριγγα στερεώθηκε σε ένα όργανο στήριξης και στη συνέχεια η βελόνα εισήλθε μέσα στο φιαλίδιο, διαπερνώντας το septum. Έτσι λοιπόν, η σταγόνα αιωρούνταν για 40 min μέσα στο δείγμα σε απόσταση 1.5 cm από την επιφάνεια του δείγματος. Το δείγμα ήταν υπό συνεχή ανάδευση στις 300 rpm.

### 5.2.5 Προσδιορισμός στο σύστημα ανίχνευσης δέσμησης ηλεκτρονίων (μECD)



- Λήψη 1 μl από τη σταγόνα
- Χρωματογραφική ανάλυση

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών ουσιών έγινε με την τεχνική του εσωτερικού προτύπου.

Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε Isodrin σε συγκέντρωση 0,05 ppm. Το εσωτερικό πρότυπο προστέθηκε στη σταγόνα του οργανικού διαλύτη που χρησιμοποιήθηκε ως εκχυλιστικό μέσο.

Γενικά, η προσθήκη εσωτερικού προτύπου βασίζεται στο ότι ο λόγος των τιμών της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου δύο ουσιών ενός διαλύματος είναι πρακτικά ανεξάρτητος από τα χαρακτηριστικά του χρησιμοποιούμενου οργάνου και τις άλλες πειραματικές μεταβλητές (π.χ. θερμοκρασία, μη ακρίβεια ενέσιμου όγκου όταν οι εκχύσεις στον χρωματογράφο πραγματοποιούνται από τον αναλυτή, συγκέντρωση πιθανών αντιδραστηρίων κ.λ.π.).

Ο ποσοτικός προσδιορισμός με τη χρήση εσωτερικού προτύπου γενικά προϋποθέτει αναλογική σχέση μεταξύ της μετρούμενης παραμέτρου  $P$  (π.χ. του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής) και της αναλυτικής πληροφορίας (συγκεντρώσεως) και για τα 2 συστατικά (αναλύτης A και εσωτερικό πρότυπο Π).

Θα ισχύει:

$$P_A = \alpha_A x_A \quad (1) \quad \text{και} \quad P_{\Pi} = \alpha_{\Pi} x_{\Pi} \quad (2)$$

$$x_A = x_{\Pi} (\alpha_{\Pi} / \alpha_A) (P_A / P_{\Pi})$$

Κατασκευάζεται καμπύλη αναφοράς με τις τιμές του λόγου των σημάτων  $P_A / P_{\Pi}$  και τις τιμές  $x$ , χρησιμοποιώντας πρότυπα δείγματα με σταθερή  $x_{\Pi}$  και μεταβλητή  $x_A$ .

Σε σχετικά ανάλογη ποσότητα αγνώστου δείγματος προστίθεται η ίδια ποσότητα εσωτερικού προτύπου  $x_{\Pi}$ , μετρείται ο λόγος  $P_A / P_{\Pi}$  και από την καμπύλη αναφοράς υπολογίζεται η τιμή του αγνώστου δείγματος.

Οι μετρήσεις  $x_A$ ,  $x_{\Pi}$ ,  $P_A$  και  $P_{\Pi}$  μπορούν να γίνουν είτε στο ίδιο στάδιο (πολαρογραφία, υγρή και αέρια χρωματογραφία), είτε μετά από μεταβολή συνθηκών του οργάνου (αλλαγή μήκος κύματος σε φλογοφωτομετρία).

### **Προϋποθέσεις**

- Να μην υπάρχει στο δείγμα το πρότυπο συστατικό
- Ανυπαρξία επιδράσεως μήτρας
- Δυνατότητα μετρήσεως και των δυο σημάτων, δείγματος και εσωτερικού προτύπου.

### **5.3 Παραγοντικά πειράματα βελτιστοποίησης της εκχύλισης HS-SDME**

Για την ανάπτυξη της μεθοδολογίας προσδιορισμού των έξι φυτοφαρμάκων στο μέλι με την τεχνική της HS-SDME, χρησιμοποιήθηκαν δυο χημειομετρικά παραγοντικά πειράματα, ακολουθώντας αρχικά το *Plackett-Burman design* για την επιλογή των σημαντικότερων

παραμέτρων που επιδρούν στην εκχύλιση και ακολούθως το *Central Composite Design (CCD)* για τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας με τη ρύθμιση των σημαντικότερων παραμέτρων. Η ανάπτυξη και η ανάλυση των πειραματικών σχεδιασμών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του στατιστικού πακέτου Statistica 7.

## Κεφάλαιο 6

### Αποτελέσματα και συζήτηση

Η *HS-SDME* είναι μια διαδικασία εκχύλισης, κατά την οποία η απομόνωση των αναλύτων από ένα υγρό δείγμα το οποίο βρίσκεται σε ένα κλειστό χώρο (π.χ. μέσα σε ένα φιαλίδιο) γίνεται στην αέρια φάση του υπερκείμενου χώρου σε μια σταγόνα οργανικού διαλύτη που αιωρείται στην άκρη της βελόνας. Οι παράγοντες που επηρεάζουν έναν συγκεκριμένο αναλυτικό προσδιορισμό με τη χρήση της *HS-SDME* περιγράφονται ακολούθως:

1. η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη ως σταγόνα,
2. ο όγκος της σταγόνας,
3. η θερμοκρασία,
4. η ανάδευση,
5. η αραίωση του δείγματος,
6. η ποσότητα του δείγματος μέσα στο φιαλίδιο,
7. η ιονική ισχύς και το pH του δείγματος και
8. ο χρόνος έκθεσης της σταγόνας στον υπερκείμενο χώρο.

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως σταγόνα στον προσδιορισμό των επιλεγμένων δραστικών ουσιών στο μέλι, η επιλογή του κατάλληλου όγκου της σταγόνας και ο χρόνος έκθεσης της σταγόνας στον υπερκείμενο χώρο, καθορίστηκαν μονοπαραμετρικά σε πρώτη φάση κυρίως λόγω του ότι η επιλογή τους ήταν περιορισμένη στις φυσικοχημικές ιδιότητες του οργανικού διαλύτη που θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως σταγόνα.

Η μελέτη των άλλων παραγόντων πραγματοποιήθηκε σε δεύτερη φάση με τη βοήθεια ενός *Plackett-Burman* πειραματικού σχεδιασμού ο οποίος χρησιμοποιήθηκε για την εύρεση των παραγόντων που επηρεάζουν περισσότερο την τεχνική στην ανάκτηση των επιλεγμένων ενώσεων και την ακόλουθη βελτιστοποίηση των τιμών των παραγόντων που επηρεάζουν σημαντικά την *HS-SDME* με την χρήση πιο εξειδικευμένων πειραματικών σχεδιασμών όπως των *Central Composite Designs*. Η βηματική αυτή ανάπτυξη της *HS-SDME* αναλυτικής μεθοδολογίας, παρουσιάζεται στις επόμενες παραγράφους.

