



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ  
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ  
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ &  
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ  
ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΜΕΛΙ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΟΥ ΜΕΤΑ  
ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ ΥΓΡΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ**

**ΕΠΙΜΕΛΕΙΑ**

ΡΟΤΣΙΑΣ ΗΛΙΑΣ  
ΖΑΧΑΡΙΑΔΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

**ΕΠΙΒΛΕΨΗ**

ΖΑΧΑΡΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ  
ΖΩΤΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ  
ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΜΕΛΙ ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΟΥ ΜΕΤΑ  
ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ ΥΓΡΟΥ ΤΥΠΟΥ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ**

ΕΠΙΒΛΕΨΗ : ΡΟΤΣΙΑΣ ΗΛΙΑΣ – ΖΑΧΑΡΙΑΔΗΣ ΠΕΤΡΟΣ

ΕΙΣΗΓΗΤΕΣ : ΖΑΧΑΡΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ - ΖΩΤΟΣ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ

Υποβολή Πτυχιακής διατριβής που αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου του Τμήματος Τεχνολογίας Τροφίμων του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2011

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

**Θερμές ευχαριστίες εκφράζονται προς τους εισηγητές της πτυχιακής μας εργασίας, κύριο Ζαχαρή Κωνσταντίνο για την αμέριστη βοήθεια κι υπομονή του, καθώς και στον κύριο Ζώτο Αναστάσιο για τη συνεχή υλική υποστήριξη του κατά τη διάρκεια των πειραματικών μας μετρήσεων.**

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΜΕΛΙ  
ΜΕ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΟΥ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΥΓΡΟΥ ΥΓΡΟΥ ΤΥΠΟΥ  
ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ**

**ΡΟΤΣΙΑΣ ΗΛΙΑΣ – ΖΑΧΑΡΙΑΔΗΣ ΠΕΤΡΟΣ**

**ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, Σχολή Τεχνολογίας Τροφίμων & Διατροφής, Τμήμα  
Τεχνολογίας Τροφίμων, 57400 Θεσσαλονίκη Τ.Θ. 141**

### **Περίληψη**

Στην παρούσα εργασία προτείνεται μια νέα τεχνική προκατεργασίας δείγματος για τον προσδιορισμό υπολειμματικών οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Η συγκεκριμένη τεχνική προκατεργασίας ονομάζεται μικροεκχύλιση υγρού υγρού τύπου διασποράς (dispersive liquid liquid microextraction, DLLME) και ουσιαστικά βασίζεται σε ένα τριαδικό σύστημα εκχύλισης.

Τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν το: etridiazole, chloroneb, propachlor, trifluralin, hexachlorobenzene, chlorothalonil, cyanazine, chlorpyrifos, DCPA, trans-chlordane, cis-chlordane, trans-nonachlor, chlorobenzilate, cis-permethrin και το trans-permethrin. Ο διαχωρισμός και η ποσοτικοποίηση των παραπάνω φυτοφαρμάκων έγινε με χρωματογραφία αερίου με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων.

Μελετήθηκαν οι παράμετροι που επηρεάζουν την απόδοση της μικροεκχύλισης και συγκεκριμένα το είδος και ο όγκος του οργανικού διαλύτη εκχύλισης, το είδος και ο όγκος του διαλύτη διασποράς, το pH και η ιονική ισχύς του δείγματος, καθώς επίσης και η ταχύτητας φυγοκέντρωσης. Το τελικό πρωτόκολλο της μικροεκχύλισης DLLME περιλάμβανε την προσθήκη 750  $\mu\text{L}$  ακετονιτρίλιου και 50  $\mu\text{L}$  χλωροφορμίου σε 5 mL υδατικού διαλύματος μελιού (50  $\text{g L}^{-1}$ ). Μετά τη φυγοκέντρωση του δείγματος και το διαχωρισμό των φάσεων, 20  $\mu\text{L}$  από τη χλωροφορμική στοιβάδα εξατμίστηκαν σε ρεύμα  $\text{N}_2$  και επαναδιαλύθηκαν σε ίσο όγκο ακετονιτρίλιου. Τέλος, 2  $\mu\text{L}$  του τελικού διαλύματος εισήχθησαν στην αναλυτική στήλη για διαχωρισμό.



Η προτεινόμενη μέθοδος επικυρώθηκε σε ότι αφορά την γραμμικότητα, τα όρια ανίχνευσής και ποσοτικού προσδιορισμού καθώς και την εκλεκτικότητα. Το εύρος της γραμμικής περιοχής ελέγχθηκε στην περιοχή συγκεντρώσεων από 0,1 – 20  $\mu\text{g L}^{-1}$ , ενώ ο συντελεστής συσχέτισης ( $r$ ) κυμαίνονταν από 0,9932-0,9988. Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια της μεθόδου ήταν αρκετά ικανοποιητικές αφού οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης (RSD %) ήταν μικρότερες του 20%, ενώ οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 75-119% σε όλες τις αναλύσεις. Τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν ήταν στο εύρος από 0,02-0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ή 0,4-3,0  $\text{ng g}^{-1}$ ) τα οποία ήταν αρκετά χαμηλότερα από αυτά που ορίζει η Ευρωπαϊκή νομοθεσία. Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των συγκεκριμένων οργανοχλωριωμένων φυτοφάρμακων σε δείγματα μελιού που προμηθεύτηκαν από την Ελληνική αγορά.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ .....</b>	<b>1</b>
<b>ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ .....</b>	<b>3</b>
<b>1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Φυτοφάρμακα .....</b>	<b>8</b>
<b>1.1.1. Κατηγορίες φυτοφαρμάκων .....</b>	<b>8</b>
i) Προέλευση-Περιγραφή.....	8
ii) Τοξικότητα.....	8
iii) Χρήση.....	9
iv) Περιορισμοί .....	9
v) Χώρες στις οποίες έχει άδεια κυκλοφορίας.....	9
vi) Εμπορικά σκευάσματα στην Ελλάδα.....	9
<b>1.2. ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. ΜΕΛΙ.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.2 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΟ ΜΕΛΙ.....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΕΛΙΟΥ .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3.5 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ .....</b>	<b>17</b>
1.3.5.1 Χαρακτηριστικές σταθερές των διαφόρων κατηγοριών μελιού.....	18
i) Φαινόμενη περιεκτικότητα σε ανάγοντα ζάχαρα, εκφρασμένη σε ιμπερτοζάχαρο: .....	18
ii) Περιεκτικότητα σε νερό:.....	18
iii) Φαινόμενη περιεκτικότητα σε ζαχαρόζη:.....	18
iv) Περιεκτικότητα σε ουσίες αδιάλυτες στο νερό: .....	18
v) Περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα (τέφρα):.....	18
vi) Δείκτης διάστασης και περιεκτικότητας σε υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF), προσδιοριζόμενα μετά από επεξεργασία και ανάμειξη: .....	18
<b>2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....</b>	<b>25</b>
<b>2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΟ ΡΕΥΣΤΟ .....</b>	<b>25</b>
<b>2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ .....</b>	<b>26</b>
<b>2.3) QUECHERS.....</b>	<b>28</b>
<b>2.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΜΑΤΑ.....</b>	<b>29</b>
<b>2.5) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΠΑΡΑ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ-ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ .....</b>	<b>30</b>
<b>2.6) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ .....</b>	<b>31</b>
<b>2.7) ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ.....</b>	<b>32</b>
<b>2.8) ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ .....</b>	<b>33</b>
<b>3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>36</b>
<b>4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....</b>	<b>37</b>
<b>5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1. Αρχή της μεθόδου.....</b>	<b>40</b>
<b>5.2. Βελτιστοποίηση της μεθόδου .....</b>	<b>41</b>
5.2.1. Ανάπτυξη του χρωματογραφικού διαχωρισμού – επιλογή εσωτερικού προτύπου ...	41
5.2.2. Μελέτη των συνθηκών της μικροεκχύλισης DLLME .....	45
<b>5.3. Επικύρωση της μεθόδου (validation) .....</b>	<b>56</b>

5.3.1. Γραμμικότητα - εύρος προσδιορισμού .....	56
5.3.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού (LOD & LOQ) .....	57
5.3.3. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου στην ίδια ημέρα και κατά την διάρκεια διαδοχικών ημερών .....	59
5.3.4. Εκλεκτικότητα .....	63
5.4. Εφαρμογές της μεθόδου .....	64
5.4.1. Προκατεργασία δειγμάτων .....	64
5.4.2. Τελικό πρωτόκολλο ανάλυσης.....	64
5.4.2. Ανάλυση δειγμάτων.....	65
<b>6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>81</b>
<b>7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....</b>	<b>82</b>

## **1.0 ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

### **1.1. Φυτοφάρμακα**

#### ΓΕΝΙΚΑ

Τα φυτοφάρμακα είναι κυρίως οργανικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως στη γεωργία με σκοπό την προστασία των αγροτικών προϊόντων από διάφορες ασθένειες (Albero, Sanchez-Brunete et al. 2004). Τα φυτοφάρμακα ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των γεωργικών φαρμάκων.