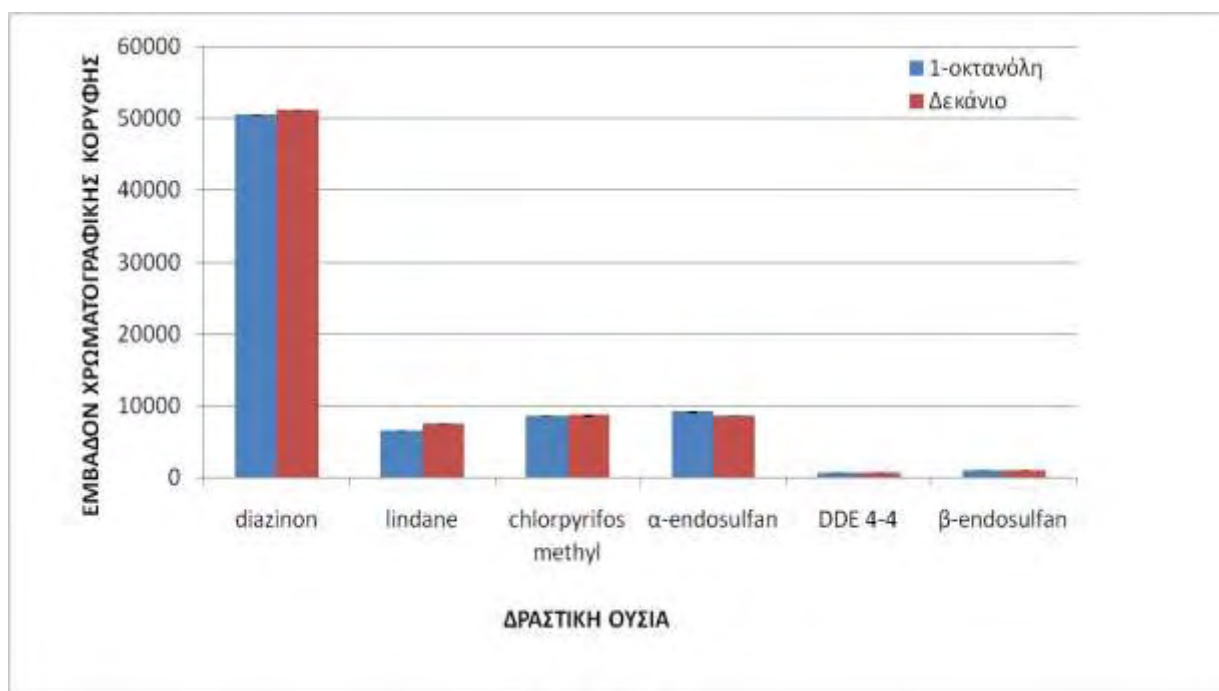
#### 6.1 Επιλογή του διαλύτη και του όγκου σταγόνας διαλύτη (δέκτη, acceptor)

Το πρώτο βήμα της μεθόδου ήταν η επιλογή του κατάλληλου οργανικού διαλύτη, ως σταγόνα εκχύλισης. Ο κατάλληλος διαλύτης που θα χρησιμοποιηθεί στη σταγόνα εκχύλισης, θα πρέπει να έχει μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα στην ουσία στόχου. Συνήθως χρησιμοποιούνται διαλύτες με υψηλό σημείο ζέσεως όπως το δωδεκάνιο, δεκάνιο, ξυλένιο κτλ. Στη συγκεκριμένη εργασία, οι διαλύτες που δοκιμάστηκαν ήταν η 1-οκτανόλη με σημείο ζέσεως 195 °C, το δεκάνιο με σημείο ζέσεως 174.1 °C, το ξυλένιο με σημείο ζέσεως 138.5 °C, το οκτάνιο με σημείο ζέσεως 125.52 °C, το τολουόλιο σημείο ζέσεως 110.6 °C, μίγμα δεκανίου με ισοπροπανόλη 9:1 και μίγμα ξυλένιου με δεκάνιο 1:1. Το οκτάνιο, το ξυλένιο και η ισοπροπανόλη (σημείο ζέσεως 82.4 °C) βρέθηκαν να εξατμίζονται πολύ γρήγορα, διότι το σημείο ζέσεώς τους είναι χαμηλότερο σε σύγκριση με τους άλλους διαλύτες. Επίσης, υπήρχε

μια αποσταθεροποίηση των διαλυτών αυτών με την αύξηση της θερμοκρασίας. Τελικά, το δεκάνιο και η 1-οκτανόλη, ήταν οι διαλύτες που παρουσίασαν τη μεγαλύτερη σταθερότητα στη θερμοκρασία.

Έγιναν δοκιμές, ώστε να επιβεβαιωθεί ποιος διαλύτης δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Έτσι λοιπόν, έγιναν φορτίσεις με ένα μικτό πρότυπο διάλυμα εργασίας, σε 2g μελιού. Τα 2g δείγματος αραιώθηκαν με 5mL νερό και το δείγμα εκχυλίστηκε με ανάδευση 1000 rpm, στους 45 °C. Ο χρόνος εκχύλισης ήταν 10 min και η παραμονή του δείγματος στο λουτρό υπερήχων ήταν για 15 min στους 45 °C. Στη μια περίπτωση χρησιμοποιήθηκε σταγόνα 3μL 1-οκτανόλης, ενώ στην άλλη 3μL δεκανίου. Για κάθε διαλύτη η εκχύλιση δοκιμάστηκε εις τριπλούν. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο **διάγραμμα 6.1**. Τα καλύτερα αποτελέσματα τα έδωσε το δεκάνιο.

Μετά την επιλογή του διαλύτη, έγινε μελέτη ώστε να επιλεγθεί ο κατάλληλος όγκος της σταγόνας μέσα στη μικροσύριγγα. Ανάμεσα στα 2, 3, 4 και 5μL, ο καλύτερος όγκος ήταν τα 3μL. Τα 4 και τα 5μL δεν στέκονταν λόγω βαρύτητας, ενώ αντίθετα τα 2μL ήταν ελάχιστα, γιατί η ποσότητα του δεκανίου που παρέμενε μετά από 15 min εκχύλιση στους 45 °C ήταν πολύ μικρότερη από 1μL.



**Διάγραμμα 6.1.** Σύγκριση των μέσων εμβαδών των χρωματογραφικών κορυφών των έξι δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν όπως υπολογίστηκαν μετά από την HS-SDME εκχύλισή τους με σταγόνα 1-οκτανόλης και δεκανίου

## 6.2 Χρόνος έκθεσης

Η HS-SDME, περιλαμβάνει την κατανομή των ουσιών στόχου, τόσο ανάμεσα στο υδατικό δείγμα και τον υπερκείμενο χώρο του δείγματος, όσο και ανάμεσα στον υπερκείμενο χώρο του φιαλιδίου και στη σταγόνα του οργανικού διαλύτη. Έτσι, η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης εξαρτάται τόσο από την αποτελεσματική μεταφορά του αναλύτη στην αέρια φάση,

όσο και την αποτελεσματική μεταφορά του από την υδατική φάση, στην οργανική. Επειδή η *HS-SDME* δεν είναι μια εξαντλητική τεχνική, δεν είναι πάντα εύκολο να ρυθμιστεί ο χρόνος έκθεσης στο χρόνο ισορροπίας, γιατί η δυναμικότητα του διαλύτη μειώνεται λόγω της εξάτμισής του με τον χρόνο. Γενικά, η αποτελεσματικότητα της εκχύλισης αυξάνει όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος έκθεσης. Στη συγκεκριμένη μελέτη ο χρόνος έκθεσης της σταγόνας στον υπερκείμενο χώρο του διαλύματος στις περαιτέρω δοκιμές για την βελτιστοποίηση της *HS-SDME* ορίστηκε στο μέγιστο χρόνο που θα διασφαλιζόταν ικανοποιητική ποσότητα δεκανίου για χρωματογραφική ανάλυση μετά την έκθεσή του σε θερμοκρασίες άνω των 45°C (έως 60 °C), δηλαδή στα 15 min. Επιπλέον, μέσω του *Plackett-Burman* παραγοντικού σχεδιασμού, μελετήθηκε η πιθανότητα αύξησης της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης με την αύξηση του χρόνου παραμονής του φιαλιδίου με το υδατικό δείγμα μελιού μέσα σε θερμοστατούμενο λουτρό υπερήχων.

### **6.3 Επιλογή και βελτιστοποίηση των σημαντικότερων παραμέτρων στον *HS-SDME* προσδιορισμό που επιλέχτηκε να μελετηθεί, με τη χρήση παραγοντικών πειραμάτων**

Η θερμοκρασία εκχύλισης (T°C), η ανάδευση του δείγματος (στροφές, rpm), ο βαθμός αραίωσης του δείγματος μελιού με νερό (V αραίωσης, ml νερού), η ποσότητα του δείγματος μέσα στο φιαλίδιο (V δείγματος, ml), η προσθήκη χλωριούχου νατρίου για την αύξηση της ιονικής ισχύος (NaCl, w/v) και ο χρόνος παραμονής του δείγματος στο λουτρό υπερήχων (T son, min) είναι οι παράμετροι που μελετήθηκαν με τη χρήση ενός *Plackett-Burman* παραγοντικού σχεδιασμού 6 παραγόντων. Τα πειράματα όπως προέκυψαν από τον *Plackett-Burman* πειραματικό σχεδιασμό, παρουσιάζονται στον **πίνακα 6.1** και πραγματοποιήθηκαν σε εμβολιασμένο δείγμα μελιού με τα επιλεγθέντα φυτοφάρμακα στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0,1 µg/mL *diazinon*, 0,0125 µg/mL *lindane*, 0,05 µg/mL *chlorpyrifos methyl*, 0,025 µg/mL *alpha endosulfan*, 0,0125 µg/mL *DDE 4,4*, και 0,025 µg/mL *beta endosulfan*. Επιλέχτηκε να γίνουν 2 πειράματα στο κεντρικό σημείο κάθε παράγοντα. Συνολικά έγιναν είκοσι πειραματικές δοκιμές όπως φαίνονται στο επιλεγμένο *Plackett-Burman Design*.

Οι τιμές που επιλέχτηκαν να μελετηθούν για κάθε παράμετρο στον *Plackett-Burman* πειραματικό σχεδιασμό προσδιορίστηκαν μετά από προσεκτική μελέτη της κάθε παραμέτρου-παράγοντα. Έτσι η μέγιστη θερμοκρασία εκχύλισης βρέθηκε μετά από δοκιμές με σταγόνα δεκανίου να είναι 60 °C, ενώ ο ρόλος της θέρμανσης αναμένεται να λειτουργεί θετικά στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης, κυρίως λόγω της συμβολής της στην εξάτμιση των αναλυτών.

Η ανάδευση είναι μια σημαντική παράμετρος στις διάφορες διαδικασίες της *LPME*. Στη *HS-SDME*, η μεταφορά των ουσιών στόχου στην αέρια φάση, μπορεί να αυξηθεί με ανάδευση του υδατικού δείγματος, μειώνοντας έτσι το χρόνο που απαιτείται για να επιτευχθεί η θερμοδυναμική ισορροπία. Παρόλο που ο χρόνος ισορροπίας είναι αντιστρόφως ανάλογος με το ρυθμό ανάδευσης, υπερβολική ανάδευση μπορεί να επηρεάσει αρνητικά το χρόνο ισορροπίας και την ακρίβεια. Για το λόγο αυτό οι τιμές που επιλέχτηκαν να μελετηθούν ήταν από 600 έως 1000 rpm.

Η αραίωση του δείγματος με νερό κρίνεται απαραίτητη τόσο για την ελαχιστοποίηση των παρεμποδίζουσων ουσιών από το υπόστρωμα, όσο και για την διευκόλυνση της μαγνητικής ανάδευσης που θεωρητικά διευκολύνει την εξάτμιση των αναλυτών. Η ελάχιστη αραίωση του δείγματος μελιού 2g που βρέθηκε να διασφαλίζει την ομοιόμορφη ανάδευση του δείγματος

ήταν με 2 ml νερό (1:1, w/w) ενώ σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με εμβολιασμένα δείγματα μελιού, η αραιώση του δείγματος πάνω από 1:5, w/w με νερό δε βρέθηκε να βελτιώνει την *HS-SDME* των επιλεγμένων φυτοφαρμάκων. Έτσι ο ελάχιστος όγκος αραιώσης του νερού επιλέχθηκε να είναι τα 2ml και ο μέγιστος τα 10ml.

**Πίνακας 6.1** *Plackett-Burman Design*

	<b>T</b> (°C)	<b>NaCl</b> (w/v)	<b>V ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</b> (ml)	<b>V ΑΡΑΙΩΣΗΣ</b> (ml)	<b>T SON</b> (min)	<b>ΣΤΡΟΦΕΣ</b> (rpm)	<b>ΔΕΙΚΤΗΣ/DUMMY</b>
1.	60	0	4	4	30	600	-1
2.	40	0	2	10	30	1000	-1
3.	60	0	2	4	0	1000	1
4. (C)	50	20	3	7	15	800	0
5.	40	0	4	10	0	600	1
6.	40	40	2	4	30	600	1
7.	60	40	4	4	0	600	1
8. (C)	50	20	3	7	15	800	0
9.	60	0	4	10	0	1000	-1
10. (C)	50	20	3	7	15	800	0
11.	60	40	2	10	0	600	-1
12.	40	40	4	4	0	1000	-1
13.	60	40	2	4	30	1000	-1
14.	40	0	2	4	0	600	-1
15.	40	0	4	4	30	1000	1
16.	40	40	4	10	30	600	-1
17.	40	40	2	10	0	1000	1
18. (C)	50	20	3	7	15	800	0
19.	60	40	4	10	30	1000	0
20.	60	0	2	10	30	600	0

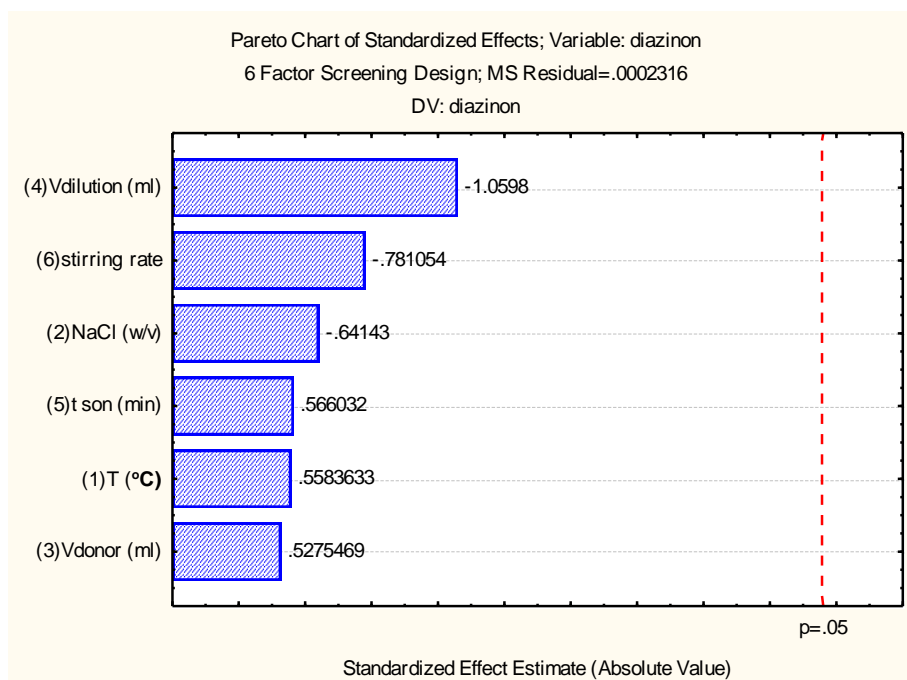
(C) = υποδηλώνει τα πειράματα στο κεντρικό σημείο των παραγόντων που μελετήθηκαν

Η αναλογία του όγκου του δείγματος προς τη σταγόνα του διαλύτη, είναι υψίστης σημασίας στις τεχνικές μικροεκχύλισης σε μια σταγόνα. Επιπλέον του καθοριστικού παράγοντα της ποσότητας των αναλυτών που υποβάλλονται στη δοκιμή και διαμορφώνουν την συγκέντρωσή τους στη σταγόνα ανάλογα με το συντελεστή κατανομής της κάθε ουσίας, στην τεχνική *HS-SDME* εισέρχεται και ο όγκος του υπερκείμενου χώρου στον οποίο βρίσκονται οι αναλύτες που θα συγκεντρωθούν στην σταγόνα του οργανικού διαλύτη. Τα φαινόμενα είναι αντιστρόφως ανάλογα στην αποτελεσματική εκχύλιση των αναλυτών με την τεχνική της *HS-SDME*. Σε δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν με εμβολιασμένα δείγματα μελιού ο όγκος του αραιωμένου δείγματος μελιού σε ποσότητα πάνω από 4 ml για το δεδομένο φιαλίδιο δε βρέθηκε να συμβάλει στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης των δραστικών ουσιών που επιλέχθηκαν να μελετηθούν, ενώ ο ελάχιστος όγκος ορίστηκε στα 2 ml ως ο ελάχιστος που μπορούσε να αναλυθεί με ακρίβεια σε αναλύσεις ρουτίνας χρησιμοποιώντας σιφώνιο πλήρωσης για την τοποθέτησή του και διασφαλίζοντας την ομαλή ανάδευση του δείγματος με το δεδομένο εξοπλισμό.