#### **1.1.1. Κατηγορίες φυτοφαρμάκων**

Τα γεωργικά φάρμακα χωρίζονται σε τέσσερις μεγάλες κατηγορίες:

- A) Ζιζανιοκτόνα: αναστέλλουν ή αδρανοποιούν την ανάπτυξη ανεπιθύμητων ζιζανίων.
- B) Μυκητοκτόνα: καταστρέφουν την ανεπιθύμητη και επιβλαβή παρουσία μυκήτων.
- Γ) Εντομοκτόνα, νηματωδοκτόνα: παρεμποδίζουν την ανάπτυξη εντόμων.
- Δ) Ακαρεοκτόνα: καταστρέφουν τα ακάρεα στα φυτά (Μπαλαγιάννης 1994)

Για κάθε φυτοφάρμακο είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε κυρίως τα εξής:

#### **i) Προέλευση-Περιγραφή**

Οι πληροφορίες αυτές αναφέρονται στη χώρα και στην εταιρεία πρώτης παρασκευής και για τα περισσότερα δρώντα συστατικά το έτος παρασκευής τους σε βιομηχανική κλίμακα ή πρώτης αναφοράς των παρασιτοκτόνων ιδιοτήτων τους.

#### **ii) Τοξικότητα**

Πρέπει να γνωρίζουμε τη μέση θανατηφόρα δόση (LD<sub>50</sub>) από στόματος και μερικές φορές από δέρματος, του δρώντος συστατικού.

### **iii) Χρήση**

Πρέπει να αναγράφονται στο φυτοφάρμακο οι συνιστώμενες χρήσεις στη φυτοπροστασία των σκευασμάτων του αντίστοιχου δρώντος συστατικού που στις περισσότερες περιπτώσεις είναι εγκεκριμένες από το υπουργείο υγείας.

### **iv) Περιορισμοί**

Απαραίτητο είναι να καθορίζεται ο χρόνος τελευταίας επέμβασης, πριν τη συγκομιδή και άλλοι περιορισμοί ή αντενδείξεις που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη χρήση των σκευασμάτων των δρώντων συστατικών.

### **v) Χώρες στις οποίες έχει άδεια κυκλοφορίας**

Πρέπει να γνωρίζουμε ποιες χώρες έχουν έγκριση για αυτό το συστατικό.

### **vi) Εμπορικά σκευάσματα στην Ελλάδα**

Γνωστοποιείται στους κατόχους το εμπορικό όνομα των φυτοφαρμάκων στην Ελλάδα και η % περιεκτικότητα σε δρώντα συστατικά (Μπαλαγιάννης 1994)

Εκτός από τις παραπάνω πληροφορίες, απαραίτητο είναι να γνωστοποιείται και η διαφοροποίηση της τοξικότητας των διαφόρων φυτοφαρμάκων. Τα φυτοφάρμακα, πέραν της προστασίας που προσδίδουν στα φυτά από παρασιτικούς οργανισμούς, αποτελούν κίνδυνο (άμεσο ή έμμεσο) και πολλές φορές θανάσιμο για τους καταναλωτές. Άμεσο κίνδυνο αποτελούν όταν έρχονται σε επαφή με τον άνθρωπο είτε με κατάποση, είτε δερματικώς είτε με αναπνοή. Έμμεσο κίνδυνο αποτελούν όταν πχ. οι μέλισσες παράγουν μέλι χρησιμοποιώντας τα άνθη από τα φυτά ή όταν τα φυτοφάρμακα καταλήγουν σε υπόγεια ύδατα ύστερα από μια βροχόπτωση. Ως αποτέλεσμα απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή και μελέτη για την ποσοστιαία επιβάρυνση αλλά και τα επίπεδα που ανέχεται ο ανθρώπινος οργανισμός. Υπάρχουν λοιπόν κατηγορίες τοξικότητας των φαρμάκων ανάλογα με τη θανατηφόρα δόση της δραστικής ουσίας που απαιτείται είτε από στόμα είτε από δέρμα είτε από αναπνοή στους επιμύες. (Πίνακας 1)

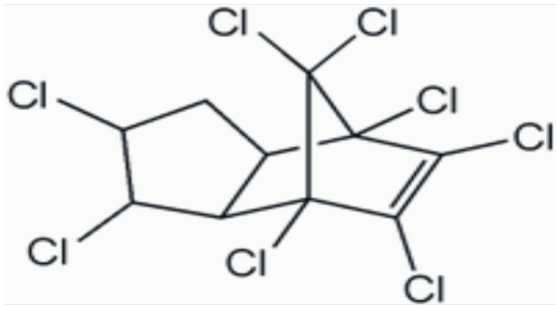
**Πίνακας 1.** Όρια τοξικότητας φυτοφαρμάκων. (Μπαλαγιάννης)

Κατηγορία τοξικότητας	LD <sub>50</sub> (σε επιμύες)			Χαρακτηρισμός Φυτοφαρμάκων
	Από στόματος mg/Kg	Δερματικώς mg/Kg	Με αναπνοή μg/Λαέρα	
I	<50	<200	<2000	Πολύ τοξικό
II	>50	>200	>2000	Τοξικό
	<500	<2000	<20000	
III	>500	>2000	>20000	Μικρή τοξικότητα
	<5000	<20000	<200000	
Εξαιρούνται Κατηγορίας	>5000	>20000	>200000	Μερικές φορές ερεθιστικά

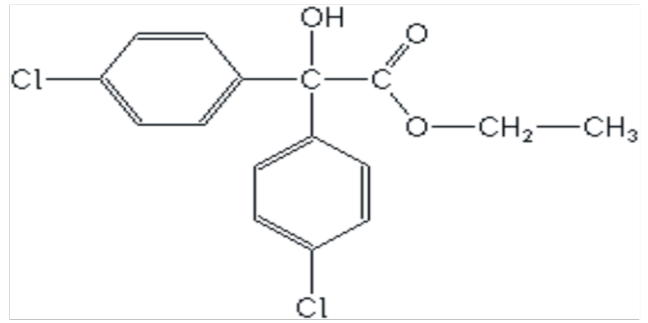
## 1.2. ΟΡΓΑΝΟΧΛΩΡΙΩΜΕΝΑ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Τα οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα (organochlorine pesticides, OCPs) είναι ενώσεις υδρογονανθράκων που περιέχουν πολλαπλά υποκατάστατα χλωρίου και αποτελούν μια ειδική κατηγορία φυτοφαρμάκων. Είναι υδροφοβικές, λιπόφιλες και εξαιρετικά σταθερές χημικές ενώσεις. Υπάρχουν τέσσερις κύριοι τύποι OCPs: διχλωροδιφενιλεθάνη, κυκλοδιένια, χλωριωμένα βενζόλια και κυκλοεξάνια. Οι παραπάνω τύποι έχουν ένα κοινό ζεύγος δακτυλίων του άνθρακα. Τα OCPs εισήχθησαν στο εμπόριο στη δεκαετία του 1940 και χρησιμοποιήθηκαν ευρέως στη γεωργία και τον έλεγχο παρασίτων μέχρι που από έρευνες διαπιστώθηκαν κίνδυνοι στη χρήση τους και οδηγήθηκαν οι εκάστοτε κυβερνήσεις σε περιορισμούς και απαγορεύσεις. Όμως παρά τους περιορισμούς η χρήση των OCPs συνεχίστηκε και τις επόμενες δεκαετίες και μέχρι τώρα αποτελεί κίνδυνο για τη διατροφή των καταναλωτών.

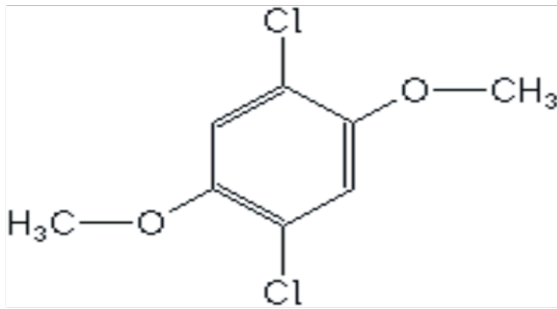
Παρακάτω παρουσιάζονται οι χημικές δομές των φυτοφαρμάκων που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία.



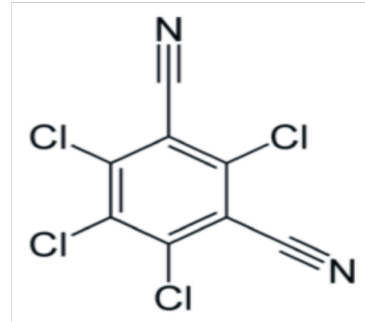
Chlordane



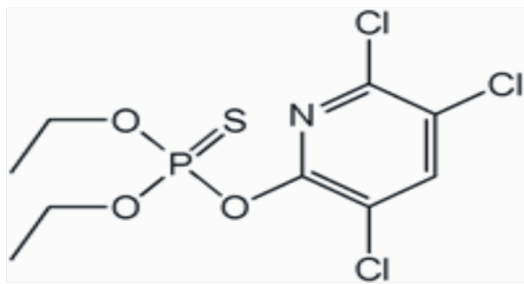
Chlorobenzilate



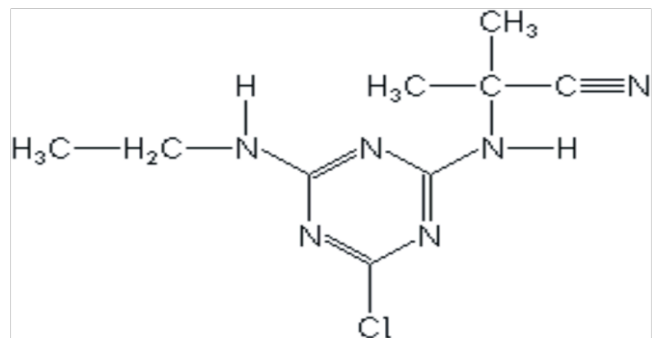
Chloroneb



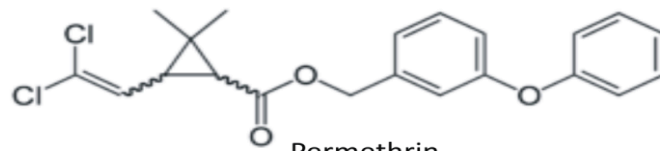
Chlorothalonil



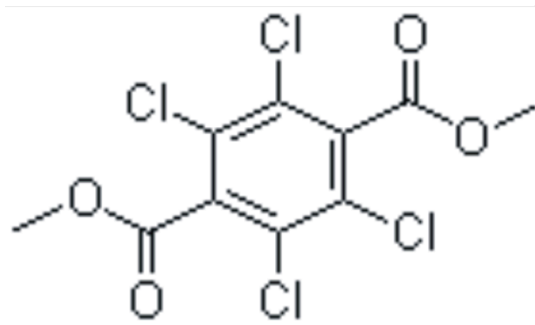
Chlorpyrifos



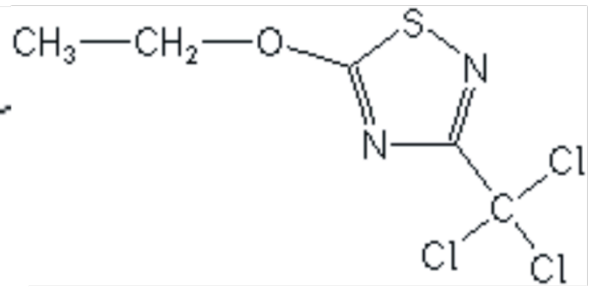
Cyanazine



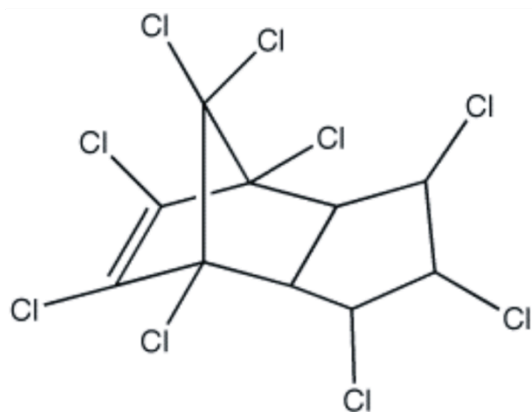
Permethrin



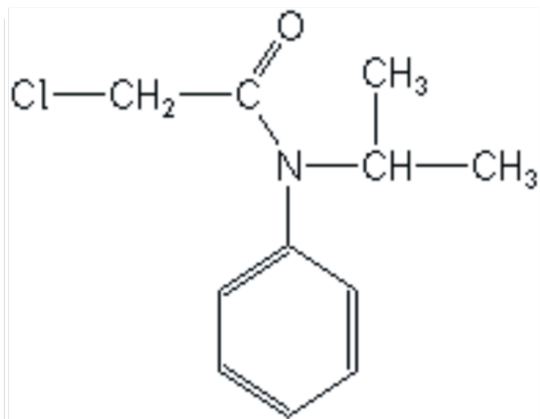
DCPA (Dimethyl 2,3,5,6-tetrachlorobenzene  
-1,4-dicarboxylate)



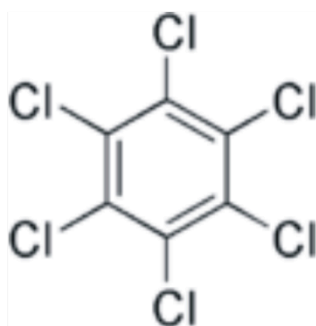
Etridiazole



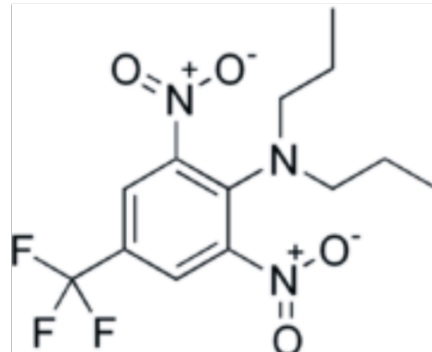
Trans-nonachlor



Propachlor



Hexachlorobenzene



Trifluralin  
(Stellman 1998)



**Πίνακας 2 .** Φυσικές ιδιότητες οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων.

Φυτοφάρμακα	Τύπος	MW <sup>a</sup>	Διαλυτότητα <sup>b</sup>	K <sub>o/w</sub> log P <sup>c</sup>
Etridiazole	Μυκητοκτόνο	246	117.1	3.37
Chloroneb	Μυκητοκτόνο	206	8	3.58
Propachlor	Ζιζανιοκτόνο	211	580	1.6
Trifluralin	Ζιζανιοκτόνο	335	0.221	5.27
Hexachlorobenzene	Μυκητοκτόνο	282	0.0047	3.93
Chlorothalonil	Μυκητοκτόνο	264	0.81	2.94
Cyanazine	Ζιζανιοκτόνο	240	171	2.1
Chlorpyrifos	Εντομοκτόνο	349	1.05	4.7
DCPA	Ζιζανιοκτόνο	330	0.21	4.28
trans-chlordane	Εντομοκτόνο	406	0.1	2.78
cis-chlordane	Εντομοκτόνο	406	0.1	2.78
trans-nonachlor	Εντομοκτόνο	440	-	-
Chlorobenzilate	Εντομοκτόνο	324	10	4.58
cis-permethrin	Εντομοκτόνο	390	0.2	6.1
trans-permethrin	Εντομοκτόνο	390	0.2	6.1

(Merck 2010)

<sup>a</sup> MW: μοριακό βάρος (g mol<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup> διαλυτότητα των φυτοφαρμάκων στο νερό στους 20 °C (mg L<sup>-1</sup>)

<sup>c</sup> συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού σε pH = 7 (20 °C)

### **1.3. ΜΕΛΙ**

#### ΓΕΝΙΚΑ

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν υψίστης βιολογικής σημασίας που παράγουν οι μελιτοφόρες μέλισσες από το νέκταρ ανθέων ή από εκκρίσεις που προέρχονται από ζωντανά μέρη των φυτών ή που βρίσκονται πάνω σε αυτά. Έτσι οι μέλισσες συλλέγουν, μεταποιούν και αναμιγνύουν το νέκταρ ή τις εκκρίσεις και τα αφήνουν έπειτα να ωριμάσουν μέσα στις κηρήθρες της κυψέλης. Το μέλι μπορεί να είναι ρευστό, παχύρευστο ή κρυσταλλωμένο (Άρθρο 2 ΕΟΚ)

#### **1.3.1 ΦΥΣΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ**

##### ΕΙΔΙΚΟ ΒΑΡΟΣ - ΥΓΡΑΣΙΑ

Το ειδικό βάρος του μελιού κυμαίνεται από 1,3923-1,4505 ανάλογα με το ποσοστό της υγρασίας που επίσης κυμαίνεται από 13%-23%. Αυτό που παρατηρούμε όμως είναι ότι όσο πιο μεγάλο είναι το ειδικό βάρος, τόσο πιο μικρή είναι η περιεκτικότητα σε υγρασία. Βεβαίως και η υγρασία και το ειδικό βάρος εξαρτώνται άμεσα από τη θερμοκρασία.

##### ΕΙΔΙΚΗ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑ

Η ειδική θερμότητα ενός μελιού με 17% υγρασία στους 293 K είναι 0,54, όταν η ειδική θερμότητα του νερού είναι 1,0.

##### ΘΕΡΜΙΚΗ ΑΓΩΓΙΜΟΤΗΤΑ

Το μέλι είναι κακός αγωγός της θερμότητας και μόνο αν θερμανθεί στους 344 K φτάνει τη θερμική αγωγιμότητα του νερού. Ο συνδυασμός της καλής ειδικής θερμότητας που έχει και της κακής θερμικής αγωγιμότητας επηρεάζουν την τεχνολογία παρασκευής του.

##### ΤΟ ΙΞΩΔΕΣ

Το ιξώδες του μελιού είναι μια φυσική παράμετρος που επηρεάζεται άμεσα από την υγρασία του και τη θερμοκρασία του.

pH

Τα ανθόμελα είναι κυρίως όξινα με pH 3-4 ενώ τα μελιτώματα (πευκόμελο, μέλι ελάτου) έχουν pH αλκαλικό 4-6.

#### ΣΤΡΟΦΙΚΗ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ

Τα περισσότερα ανθόμελα έχουν αριστερόστροφες τάσεις πόλωσης ενώ τα μελιτώματα έχουν δεξιόστροφες.