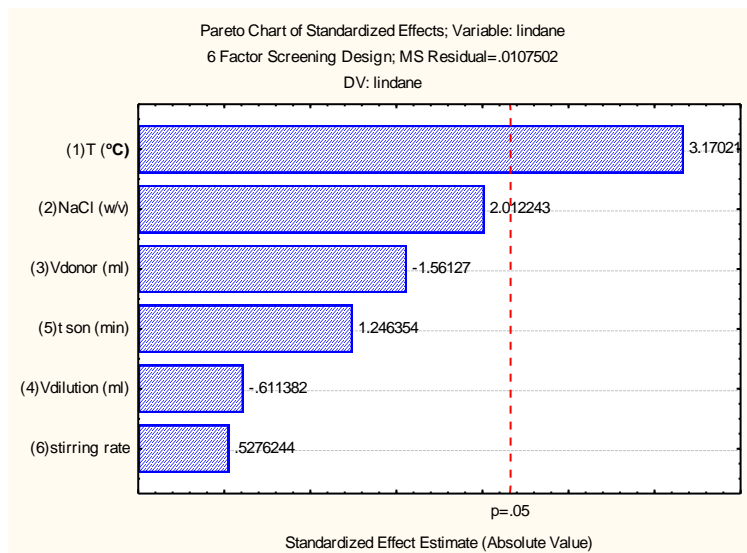
Γενικά, η αύξηση της ιονικής ισχύος, μπορεί να μειώσει τη διαλυτότητα των προς μελέτη δραστικών ουσιών στο υδατικό διάλυμα και έτσι να βοηθήσει στην εξάτμιση των αναλυτών. Αυτή η επίδραση, η οποία συνήθως μελετάται με τη προσθήκη άλατος στο υδατικό δείγμα,

έχει συζητηθεί εκτενώς και στη μελέτη της *HS-SPME*, αλλά έχουν προκύψει αντιφατικά συμπεράσματα. Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η προσθήκη NaCl στο υδατικό διάλυμα μελιού σε συγκέντρωση από 0 έως 40%, w/v. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να ειπωθεί ότι δε μελετήθηκε ο παράγοντας του pH στην εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων γιατί οι ενώσεις που μελετήθηκαν δεν αναμένεται να επηρεάζονται στις ασθενώς όξινες τιμές του pH των υδατικών δειγμάτων μελιού που υποβάλλονται στην εκχύλιση.

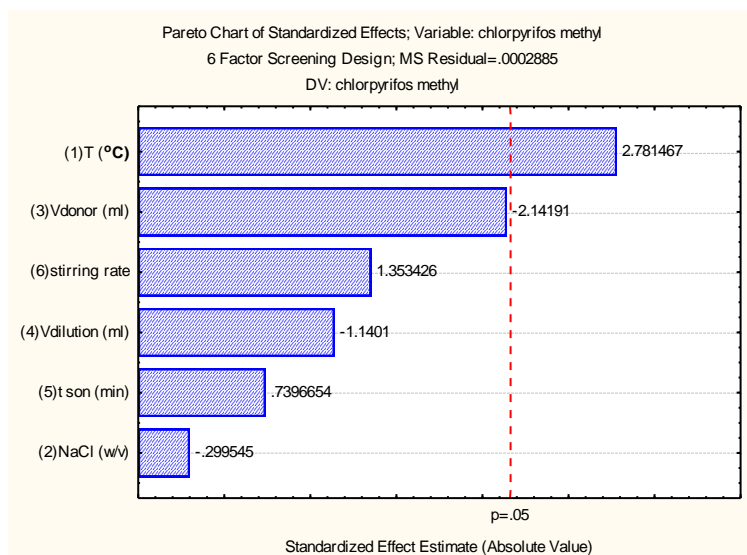
Τέλος, η πιθανότητα αύξησης της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης με την αύξηση του χρόνου παραμονής του φιαλιδίου με το υδατικό δείγμα μελιού μέσα σε θερμοστατούμενο λουτρό υπερήχων μελετήθηκε στην εκάστοτε θερμοκρασία εκχύλισης από 0 έως και 30 min. Η ανάλυση διακύμανσης τιμών του *Plackett-Burman* παραγοντικού μοντέλου που μελετήθηκε υπέδειξε ότι οι στατιστικά σημαντικοί παράγοντες ( $p > 0,05$ ) που επηρεάζουν το συγκεκριμένο προσδιορισμό με *HS-SDME* είναι η θερμοκρασία εκχύλισης και ο όγκος του υδατικού διαλύματος μελιού (διαλύματος δότη) που βρίσκεται μέσα στο φιαλίδιο. Παρακάτω παρουσιάζονται τα διαγράμματα Pareto για τα πέντε φυτοφάρμακα που μελετήθηκαν για την ανάλυσή τους με *HS-SDME* στο μέλι, όπως προέκυψαν από την ανάλυση του *Plackett-Burman design*.



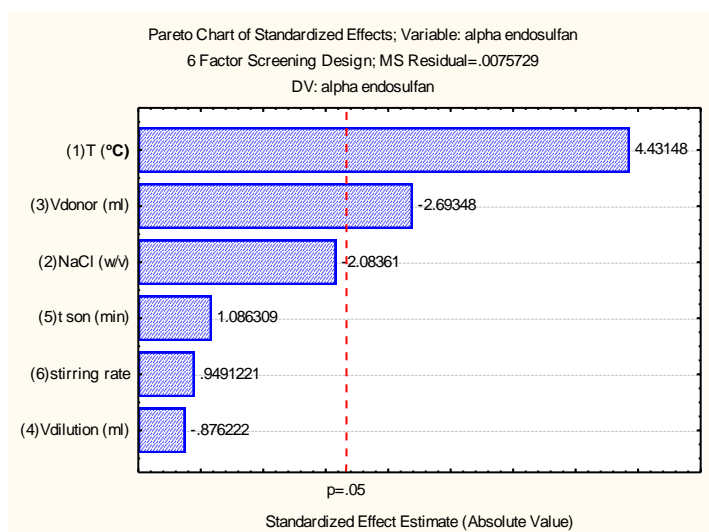
**Διάγραμμα 6.2 Pareto για το Diazinon**