#### 1.3.2 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Το μέλι αποτελείται κυρίως από νερό, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες. Σε μικρότερο βαθμό περιέχει 18 οργανικά οξέα (γλουκονικό, μυρμηγκικό, βουτυρικό, ταρταρικό, οξαλικό, κιτρικό, κ.ά), 19 αμινοξέα (προλίνη, λυσίνη, γλουταμινικό, αλανίνη, τυροσίνη, λευκίνη κ.ά) των οποίων η βασική προέλευση είναι η γύρη αλλά και οι μέλισσες, μεταλλικά στοιχεία, ένζυμα (ιμβερτάση, αμυλάση ή διαστάση, γλυκοξειδάση, ινουλάση, καταλάση κ.ά), ελάχιστες βιταμίνες (κυρίως του συμπλέγματος Β), διάφορες αρωματικές ή χρωστικές ουσίες (ταννίνες, καροτίνια, γλυκερίδια, χολίνη, φωσφολιπίδια, χολικό οξύ).

**Πίνακας 3.** Περιεκτικότητα διαφόρων ουσιών ανά 100g μελιού. (McCance 1991)

ΜΕΛΙ					
G		mg		mg/μg	
ΝΕΡΟ	23	Na	11	ΡΕΤΙΝΟΛΗ	0 μg
ΠΡΩΤΕΙΝΕΣ	0,4	K	51	ΚΑΡΟΤΕΝΗ	0 μg
ΛΙΠΑΡΑ	0	Ca	5	ΒΙΤΑΜΙΝΗ D	0 μg
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	76,4	Mg	2	ΒΙΤΑΜΙΝΗ E	0 μg
		P	17	ΒΙΤΑΜΙΝΗ B6	0 mg
		Fe	0,4	ΒΙΤΑΜΙΝΗ B12	0 μg
		Zn	0,05	ΒΙΤΑΜΙΝΗ C	0 mg
		Cu	0,9	ΘΙΑΜΙΝΗ	0 mg
		Cl	18	ΡΙΒΟΦΛΑΒΙΝΗ	0,05 mg
		Mn	0,3	ΝΙΑΣΙΝΗ	0,12 mg

### **1.3.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΠΡΟΣΒΑΛΛΟΥΝ ΤΟ ΜΕΛΙ**

Για να αναζητήσουμε τις ασθένειες που βλάπτουν την ποιότητα του μελιού ανατρέχουμε στην παθογένεια των μελισσών από τις οποίες παράγεται το μέλι. Οι μολυσματικές παθήσεις των μελισσών χωρίζονται σε ιογενείς παθήσεις της μέλισσας (σακόμορφη σήψη του γόνου, παράλυση ενήλικης μέλισσας), σε βακτηριογενείς παθήσεις (αμερικάνικη σήψη του γόνου, ευρωπαϊκή σήψη του γόνου), σε παθήσεις από πρωτόζωα (νοσεμίαση, αμοιβάδωση) και σε παθήσεις από μύκητες. Ακόμη, υπάρχουν παρασιτικές παθήσεις στις μέλισσες που οφείλονται σε ακάρεα (τραχειακή ακαρίαση, βαρροϊκή ακαρίαση, τροπιλαίλαπα), σε δίπτερα (μελισσόψειρα) και σε κολιόπτερα (Υφαντίδης 1995).

Η ποιότητα του μελιού επηρεάζεται ακόμη και από τις δηλητηριάσεις των μελισσιών. Οι δηλητηριάσεις αυτές χωρίζονται κυρίως σε τρεις κατηγορίες:

Α) **Τροφοδηλητηριάσεις:** τα φυτά έχουν στα διάφορα μέρη τους τοξικές ουσίες όπως αλκαλοειδή, αιθέρια έλαια κ.α.. Οι μέλισσες καθώς έρχονται σε επαφή με το φυτό (γύρη, άνθη), γίνονται συσσωρευτές των ουσιών αυτών και υφίστανται δηλητηρίαση.

Β) **Φυτά που δηλητηριάζουν τις μέλισσες:** τα πιο γνωστά από τα φυτά αυτά είναι ο ευκάλυπτος, καμέλια, καπνός, κρεμμύδι, λυγαριά, φλαμουριά.

Γ) **Δηλητηρίαση μελισσών από παρασιτοκτόνα:** οι μέλισσες θανατώνονται από εντομοκτόνα όταν συλλέγουν δηλητηριασμένο νέκταρ, γύρη και νερό, όταν πετούν ανάμεσα σε νέφος εντομοκτόνου, όταν περπατούν πάνω σε επιφάνειες που ψεκάστηκαν με εντομοκτόνο, και όταν από κάποια αιτία βρεθούν μέσα στη κυψέλη τους εντομοκτόνα (Θρασυβούλου 2009).

Ο κίνδυνος δηλητηριάσεων των μελισσών είναι υπαρκτός μέσα σε μεγαλουπόλεις λόγω των ρύπων της ατμόσφαιρας. Αυτός είναι εξάλλου και ο λόγος που θάνατοι μελισσών από μη φυσιολογικά αίτια μπορούν να αποτελούν αξιόπιστο βιολογικό δείκτη ρύπανσης του περιβάλλοντος.

### **1.3.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΕΛΙΟΥ**

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες μελιού όπως μέλι πορτοκαλιάς, μέντας, ακακίας, ευκαλύπτου, καστανιάς, βαμβακιού, ανθόμελα (καλοκαιριού, φθινοπώρου άνοιξης),

πευκόμελο και ελατόμελο. Οι κυριότερες όμως είναι το πευκόμελο και το μέλι ελάτου, το θυμαρίσιο μέλι και το ανθόμελο. Η συνολική παραγωγή της Ελλάδας σε μέλι είναι 6500 τόνοι (Μπίκος 1991). Από αυτά το 65%-70% είναι μέλι από μελιτώματα ενώ το υπόλοιπο 30%-35% είναι ανθόμελα. Πιο αναλυτικά:

- Πευκόμελο: προέρχεται από σταθερή παραγωγή και συλλέγεται σε περιοχές της βόρειας Εύβοιας, της Χαλκιδικής και της Θάσου.
- Μέλι από έλατο: δεν προέρχεται από σταθερή ετήσια παραγωγή και συλλέγεται κυρίως από τη Στερεά Ελλάδα και την Βόρεια Πίνδο.
- Θυμαρίσιο μέλι: Ανήκει στα ανθόμελα και έχει έντονα αρωματικά και γευστικά χαρακτηριστικά. Συλλέγεται κυρίως στη Στερεά Ελλάδα, στην Πελοπόννησο και στην Κρήτη.
- Ανθόμελο: Προέρχεται από σταθερή ετήσια παραγωγή από πεδιάδες της Θεσσαλίας, της Μακεδονίας και της Θράκης και στηρίζεται στα τριφύλλια, στα βαμβάκια και στους ηλιάνθους.

### **1.3.5 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ**

Το μέλι ανάλογα με τον τρόπο παραλαβής διακρίνεται στις παρακάτω κατηγορίες:

α. *Μέλι σε κηρήθρες*. Είναι το μέλι που αποταμιεύεται από τις μέλισσες μέσα σε σφραγισμένα κελιά κηρηθρών που έχουν κατασκευαστεί πρόσφατα από τις ίδιες και δεν περιέχουν γόνο. Το μέλι αυτό προσφέρεται σε κηρήθρες ολόκληρες ή σε κομμάτια.

β. *Μέλι με κομμάτια από κηρήθρες*. Είναι το μέλι που περιέχει ένα ή περισσότερα κομμάτια κηρηθρών.

γ. *Μέλι στραγγισμένο*. Είναι το μέλι, που παραλαμβάνεται με απλή στράγγιση των κηρηθρών, που προηγουμένως έχουν απολεπιστεί και δεν περιέχουν γόνο.

δ. *Μέλι φυγοκεντρισμένο*. Είναι το μέλι που παραλαμβάνεται με την φυγοκέντρωση των κηρηθρών, που προηγουμένως έχουν απολεπιστεί και δεν περιέχουν γόνο.

ε. *Μέλι πίεσης*. Είναι το μέλι που παραλαμβάνεται με πίεση των κηρηθρών που δεν περιέχουν γόνο, χωρίς θέρμανση ή με ήπια θέρμανση. (Άρθρο 3 ΕΟΚ)

### **1.3.5.1 Χαρακτηριστικές σταθερές των διαφόρων κατηγοριών μελιού.**

*i) Φαινόμενη περιεκτικότητα σε ανάγοντα ζάχαρα, εκφρασμένη σε ιμβερτοζάχαρο:*

-Μέλι από νέκταρ, τουλάχιστο 65%

-Μέλι από μελιτώματα μόνο του ή σε μίγμα με μέλι από νέκταρ, τουλάχιστο 60%.

*ii) Περιεκτικότητα σε νερό:*

-Γενικά, όχι μεγαλύτερη από 21%

-Μέλι ερείκης (CALLUNA) και μέλι τριφυλλιού (TRIFOLUM SP), όχι μεγαλύτερη από 23%

*iii) Φαινόμενη περιεκτικότητα σε ζαχαρόζη:*

-Γενικά, όχι μεγαλύτερη από 5%

-Μέλι από μελιτώματα μόνο του ή σε μίγμα με μέλι από νέκταρ, μέλι από άνθη ακακίας, λεβάντας και BANKSIA MENZIESI, όχι μεγαλύτερη από 10%

*iv) Περιεκτικότητα σε ουσίες αδιάλυτες στο νερό:*

-γενικά, όχι μεγαλύτερη από 0,1%

-μέλι πίεσης, όχι μεγαλύτερη από 0,5%

*v) Περιεκτικότητα σε ανόργανα άλατα (τέφρα):*

-γενικά, όχι μεγαλύτερη από 0,6%

-μέλι από μελιτώματα μόνο του ή σε μίγμα με μέλι από νέκταρ, όχι μεγαλύτερη από 1%

*vi) Περιεκτικότητα σε ελεύθερα οξέα: όχι μεγαλύτερη από 40 χιλιοστοϊσοδύναμα στο χιλιόγραμμο.*

*vi) Δείκτης διάστασης και περιεκτικότητας σε υδροξυμεθυλοφουρφουράλη (HMF), προσδιοριζόμενα μετά από επεξεργασία και ανάμειξη:*

α) δείκτης διάστασης (κλίμακα του SCHADE).

-γενικά τουλάχιστον 8.

-μέλι με χαμηλή φυσική περιεκτικότητα σε ένζυμα (πχ μέλι εσπεριδοειδών) και περιεκτικότητα σε HMF όχι μεγαλύτερη από 15 mg/Kg: τουλάχιστον 3.

β) HMF όχι μεγαλύτερη από 40 mg/Kg (Άρθρο 8 ΕΟΚ)

## 1.4. ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΕΡΙΟΥ (Gas Chromatography)

Όπως και στην χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Pressure Liquid Chromatography), υπάρχουν και άλλες χρωματογραφικές τεχνικές που ανταποκρίνονται σε διαφορετική συνδεσμολογία οργάνων ανάλογα με το επιθυμητό αποτέλεσμα. Η χρωματογραφία αερίου (GC) είναι μια άλλη από αυτές τις τεχνικές. Βασική προϋπόθεση για μια ένωση που θα αναλυθεί με την τεχνική αυτή, είναι να έχει επαρκή θερμική σταθερότητα και πτητικότητα. Σε περίπτωση που όλα ή ορισμένα μόρια από μια ένωση βρίσκονται στη φάση του αερίου ή ατμών στους 400 - 450 °C ή χαμηλότερη και δεν αποσυντίθεται σε αυτές τις θερμοκρασίες, μπορούν πιθανώς να αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία (McNair 1998). Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει ατμοποίηση ενός δείγματος και σάρωσή του από στήλη με κινούμενο ρεύμα αδρανούς αερίου που ονομάζεται η κινητή φάση ή το φέρον αέριο (συνήθως ήλιο, άζωτο, αργό, υδρογόνο και αέρα) (<http://www.chromatography-online.org/topics/retention/time.html%3E>). Τα αέρια, συνήθως παρέχονται από φιάλες συμπιεσμένου αερίου όπου υπάρχει ένα ροόμετρο για τον έλεγχο της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου.

Ως φέρον αέριο μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε αέριο σε υπερκάθαρη κατάσταση, το οποίο μπορεί να διαφοροποιηθεί στον ανιχνευτή, από τα διάφορα συστατικά του μίγματος. Το φέρον αέριο πρέπει να είναι αδρανές και απαλλαγμένο από προσμίξεις. Επίσης δεν πρέπει να περιέχει οξυγόνο, γιατί οξειδώνει τη στατική φάση και αυτό σημαίνει καταστροφή της στήλης, ιδιαίτερα όταν αυτή είναι τριχοειδής και η ποσότητα της στατικής φάσης είναι ελάχιστη. Ίχνη υγρασίας επίσης απενεργοποιούν τη στατική φάση, για αυτό το φέρον αέριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από υγρασία. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται κυρίως από τον τύπο του ανιχνευτή που χρησιμοποιείται. (Skoog 1997 )

**Πίνακας 4.** Αέρια που χρησιμοποιούνται στην χρωματογραφία αερίου.  
(Skoog 1997 ), (Bolozdynya 2006)

Αέριο	Εφαρμογή	Παρατηρήσεις
Ήλιο	Γενικά ως φέρον ή ως βοηθητικό αέριο (make up)	Ιδανικό αλλά ακριβό. Πρέπει να είναι μίγμα με άλλο αέριο για να χρησιμοποιηθεί ως βοηθητικό αέριο σε ECD
Άζωτο	Γενικά ως βοηθητικό αέριο ή ως φέρον σε γεμισμένες στήλες	Φθινό. Όχι κατάλληλο ως φέρον σε τριχοειδείς στήλες
Υδρογόνο	Φέρον για τριχοειδείς στήλες. Αέριο καύσης για ανιχνευτές FID, NPD, FPD	Φθινό. Εκρηκτικό, χρειάζεται καλός εξαερισμός. Κατάλληλο φέρον για τριχοειδείς στήλες.
Αέρας	Αέριο καύσης για FID, NPD, FPD	Φθινό και άμεσα διαθέσιμο
Οξυγόνο	Αέριο καύσης σε ορισμένους FPD	
Αργό	Φέρον για TCD	
Μίγμα Αργού-μεθανίου	Βοηθητικό αέριο και φέρον για γεμισμένες στήλες με ECD	Καλύτερη γραμμικότητα και εκλεκτικότητα από το άζωτο αλλά μικρότερα όρια ανίχνευσης
Μίγμα Ηλίου-υδρογόνου	Φέρον για TCD	

Το δείγμα εισάγεται στον εισαγωγέα με ένεση, όγκου 1 έως 3  $\mu\text{L}$  από ένα υγρό δείγμα. Η ποσότητα αυτή εγχύεται χειροκίνητα, είτε με τη βοήθεια αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler), σε θερμαινόμενο συγκρότημα έγχυσης της συσκευής (inlet). Ο διαχωρισμός λαμβάνει μέσα στη στήλη. Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται τριχοειδείς στήλες για να επιτυγχάνεται ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός. Οι στήλες αποτελούνται συνήθως από γυαλί ή χαλαζία, με εσωτερική διάμετρο από 0,2 έως 1mm και μήκος που ξεπερνά πολλές φορές τα 100m. Οι περισσότεροι τύποι τριχοειδών στηλών διαθέτουν ανοικτή κατά μήκος σήραγγα στους τριχοειδείς



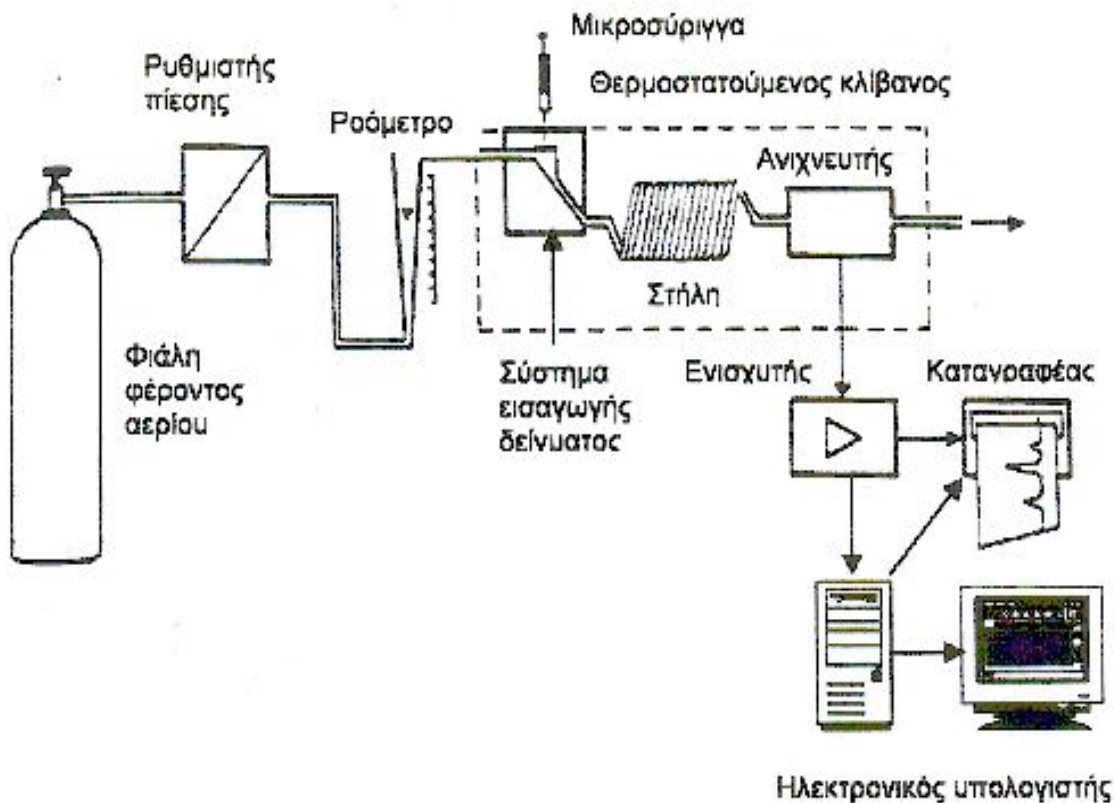
σωλήνες, δεδομένου ότι δεν υπάρχει πληρωτικό υλικό. Στις περιπτώσεις αυτές ο όγκος του αερίου που αποτελεί την κινητή φάση είναι μεγάλος σε σχέση με αυτόν της υγρής, με αποτέλεσμα να μπορούν να επιτευχθούν αριθμοί βαθμίδων διαχωρισμού 100.000 και πλέον (Schwedt 1996).