**Διάγραμμα 6.3 Pareto για το Lindane**

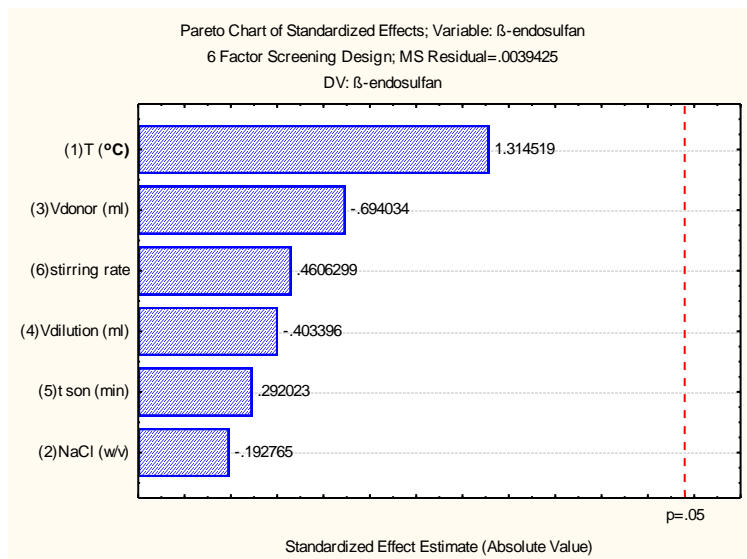


**Διάγραμμα 6.4 Pareto για το Chlorpyrifos methyl**

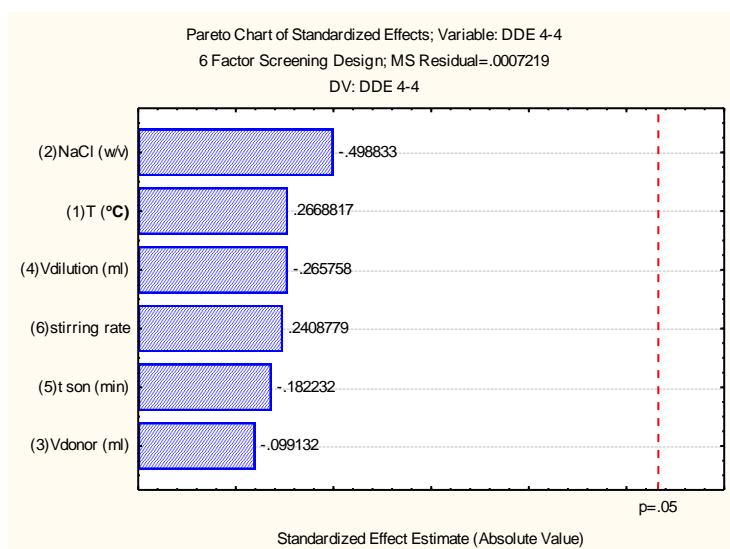


**Διάγραμμα 6.5 Pareto για το α-endosulfan**





**Διάγραμμα 6.6** Pareto για το β-endosulfan



**Διάγραμμα 6.7** Pareto για το DDE 4-4

#### 6.4 Βελτιστοποίηση των παραγόντων που βρέθηκε να επηρεάζουν σημαντικά τον HS-SDME προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων στο μέλι με την εφαρμογή

Η αύξηση της θερμοκρασίας βρέθηκε να επηρεάζει θετικά την εκχύλιση των *lindane*, *chlorpyrifos methyl* και *α-endosulfan* και έτσι επιλέχθηκε να μελετηθεί περαιτέρω με τη χρήση του *Central Composite design (CCD)*. Ωστόσο παρατηρήθηκε μια αποσταθεροποίηση της σταγόνας όσο αυξανόταν η θερμοκρασία (60 °C) και έτσι στην περαιτέρω βελτιστοποίηση του παράγοντα της θερμοκρασίας με το *CCD*, οι θερμοκρασίες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ήταν ανάμεσα στους 40-50 °C. Ο όγκος του διαλύματος δότη (V donor solution) βρέθηκε επίσης να είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την HS-SDME των φυτοφαρμάκων από το μέλι. Για τη βελτιστοποίηση αυτής της παραμέτρου στο *CCD*, επιλέχθηκε να μελετηθούν οι όγκοι από 1,5 - 2,5 ml διαλύματος δότη. Τα πειράματα που προέκυψαν από την εφαρμογή του *CCD* φαίνονται στον **πίνακα 6.2** και πραγματοποιήθηκαν σε εμβολιασμένο δείγμα μελιού το οποίο περιείχε τις επιλεγμένες

δραστικές ουσίες στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 0,1 µg/mL *diazinon*, 0,0125 µg/mL *lindane*, 0,05 µg/mL *chlorpyrifos methyl*, 0,025 µg/mL *alpha endosulfan*, 0,0125 µg/mL *DDE 4,4*, και 0,025 µg/mL *beta endosulfan*. Στον ίδιο πίνακα παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα των πειραμάτων για κάθε δραστική ουσία που μελετήθηκε, ως τα ανηγμένα εμβαδά των χρωματογραφικών κορυφών (εμβαδό δραστικής ουσίας/εμβαδό εσωτερικού προτύπου) των έξι δραστικών ουσιών μετά την ανάλυση των σταγόνων με GC-µECD. Όπως παρατηρείται στον πίνακα οι βέλτιστες τιμές της θερμοκρασίας εκχύλισης και του όγκου του υδατικού δείγματος-δότη βρέθηκαν να είναι 45°C και 2,5 ml αντίστοιχα.

**Πίνακας 6.2** Πειραματικός σχεδιασμός *Central Composite Design (CCD)* που χρησιμοποιήθηκε για την βελτιστοποίηση των τιμών την θερμοκρασίας εκχύλισης και του όγκου του υδατικού διαλύματος. Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως τα ανηγμένα εμβαδά (εμβαδό κορυφής φυτοφαρμάκου/εμβαδό εσωτερικού προτύπου) των χρωματογραφικών κορυφών από την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία (GC-μECD)

	<b>T (°C)</b>	<b>Vdonor (ml)</b>	<b>diazinon</b>	<b>lindane</b>	<b>chlorpyrifos methyl</b>	<b>α-endosulfan</b>	<b>DDE 4-4</b>	<b>β-endosulfan</b>
1.	50	1,3	0,000	0,006	0,047	0,034	0,014	0,023
2.	55	1,5	0,008	0,019	0,004	0,068	0,006	0,016
3.	55	2,5	0,015	0,049	0,003	0,101	0,007	0,018
4.	50 (c)	2(c)	0,002	0,019	0,004	0,034	0,004	0,004
5.	43	2	0,024	0,118	0,031	0,150	0,017	0,014
6.	50 (c)	2	0,013	0,066	0,007	0,120	0,014	0,020
7.	45	1,5	0,000	0,000	0,000	0,109	0,017	0,077
8.	57	2	0,002	0,012	0,005	0,041	0,004	0,013
9.	50	2,7	0,009	0,046	0,001	0,062	0,005	0,009
10.	45	2,5	0,031	0,132	0,069	0,149	0,017	0,078

( C ) = υποδηλώνει τα πειράματα στο κεντρικό σημείο των παραγόντων που μελετήθηκαν

## 6.5. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου HS-SDME που αναπτύχθηκε

Στον **πίνακα 6.3** παρουσιάζονται τα βασικά αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου που αναπτύχθηκε. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) της μεθόδου προσδιορίστηκαν πειραματικά, προσδιορίζοντας το σήμα του θορύβου και το σήμα των αναλυτών σε λευκά (blank) και σε εμβολιασμένα δείγματα μελιού με το μίγμα των αναλυτών σε χαμηλές συγκεντρώσεις, τα οποία και αναλύθηκαν με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε με τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Ως σήμα του οργάνου θεωρήθηκε το εμβαδόν των χρωματογραφικών κορυφών και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορίστηκαν ως οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στο δείγμα οι οποίες αντιστοιχούν σε σήμα ίσο με 3,3 και 10 φορές το σήμα του θορύβου αντίστοιχα. Η εκτίμηση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου που αναπτύχθηκε έγινε μέσω της σύγκρισης των εν λόγω βασικών αναλυτικών χαρακτηριστικών με τα αντίστοιχα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των ίδιων δραστικών ουσιών όπως προσδιορίστηκαν από την εφαρμογή δύο ακόμα αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού φυτοφαρμάκων στο μέλι: (α) μιας μεθόδου μικροεκχύλισης σε μια σταγόνα (SDME) και (β) μιας μεθόδου εκχύλισης υγρού υγρού (LLE). Όπως φαίνεται από τα συγκριτικά αποτελέσματα που παρουσιάζονται επίσης στον **πίνακα 6.4**, η μέθοδος που αναπτύχθηκε παρουσιάζει πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού από τα ήδη θεσπισμένα MRL από την Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ τα όρια προσδιορισμού βρέθηκαν να είναι γενικά χαμηλότερα από εκείνα που προσδιορίστηκαν με την εκχύλιση υγρού υγρού για τις περισσότερες από τις ενώσεις που μελετήθηκαν (έως και 100 φορές πιο χαμηλά για το *diazinon*) εκτός από τα *chlorpyrifos methyl* και  *$\beta$ -endosulfan* των οποίων η ανάκτησή τους δε πραγματοποιήθηκε σε ικανοποιητικό βαθμό με την τεχνική της HS-SDME που αναπτύχθηκε.