Επίσης πλεονεκτήματα των τριχοειδών στηλών σε σχέση με τις στήλες πληρώσεως είναι:

1. Μικρότερη ποσότητα δείγματος (ng)
2. Μικρότερος χρόνος έκλουσης και ανάλυσης γενικότερα
3. Μικρότερες θερμοκρασίες διαχωρισμού
4. Όρια ανίχνευσης περίπου ίδια, αλλά μικρότερη ποσότητα δείγματος
5. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για σύζευξη με ανιχνευτές που επιτυγχάνουν ταυτοποίηση των ενώσεων (π.χ. φασματομέτρο μάζας)
6. Με 3-4 στήλες (που διαφέρουν ως προς την πολικότητα της στατικής φάσης) καλύπτεται όλο το φάσμα των ενώσεων που μπορούν να διαχωριστούν.
7. Υπάρχει μεγαλύτερη ευελιξία στην επιλογή ταχύτητας ροής φέροντος αερίου. (Παπαδογιάννης 2001)

Το μειονέκτημα στις τριχοειδείς στήλες είναι ότι έχουν περιορισμένη χωρητικότητα. Με άλλα λόγια, περιορισμένος όγκος δείγματος μπορεί να διαχωριστεί σε έναν ορισμένο χρόνο. Ως εκ τούτου, μια βαλβίδα στο εισαγωγέα χρησιμοποιείται συνήθως για τη «διαίρεση» του δείγματος (split injection) ώστε να εισάγεται μόνο ένα κλάσμα του ενέσιμου όγκου του δείγματος πάνω στην τριχοειδή στήλη (Schwedt 1996). Τα εσωτερικά τοιχώματα της στήλης είναι επιστρωμένα είτε με πορώδη στερεά ή παχύρρευστα υγρά υλικά. Σε αντίθεση με την υγρή χρωματογραφία, η κινητή φάση δεν αλληλεπιδρά με τα μόρια του αναλύτη. Ο ρόλος της είναι η διακίνηση αυτού κατά μήκος της στήλης. Στην συντριπτική πλειονότητα των εφαρμογών, ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται με κατανομή του αναλύτη μεταξύ της αέριας κινητής και μιας υγρής φάσης, η οποία είναι ακινητοποιημένη σε επιφάνεια αδρανούς στερεού υποστρώματος (χρωματογραφία αερίου-υγρού), ώστε να επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών στο μείγμα. Δεδομένου ότι

οι ενώσεις έχουν διαφορετικές δυναμικές κινητικότητας, θα εξέρχονται από τη στήλη σε διαφορετικούς χρόνους. Άρα έχουν διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης,  $t_R$  (min), όπως χρόνος κατακράτησης ορίζεται ο χρόνος μεταξύ έγχυσης και ανίχνευσης ([Http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm](http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrom.htm)), οι οποίοι αποτελούν κριτήριο ταυτοποίησης των ουσιών και το δε εμβαδόν της κορυφής το μέτρο του ποσοτικού προσδιορισμού της εκάστοτε ουσίας.



**Σχήμα 1.** Σχηματική αναπαράσταση ενός αέριου χρωματογράφου με καταγραφέα (Skoog 1997 )

Υπάρχουν πολλοί ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην αέρια χρωματογραφία. Οι πιο γνωστοί από αυτούς είναι:

- α) ιονισμού φλόγας (FID), ο οποίος υποστηρίζει υδρογόνο ,αέρα, και είναι επιλεκτικός για περισσότερο οργανικές ενώσεις,
- β) θερμικής αγωγιμότητας (TCD), ο οποίος υποστηρίζει μείγμα ηλίου / αργού και είναι καθολικά επιλεκτικός,

- γ) σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), το οποίο είναι επιλεκτικό για τα αλογονίδια, τα νιτρικά άλατα, organometallics, νιτριλίων, υπεροξειδία, οι ανυδρίτες,
- δ) αζώτου-φωσφόρου που υποστηρίζει άζωτο του αέρα των μειγμάτων και είναι επιλεκτικό για αζώτου / φωσφόρου,
- ε) φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (FPD), η οποία υποστηρίζει το υδρογόνο και το οξυγόνο του αέρα, ενδεχομένως, και είναι επιλεκτικό για το θείο, τον φώσφορο, τον κασσίτερο, το βόριο, το αρσενικό, το γερμάνιο, σελήνιο, χρώμιο (Busch 2001).

Όλες αυτές είναι διατάξεις οι οποίες ανιχνεύουν τη παρουσία των ενώσεων που διαφέρουν από το φέρον αέριο (κινητή φάση) και μετατρέπουν τις πληροφορίες σε ένα ηλεκτρικό σήμα. Για την ποιοτική ταυτοποίηση κάποιος πρέπει να βασίζεται σε αντιστοίχιση χρόνων κατακράτησης των γνωστών ενώσεων με τους χρόνους κατακράτησης των συστατικών στο άγνωστο μείγμα. Είναι σημαντικό να θυμόμαστε ότι κάθε αλλαγή των συνθηκών λειτουργίας θα επηρεάσει το χρόνο κατακράτησης με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ακρίβεια της αναγνώρισης. Έτσι, η χρωματογραφία αερίου χρησιμοποιείται πιο συχνά όταν κάποιος εκτελεί μια ανάλυση σε μείγματα γνωστών ουσιών, όπου έχει κανείς μια καλή ιδέα των ενώσεων που υπάρχουν σε ένα μείγμα, ώστε τα πρότυπα αναφοράς να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον καθορισμό των χρόνων κατακράτησης. Η ποιοτική και ποσοτική ταυτοποίηση για δείγμα άγνωστης σε μεγάλο βαθμό σύνθεσης, μπορεί να προσδιοριστεί με αέρια χρωματογραφία, συνδυασμένη με φασματομετρία μάζας. Ένα φάσμα μάζας οποιασδήποτε κορυφής ή όλων των κορυφών του χρωματογραφήματος μπορεί να συγκριθεί με τα φάσματα που περιέχονται σε αρχεία φασμάτων στον υπολογιστή του συστήματος (Busch 2001).

**Πίνακας 5.** Ιδιότητες ανιχνευτών για αέρια χρωματογραφία.

Ανιχνευτής	Εκλεκτικότητα	Ανιχνευσιμότητα <sup>α</sup>	Δυναμικό Εύρος <sup>α</sup>
Ιονικής φλογός (FID)	Περισσότερες οργανικές ενώσεις	100 pg	10 <sup>7</sup>
Θερμικής Αγωγιμότητας (TCD)	Καθολικός	1 ng	10 <sup>7</sup>
Σύλληψης Ηλεκτρονίων (ECD)	Αλογονομένα, Αμινο-ενώσεις, Νιτρίλια, Υπεροξειδία, Ανυδρίτες, Όργανομεταλλικές ενώσεις	50 fg	10 <sup>5</sup>
Αζώτου-Φωσφόρου (NPD)	Άζωτο – Φωσφόρος	10 pg	10 <sup>6</sup>
Φωτομετρικής φλογός (FPD)	Θείο, Φωσφόρος, Κασσίτερος, Βόριο, Αρσενικό, Γερμάνιο, Σελήνιο, Χρώμιο	100 pg	10 <sup>3</sup>
Φώτο-ιονισμού (PID)	Αλιφατικές - Αρωματικές ενώσεις, Κετόνες, Αλδεΐδες, Αμίνες, Ετεροκυκλικές ενώσεις, Οργανοθειικά, Μερικές οργανομεταλλικές, O <sub>2</sub> , NH <sub>3</sub> , H <sub>2</sub> S, HI, ICl, Cl <sub>2</sub> , I <sub>2</sub> , PH <sub>3</sub>	2pg	10 <sup>7</sup>
Ηλεκτρολυτικής Αγωγιμότητας (HECD)	Χλωριομένα, Άζωτο, Θείο, Νιτροζαμίνες		

<sup>α</sup>Τυπικό όριο για ενώσεις με μεγάλη απόκριση (Harris 1999).