Η γραμμικότητα της μεθόδου εξετάστηκε χρησιμοποιώντας 5 συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων με το μίγμα των δραστικών ουσιών που μελετήθηκαν και κατασκευάζοντας την καμπύλη αναφοράς του λόγου των εμβαδών του αναλύτη προς το εσωτερικό πρότυπο, συναρτήσει των συγκεντρώσεων των εμβολιασμένων δειγμάτων μελιού. Οι συντελεστές συσχέτισης σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκαν  $> 0,97$  υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος είναι γραμμική στις περιοχές συγκεντρώσεων που παρουσιάζονται στον πίνακα για τον κάθε αναλυτή. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου, προσδιορίστηκε αναλύοντας με την προτεινόμενη μέθοδο, εμβολιασμένα δείγματα μελιού με το μίγμα φυτοφαρμάκων σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις και υπολογίζοντας τη σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων (% R.S.D.,  $n = 3$ ). Οι σχετικές ανακτήσεις βρέθηκαν να είναι πάνω από 70% σε όλες τις περιπτώσεις και η επαναληψιμότητα της μεθόδου κυμάνθηκε από 10,1 έως 19,4%.

**Πίνακας 6.3** Βασικά αναλυτικά χαρακτηριστικά της HS-SDME μεθόδου που αναπτύχθηκε και συγκριτικά στοιχεία των ορίων ανίχνευσης (LOD  $\mu\text{g/kg}$ ) και ποσοτικοποίησης (LOQ  $\mu\text{g/kg}$ ) τριών αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού, της HS-SDME που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία,

Δραστική ουσία	MRL ( $\mu\text{g/kg}$ )	SDME		LLE		HS-SDME			
		LOD ( $\mu\text{g/kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ )	LOD ( $\mu\text{g/kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ )	LOD ( $\mu\text{g/kg}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/kg}$ )	Περιοχή Γραμμικότητας ( $\mu\text{g/kg}$ )	R <sup>2</sup>
diazinon	δ.ο.	2,4	7,6	19,31	57,9	0,19	0,57	10-200	0,993
lindane	δ.ο.	0,05	0,2	1,73	5,2	0,44	1,33	2.5-25	0,995
chlorpyrifos methyl	δ.ο.	0,2	0,7	4,50	13,5	12,54	37,62	50-200	0,973
$\alpha$ -endosulfan	10*	0,06	0,2	0,32	0,9	0,13	0,38	2.5-50	0,997
DDE 4-4	50*	-	-	10,00	33,0	0,07	0,20	1.25-25	0,995
$\beta$ -endosulfan	10*	0,04	0,1	0,09	0,3	5,57	16,71	25-200	0,990

- = δεν προσδιορίστηκε αναλυτικά, δ.ο. = δεν έχει οριστεί.

**Πίνακας 6.4** Σχετικές ανακτήσεις και % σχετικές τυπικές αποκλίσεις όπως υπολογίστηκαν από την εκχύλιση εμβολιασμένων δειγμάτων μελιού σε διάφορες συγκεντρώσεις με την HS-SDME μέθοδο που αναπτύχθηκε

Δραστική ουσία	Φόρτιση $\mu\text{g/Kg}$	Σχετική			Φόρτιση $\mu\text{g/Kg}$	Σχετική			Φόρτιση $\mu\text{g/Kg}$	Σχετική		
		Ανάκτηση (%)	RSD (%)			Ανάκτηση (%)	RSD (%)			Ανάκτηση (%)	RSD (%)	
diazinon	50	74,50	16,2		100	91,34	15,7		200	71,47	15,60	
lindane	6	80,90	19,4		12	80,73	18,1		25	110,29	18,60	
chlorpyrifos methyl	25	*	*		50	86,01	12,4		100	85,63	11,80	
$\alpha$ - endosulfan	12,5	77,48	15,4		25	106,45	13,4		50	71,56	12,30	
DDE 4-4	6	102,00	10,1		12	92,40	11,1		25	79,78	10,40	
$\beta$ -endosulfan	12,5	*	*		25	115,17	18,2		50	73,43	16,80	

\* = κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου

Οι τιμές αυτές είναι σαφώς μέσα στα όρια των αποδεκτών (ανακτήσεις > 70% και επαναληψιμότητα < 20%) που θα πρέπει να συγκεντρώνει μια εκλεκτική και ακριβής αναλυτική μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης (Sanco 2007).

#### **6.6 Εφαρμογή της HS-SDME σε πραγματικά δείγματα μελιού**

Η HS-SDME μέθοδος που αναπτύχθηκε εφαρμόστηκε στην ανάλυση 5 δειγμάτων μελιού τα οποία αγοράστηκαν από την τοπική αγορά. Τα ίδια δείγματα αναλύθηκαν εφαρμόζοντας τις άλλες δύο μεθόδους εκχύλισης δια της υγρής φάσης που δοκιμάστηκαν. Όπως φαίνεται στον **πίνακα 6.5**, στα 3 από τα 5 δείγματα που εξετάστηκαν βρέθηκαν υπολείμματα *diazinon* και *endosulfan* σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις και σε κατά πολύ χαμηλότερα όρια από τα μέγιστα αποδεκτά MRL για το *endosulfan*. Τα αποτελέσματα επιβεβαιώθηκαν και από εκείνα που προέκυψαν εφαρμόζοντας την SDME μέθοδο στα ίδια δείγματα η οποία και παρουσίασε χαμηλότερα LOD και LOQ από την HS-SDME. Ωστόσο με την εφαρμογή της μεθόδου SDME στα δείγματα προσδιορίστηκε επιπλέον και το β-*endosulfan* το οποίο παρουσίασε υψηλά όρια LOD και LOQ με την HS-SDME που αναπτύχθηκε. Η LLE εκχύλιση που δοκιμάστηκε αποδείχθηκε αποτελεσματική στον προσδιορισμό των *diazinon* και β-*endosulfan* ενώ τα όρια προσδιορισμού του α-*endosulfan* ήταν αρκετά υψηλά για την ανίχνευση των επιπέδων ύπαρξής του στα δείγματα μελιού.

**Πίνακας 6.5** Αποτελέσματα μετρήσεων σε πέντε πραγματικά δείγματα μελιού με τρεις διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης: την HS-SDME που αναπτύχθηκε, την εκχύλιση SDME που προτάθηκε από τους Tsiropoulos and Amvrazi 2010 (In press) και την LLE που προτάθηκε από τους Blasco et al. 2004

Δραστική Ουσία	Μέθοδος εκχύλισης	Δείγμα					LOQ (µg/kg)	MRLs (µg/kg)
		1	2	3	4	5		
Diazinon	HS-SDME	12.2	δ.π.	6.9	δ.π.	δ.π.	0.6	δ.ο.
	SDME	13	δ.π.	*	δ.π.	δ.π.	7.6	
	LLE	*	δ.π.	*	δ.π.	δ.π.	57.9	
Lindane	HS-SDME	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	1.3	δ.ο.
	SDME	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.2	
	LLE	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	5.2	
chlorpyrifos methyl	HS-SDME	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	37.6	δ.ο.
	SDME	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.7	
	LLE	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	13.5	
α-endosulfan	HS-SDME	*	*	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.4	10*
	SDME	0.23	*	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.2	
	LLE	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.9	
DDE 4-4	HS-SDME	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	0.2	
	SDME	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	-	
	LLE	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	33	
β-endosulfan	HS-SDME	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	δ.π.	16.7	10*
	SDME	0.33	*	0.15	δ.π.	δ.π.	0.1	
	LLE	0.5	δ.π.	*	δ.π.	δ.π.	0.3	

\* = κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου

δ.π. = δεν προσδιορίστηκε (<LOD)

- = δεν προσδιορίστηκε αναλυτικά

δ.ο. = δεν έχει οριστεί.

## **ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

### **A. Ελληνική βιβλιογραφία**

1. **Αμβράζη Ελπινίκη**, «Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας και εφαρμογή της στον προσδιορισμό επιλεγμένων φυτοφαρμάκων στην ελιά και το ελαιόλαδο κατά τη διαδικασία παραγωγής του», Διαδακτορική Διατριβή, 2007, σελ. 1-2, 6-9, 102-103, 119
2. **Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α.**, «Γεωργική Φαρμακολογία», Εκδόσεις Σταμούλη, 2010.
3. **Θρασυβούλου Ανδρέας**, «Τεχνολογία Προϊόντων Μέλισσας», Πανεπιστημιακές Εκδόσεις, 2003, σελ. 32-37
4. **Κανονισμός (ΕΚ) 2001/110**, «Ποιοτικά χαρακτηριστικά μελιού»
5. **Κανονισμός (ΕΚ) 2377/90**, «Θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης»
6. **Κανονισμός (ΕΚ) 396/2005**, «Ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα ή πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωϊκής προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου»
7. **Κανονισμός (ΕΚ) 2003/181**, «Για την τροποποίηση της απόφασης 2002/657/ΕΚ όσον αφορά τον καθορισμό των ελάχιστων απαιτούμενων ορίων επίδοσης (MRPL) για ορισμένα κατάλοιπα σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης»
8. **Κανονισμός (ΕΚ) 2002/657**, «Για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων»
9. **Κουϊμτζη Θ., Φυτιάνου Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ.**, «Χημεία περιβάλλοντος», Εκδόσεις University studio Press, 1998, σελ. 264
10. **Μαυρομανωλάκης Κ.**, «Διάσπαση φυτοφαρμάκων στο έδαφος», Πτυχιακή εργασία, 2007, σελ. 10-12
11. **Παπαδή-Ψύλλου Ασημίνα**, «Επικύρωση και αξιολόγηση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού υπολειμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών νέας γενιάς σε γεωργικά προϊόντα με χρήση αέριας χρωματογραφίας», μεταπτυχιακή διατριβή, 2009, σελ. 31,35-41, 47-49



12. Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ευθυμία , «Γεωργικά φάρμακα, χημεία, φαρμακολογία (φαρμακοκινητική, μεταβολισμός, τρόπος δράσης), τοξικολογία, οικοτοξικολογία και συμπεριφορά και τύχη στο περιβάλλον», Μέθεξις 2008
13. Πολυχρονιάδου-Αληχανίδου Α., «Ανάλυση Τροφίμων», Εκδόσεις Γαρταγάνης, 1996, σελ. 106, 130
14. [www.melinet.gr/item/Karazafeiris\\_ypoleimmata2.pdf](http://www.melinet.gr/item/Karazafeiris_ypoleimmata2.pdf)
15. <http://www.melissokomos.gr/04012.html>

## **B. Ξενόγλωσση βιβλιογραφία**

11. **C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocrull, J. Ferré, F. Borrull and R. M. Marcé,** «*Optimization of solid-phase microextraction conditions using a response surface methodology to determine organochlorine pesticides in water by gas chromatography and electron-capture detection*», **J Chromatography A**, 844, June 1999, 425-432
12. **Arambarri I; Lasa M; Garcia R; Millan E,** «*Determination of fuel dialkyl ethers and BTEX in water using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-flame ionization detection*», 2004 **J Chromatography A**, 1033: 193-203.
13. **Ahmadi F, Assadi Y, Hosseini M, Rezaee M.,** «*Determination of organophosphorus pesticides in water samples by single drop microextraction and gas chromatography-flame photometric detection*», **J Chromatography A** 2006;1101:307-12.
14. **Amvrazi EG, Tsiropoulos NG.** «*Application of single-drop microextraction coupled with gas chromatography for the determination of multiclass pesticides in vegetables with nitrogen phosphorus and electron capture detection*», **J Chromatography A**. 2009 Apr 3;1216(14):2789-97.
15. **Amvrazi E.G., Papadi-Psyllou A.T., Tsiropoulos N.G.,** «*Pesticide enrichment factors and matrix effects on the determination of multiclass pesticides in tomato samples by single-drop microextraction (SDME) coupled with gas chromatography and comparison study between SDME and acetone-partition extraction procedure*», **Int. J. Environ. Anal. Chem.**, 2010, 90, 243-257

16. **Amvrazi E.G., Tsiropoulos N.G.**, «*Chemometric study and optimization of extraction parameters in single-drop microextraction for the determination of multiclass pesticide residues in grapes and apples by gas chromatography mass spectrometry*», **Journal of Chromatography A**, 2009, 1216 (45), 7630-7638
17. **Arthur CL, Pawliszyn J.** «*Solid phase micro-extraction with thermal desorption using fused silica optical fibers*», **Anal Chem** 1990; 62:2145-8
18. **Basheer C, Balasubramanian R, Lee HK.** «*Determination of organic micropollutants in rainwater using hollow fiber membrane/liquid-phase micro-extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry*», **J Chromatography A**, 2003;1016:11-20
19. **Basheer C, Lee HK, Obbard JP.** «*Determination of organochlorine pesticides in seawater using liquid-phase hollow fiber membrane micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry*», **J Chromatography A** 2002;968:191-9
20. **Basheer C, Obbard JP, Lee HK.** «*Analysis of persistent organic pollutants in marine sediments using a novel microwave assisted solvent extraction and liquid-phase micro-extraction technique*», **J Chromatography A** 2005;1068: 221-8
21. **Basheer C, Suresh V, Renu R, Lee HK.** «*Development and application of polymer-coated hollow fiber membrane micro-extraction to the determination of organochlorine pesticides in water*», **J Chromatography A** 2004;1033:213-20
22. **Blasco C., Fernandez M., Pena A., Lino C. M., Silveira M.I.N., Font G., Pico Y.**, «*Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain*», **J. Agric. Food Chem.** (11, 2003), 51, 8132-8138
23. **Blasco C., Fernandez M., Pico y., Font G.** «*Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry*», **J. Chromatography A** 1030 (2004) 77-85
24. **Blasco C., Lino C. M., Pico Y., Pena A., Font G., Silveira M.I.N.**, «*Determination of Organochlorine pesticide residues in honey from the central zone of Portugal and the Valencian community of Spain*», **J. Chromatography A** 1049 (7, 2004), 155-160
25. **Bogdanov, S., Imdorf, A., Charrière, J. D., Fluri, P. and Kilchenmann, V.** «*Dangers of residues for bee products. Part 1: The amount attributable to beekeeping*» **Allgemeine Deutsche Imkerzeitung**, 57(12), 8-10, 2002