## 2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

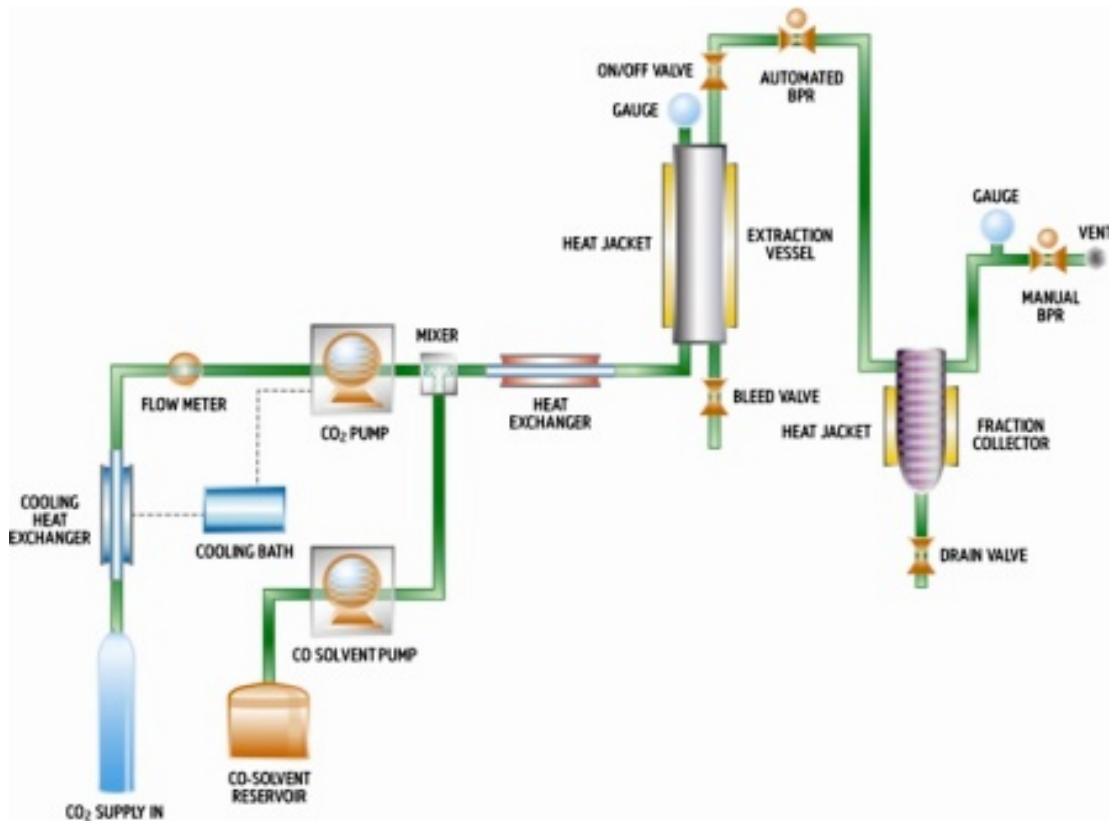
Το μέλι, ως ιδιαίτερα δύσκολο υπόστρωμα, πρέπει απαραίτητως να υπόκειται σε προκατεργασία, για να παίρνονται αξιόπιστα αποτελέσματα. Οι διάφορες μεθοδολογίες που έχουν προταθεί τις τελευταίες δεκαετίες κυρίως αποσκοπούν α) στην ελαχιστοποίηση των χειρισμών του δείγματος κι άρα στην ευκολία αυτού και β) στη μείωση των τοξικών αποβλήτων μετά την κατεργασία (Rissato 2004). Η εκχύλιση των φυτοφαρμάκων από το μέλι, γίνεται συνήθως με μία από τις παρακάτω τεχνικές : (i) εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό, (SFE) (ii) εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (MAE) (iii) εκχύλιση διασποράς στερεής φάσης (matrix solid-phase dispersion (MSPD)) (iv) μικροεκχύλιση στερεάς φάσης SPME, (v) Quechers, (vi) εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction), (vii) εκχύλιση με μπάρα προσρόφησης (SBSE) και (viii) εκχύλιση με χρήση μεμβρανών.

### 2.1 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΥΠΕΡΚΡΙΣΙΜΟ ΡΕΥΣΤΟ (*Supercritical Fluid Extraction*).

Η SFE αποτελεί μια αποδοτική και γρήγορη μέθοδος για την απομόνωση των φυτοφαρμάκων από το μέλι (Fernandez 2002; Rissato 2004). Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί τις μοναδικές ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών για να διευκολύνει την εκχύλιση των φυτοφαρμάκων από τα στερεά δείγματα. Ένα υπερκρίσιμο ρευστό είναι μια ουσία της οποίας οι τιμές της θερμοκρασίας και της πίεσής του είναι πάνω από την κρίσιμες. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO<sub>2</sub>) έχει γίνει ο διαλύτης της επιλογής για τις περισσότερες εφαρμογές SFE, κι αυτό διότι το CO<sub>2</sub> έχει μια εξαιρετικά χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία (31 °C) και πίεση (73 ATM), και είναι διαθέσιμο σε υψηλή καθαρότητα. Το εξαιρετικά κρίσιμο CO<sub>2</sub> είναι ένας καλός διαλύτης για την εξαγωγή των μη πολικών ή μετρίως πολικών ενώσεων. Η αποδοτικότητα της εκχύλισης των πολικών ενώσεων από το CO<sub>2</sub> μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη των μικρών ποσοτήτων πολικών οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται ως τροποποιητές (Mitra 2003).

Η SFE έχει κερδίσει αυξανόμενη προσοχή ως πιθανή εναλλακτική λύση σχετικά με την απαρχαιωμένη SE λόγω των συγκριτικών πλεονεκτημάτων της: (i) είναι γρηγορότερη (10-60 min), (ii) χρησιμοποιεί το ελάχιστο ποσό διαλυτών (5-10mL.), (iii) το CO<sub>2</sub> είναι μη

τοξικό, άφλεκτο και περιβαλλοντικά φιλικό, (iv) η εκλεκτική εκχύλιση γίνεται χωρίς πρόσθετο καθαρισμό (Atienza, Jimenez et al. 1993), και απαιτείται ελάχιστος όγκος (<10g) δείγματος. Εντούτοις, ένας από τους κύριους περιορισμούς της SFE είναι ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκχυλιστούν τα φυτοφάρμακα άμεσα από το νερό λόγω της χαμηλής διαλυτότητας του CO<sub>2</sub> στο νερό (Rissato, Galhiane et al. 2004).



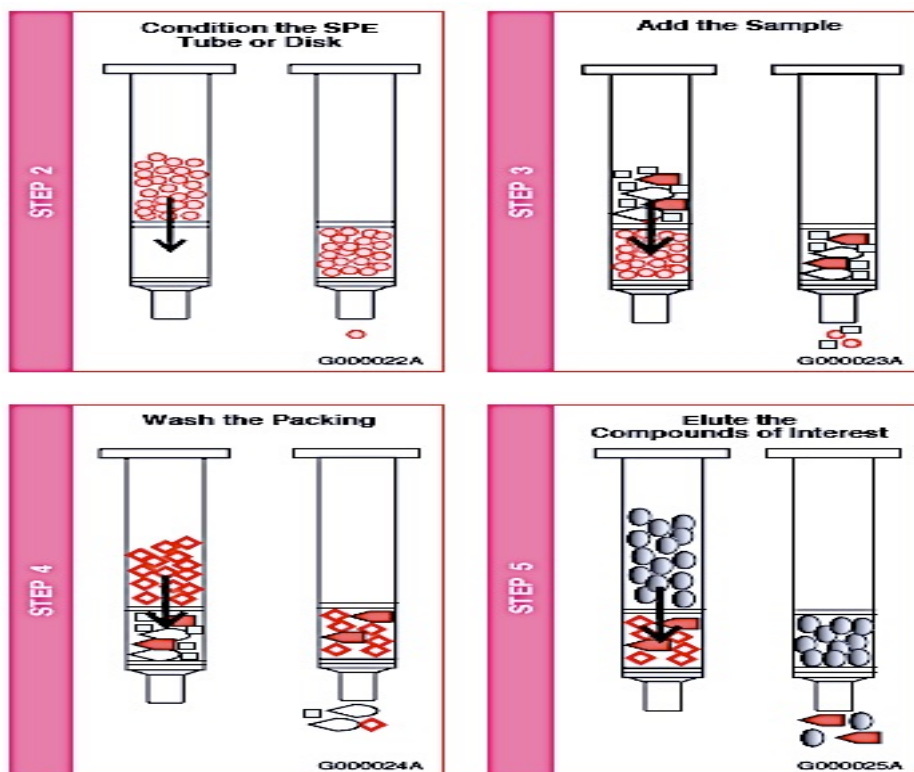
**Σχήμα 2.** Σχηματική αναπαράσταση της οργάνωσης μιας διάταξης SFE ([http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=fr\\_CH&cid=10146521](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=fr_CH&cid=10146521))

## 2.2 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid Phase Extraction)

Στην τεχνική SPE το δείγμα περνά μέσω μιας στήλης πληρώσεως που γεμίζει με ένα προσροφητικό στερεό όπου προσροφώνται τα φυτοφάρμακα. Στη συνέχεια αυτά ακολουθεί της πλύσης προ αποφυγή παρεμποδίζουσων ενώσεων και παραλαμβάνονται με τη βοήθεια ενός οργανικού διαλύτη. Και αυτή η τεχνική παρουσιάζει διάφορα πλεονεκτήματα σε σχέση με τη παραδοσιακή SE: (i) είναι λιγότερο χρονοβόρα, (ii) παρουσιάζει μειωμένη χρήση τοξικών διαλυτών, (iii) η αποδοτικότητα της εκχύλισης δεν

εμποδίζεται από το σχηματισμό των γαλακτωμάτων, και (iv) προσφέρει τη δυνατότητα της αυτοματοποίησης (Herrera, Perez-Arquillue et al. 2005).