26. **Bogdanov, S., Imdorf, A., Charrière, J. D., Fluri, P. and Kilchenmann, V.** «Quality of bee products and sources of contamination. Part 1: From the environment and from agriculture. Part 2: From beekeeping», *Schweizerische Bienen-Zeitung*, 125 (9; 10), 19-21; 22-27, 2002
27. [www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest\\_q-jsp](http://www.codexalimentarius.net/mrls/pestdes/jsp/pest_q-jsp)
28. **Essen, S G and S A McCurdy**, «Health and safety risks in production agriculture», *West J Med.* 1998. 169(4):214-20
29. **F. Cantwell , M. Jeannot**, «Solvent Microextraction into a Single Drop», *Anal. Chem.*, 1996, 68 (13), pp 2236–2240
30. **F. Cantwell M. Jeannot**, «Mass Transfer Characteristics of Solvent Extraction into a Single Drop at the Tip of a Syringe Needle», *Anal. Chem.*, 1997, 69 (2), pp 235–239
31. **Sergio Luis Costa Ferreira, Roy Edward Bruns, Erik Galvão Paranhos da Silva, Walter Nei Lopes dos Santos, Cristina Maria Quintella, Jorge Mauricio David, Jailson Bittencourt de Andrade, Marcia Cristina Breitzkreitz, Isabel Cristina Sales Fontes Jardim and Benicio Barros Neto**, «Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems» *J Chromatography A* 1158, Issues 1-2, 2007, 2-14
32. **Hou L, Lee HK.**, «Determination of pesticides in soil by liquid-phase micro-extraction, and gas chromatography–mass spectrometry», *J Chromatography A* 2004; 1038:37–42.
33. **Hou L, Shen G, Lee HK.** «Automated hollow fiber-protected dynamic liquid-phase micro-extraction of pesticides for gas chromatography–mass spectrometric analysis», *J Chromatography A* 2003;985:107–16
34. **Huaixia Chen, Jun Ying, Hui Chen, Jianlin Huang, Lei Liao**, «LC Determination of chloramphenicol in honey using dispersive Liquid- Liquid Microextraction», *Chromatografia* 2008, 68, October (No. 7/8)
35. **Karazafiris E. , Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasyvoulou A.**, «New multiresidue method using solid-phase extraction and gas chromatography-micro-electron-capture detection for pesticide residues analysis in royal jelly», *J. Chromatography A*, 1209, (2008) 17-21

36. **Lambropoulou DA, Albanis TA.** «*Sensitive trace enrichment of environmental andriandrogen vinclozolin from natural waters and sediment samples using hollow-fiber liquid-phase micro-extraction*», **J Chromatography A** 2004;1061:11–8
37. **Lambropoulou DA, Albanis TA.** «*Liquid-phase micro-extraction techniques in pesticide residue analysis*», **J. Biochem. Biophys. Method**, 70 (2006) 196, 197,–228
38. **Lambropoulou DA, Konstantinou K.I, Albanis TA.** «*Recent developments in headspace microextraction techniques for analysis of environmental contaminants in different matrices*», **Journal of Chromatography A**, 1152 (2, 2007), σελ. 92
39. **Lambropoulou DA, Psillakis E, Albanis TA, Kalogerakis N.** «*Single-drop micro-extraction for the analysis of organophosphorus insecticides in water*», **Anal Chim Acta** 2004;516:205–11
40. **Liang P, Guo L, Liu Y, Liu S, Zhang T.** «*Application of liquid-phase microextraction for the determination of phoxim in water samples by high performance liquid chromatography with diode array detector*», **Microchem J** 2005;80:19–23
41. **Liu JF, Chi YG, Jiang GB, Tai C, Peng JF, Hu JT,** «*Ionic liquid-based liquid-phase micro-extraction, a new sample enrichment procedure for liquid chromatography*», **J Chromatography A** 2004; 1026:143–7
42. **Liu J, Jiang GB, Chi YG, Cai YQ, Zhou QX, Hu JT,** «*Use of ionic liquids or liquid-phase micro-extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons*», **Anal Chem** 2003;75:5870–6
43. **Lu C., Buddhadasa S., Barone S., Bramwell P.,** «*Determination of para-dichlorobenzene residues in honey by purge and trap with GC-MSD*», **International Food Research Journal**, 15 (3), 2008, 281-286
44. **López-Blanco MC, Blanco-Cid S, Cancho-Grande B, Simal-Gandara J,** «*Application of single-drop micro-extraction and comparison with solid-phase micro-extraction and solid-phase extraction for the determination of  $\alpha$ - and  $\beta$ -endosulfan in water samples by gas chromatography–electron-capture detection*», **J Chromatography A**, 2003;984: 245–52.
45. **Mari Nevas** «*CLOSTRIDIUM BOTULINUM IN HONEY PRODUCTION WITH RESPECT TO INFANT BOTULISM*» Department of Food and Environmental Hygiene Faculty of Veterinary Medicine University of HelsinkiHelsinki, Finland, Academic Dissertation, 2006

46. **Sanchez-Brunete C., Miguel E., Albero B., Tadeo J.L.**, «*Determination of fipronil residues in honey and pollen by gas chromatography*», **Spanish Journal of Agriculture Research**, 2008, 6 Special issue), 7-14
47. **Shamsipur, Jalal**, «*HSME-GC-TSD of amitraz in honez after hydrolysis to 2,4-dimethylaniline*», **Journal of Food Composition and Analysis** 21 (2008), 264-270
48. **Schellin M, Popp P.** «*Determination of organophosphorus pesticides using membrane-assisted solvent extraction combined with large volume injection-gas chromatography–mass spectrometric detection*», **J Chromatography A**, 2005; 1072:37–43.
49. **Stalikas C., Fiamegos Y., Sakkas V., Albanis T.**, «*Developments on chemometric approaches to optimize and evaluate microextraction*», **Journal of Chromatography A**, 1216 (2009), σελ. 176-178
50. **Tsigouri A., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasvoulou A. , Diamantidis G. ,** «*Fluvalinate residues in greek honey and beeswax*», **Apiacta** 38 (2003), 50-53
51. **Tsipi D., Triantafyllou M., Hiskia A.**, «*Determination of Organochlorine pesticide residues in honey, applying solid phase extraction with RP- C<sub>18</sub> material*», **Analyst** (2, 1999), 124, 473-475
52. **Tsiropoulos N.G. and Amvrazi E.G.**, «*Determination of pesticides residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography*», **J. AOAC Int.**, (2010) (In Press).
53. **Shen G, Lee HK.** «*Hollow fiber-protected liquid-phase micro-extraction of triazine herbicides*», **Anal Chem** , 2002;74:648–54
54. **Pan HJ, Ho WH.** «*Determination of fungicides in water using liquid phase micro-extraction and gas chromatography with electron capture detection*», **Anal Chim Acta** 2004;527:61–7.
55. **Piasenzotto L., Gracco L., Conte L.S., Bogdanov S.**, «*Application of solid phase microextraction to evaluate traces of thymol in honey*», **Apidologie** 33 (2002), 545-552
56. **Wilczynska A., Przybylowski P.**, «*Residues of Organochlorine in Polish Honeys*», **Apiacta** 42 (2007), 16-24

57. **Wu J, Ee KH, Lee HK.** , « *Automated dynamic liquid–liquid–liquid microextraction a. followed by high-performance liquid chromatography–ultraviolet detection for the determination of phenoxy acid herbicides in environmental waters*», **J Chromatogr A** 2005;1082:121–7.
58. [www.melinet.gr/item/karayafeiris\\_ypoleimmata2.pdf](http://www.melinet.gr/item/karayafeiris_ypoleimmata2.pdf) , σελ. 1-2
59. **Xiao Q, Hu B, Yu C, Xia L, Jiang Z.** «*Optimization of a single-drop microextraction procedure for the determination of organophosphorus pesticides in water and fruit juice with gas chromatography–flame photometric detection*», **Talanta** 2005;69:848–55
60. **Zhao E, Han L, Jiang S, Wang Q, Zhou Z.** «*Application of a single-drop micro-extraction for the analysis of organophosphorus pesticides in juice*», **J Chromatography A** 2006;1114:269–73
61. **Zhao L, Lee HK.** «*Application of static liquid-phase micro-extraction to the analysis of organochlorine pesticides in water*», **J Chromatography A** 2001;919: 381–8.
62. **Zhu L, Ee KH, Zhao L, Lee HK** , «*Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquid–liquid–liquid micro-extraction with a hollow-fiber membrane*», **J Chromatogr A** 2002;963:335–43
63. **Zuin VG, Schellin M, Montero L, Yariwake JH, Augusto F, Popp P.** «*Comparison of stir bar sorptive extraction and membrane-assisted solvent extraction as enrichment techniques for the determination of pesticide and benzo[a]pyrene residues in Brazilian sugarcane juice*», **J Chromatography A**, 2006;1114:180–7
64. **Document N° SANCO/2007/3131**, «*Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed*», 31/October/2007, Supersedes Document No. SANCO/10232/2006.