Παρόλα αυτά, η ανάλυση μεγάλων όγκων δειγμάτων δεν είναι δυνατή σε μερικές περιπτώσεις, και οι μικροστήλε SPE (cartridges) κατασκευάζονται συνήθως από πλαστικό, το οποίο μπορεί να προσροφά τα κατάλοιπα και επίσης να αυξήσει τις παρεμβολές στην ανάλυση (Arthur 1990). Προτού να πραγματοποιηθεί μια ανάλυση με SPE, το δείγμα συνήθως αραιώνεται με νερό (Blasco, Fernandez et al. 2003) μεθανόλη (Tsipi, Triantafyllou et al. 1999), μίγματος αυτών (Jansson 2000) ή μίγμα αιθανόλης νερού (Tsigouri, Menkissoglu-Spiroudi et al. 2001). Ως προσροφητικό μέσο για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων από δείγματα μελιού χρησιμοποιείται κυρίως, υλικό αντίστροφης φάσης C<sub>18</sub>.



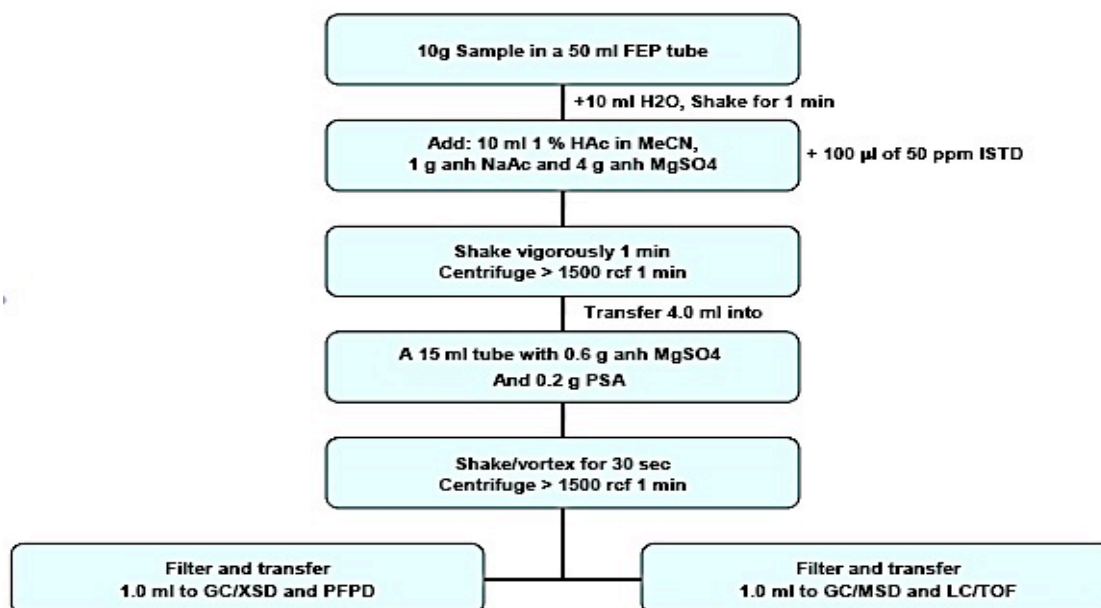
**Σχήμα 3.** Στάδια εκχύλισης SPE : α) Πλύση της στήλης με τον διαλύτη εκχύλισης, β) Προσθήκη του δείγματος, γ) Καθαρισμός της στήλης από ενώσεις που τυχόν παρεμποδίζουν την ανάλυση, δ) Παραμονή μόνο των επιθυμητών ενώσεων στη στήλη (<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>)

### **2.3) QUECHERS (Quick – Easy – Cheap – Effective – Rugged – Safe)**

Οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα είναι συνήθως μακροσκελείς διαδικασίες, που απαιτούν μεγάλο όγκο δείγματος και ένα ή περισσότερα βήματα καθαρισμού των εκχυλισμάτων. Συνεπώς είναι διαδικασίες σχετικά χρονοβόρες, απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό, περίπλοκες, ακριβές και παράγουν σημαντικούς όγκους αποβλήτων. Επιπλέον, οι παραδοσιακές μέθοδοι συνεδεύονται από χαμηλή απόδοση και περιλαμβάνουν συχνά τα εκχυλίσματα από μια μόνο οικογένεια ενώσεων. Αφ' ενός, η μεθοδολογία QuEChERS (Quick – Easy – Cheap – Effective – Rugged – Safe ) μειώνει το όγκο των δειγμάτων κι αφ' ετέρου τη χρήση εργαστηριακών δοχείων κι αντιδραστηρίων. Σαφώς, η μέθοδος QuEChERS απαιτεί λιγότερα βήματα (καθόλου διήθηση, μεγάλη ποσοτική μεταφορά όγκου, βήμα εξάτμισης/επανασυμπύκνωσης, ή διαλυτική ανταλλαγή που απαιτείται): αυτό είναι πολύ σημαντικό, δεδομένου ότι κάθε πρόσθετο αναλυτικό βήμα περιπλέκει τη διαδικασία και είναι επίσης μια πιθανή πηγή συστηματικών και τυχαίων λαθών (Wilowska 2011). Η βασική ιδέα της μεθόδου, είναι ότι το δείγμα έρχεται σε επαφή αρχικά με έναν αναμίξιμο με νερό διαλύτη όπως ακετονιτρίλιο / ακετόνη (Anastassiades 2003), ή οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate) (Banerjee 2007) παρουσία υψηλού ποσοστού αλάτων κυρίως χλωριούχου νατρίου / θειικού άλατος του μαγνησίου και των ρυθμιστικών διαλυμάτων για να προκαλέσει αφ' ενός το διαχωρισμό των φάσεων και αφ' ετέρου να σταθεροποιήσει τα ασταθή σε όξινο και βασικό pH φυτοφάρμακα. Μετά την ανάδευση και τη φυγοκέντριση, ένα μέρος του όγκου της οργανικής φάσης υποβάλλεται σε περαιτέρω καθαρισμό με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (d-SPE). Μετά από τον καθαρισμό, το μίγμα υποβάλλεται σε φυγοκέντριση και το προκύπτον υπερκείμενο υγρό μπορεί να αναλυθεί άμεσα ή μπορεί να υποβληθεί σε μια συγκέντρωση και ένα βήμα αλλαγής διαλύτη εάν είναι απαραίτητο.



## The new QuEChERS method for honey extraction



**Σχήμα 4.** Πρωτόκολλο για εκχύλιση υπολλειματικών φυτοφαρμάκων σε μέλι με τη μέθοδο QUECHERS (Lehotay 2004)

### 2.4 ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΙΚΡΟΚΥΜΜΑΤΑ (*Microwave Assisted Extraction*)

Οι φούρνοι μικροκυμάτων, που χρησιμοποιήθηκαν αρχικά για την θερμική επεξεργασία δειγμάτων, έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης για την εκχύλιση ουσιών, και προσφέρουν ορισμένα πλεονεκτήματα όπως τις βελτιωμένη αποδοτικότητα, το μειωμένο χρόνο εξαγωγής, τη μικρή κατανάλωση διαλύτη και το υψηλό επίπεδο της αυτοματοποίησης έναντι των συμβατικών τεχνικών εξαγωγής (Eskilsson and Bjorklund 2000). Η αρχή της μεθόδου βρίσκεται στο γεγονός ότι η ενέργεια των μικροκυμάτων απορροφάται από το μέσο εκχύλισης το οποίο τη μεταφέρει στη συνέχεια στο δείγμα υπό μορφή θερμότητας. Ο διαχωρισμός των αναλυτών από το υπόστρωμα του δείγματος στο μέσο εκχύλισης (διαλύτη) εξαρτάται κυρίως από τη θερμοκρασία, τη φύση του μέσου εκχύλισης, και την ισχύ της ακτινοβολίας.

Ανάλογα με τη φύση του δείγματος, τα στάδια προκατεργασίας περιλαμβάνουν συνήθως λειοτρίβιση του στερεού δείγματος, προσθήκη διαλύτη, συνήθως μίγματος νερού/ακετονιτριλίου, εκχύλιση στη συσκευή, και στη συνέχεια προσθήκη άλατος στον όγκο του υπερκείμενου υγρού σε άλλο δοχείο όπου αν χρειαστεί, ακολουθεί εξάτμιση κι

επαναδιάλυση.

Η υποβοηθούμενη από μικροκύμματα εκχύλιση, (MAE) έχει χρησιμοποιηθεί κυρίως για την εκχύλιση των επίμονων οργανικών ρύπων όπως τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) και των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs) από ποικίλα υποστρώματα (κυρίως χώματα και ιζήματα), ενώ στον τομέα της ανάλυσης υπολειμματικών φυτοφαρμάκων στους ιστούς ζώων και φυτών, οι αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναφερθεί για οργανοφωσφορικά (Diagne, Foster et al. 2002), οργανοχλωριωμένα (Vetter, Weichbrodt et al. 1998; Prados-Rosales, Luque Garcia et al. 2003) και άλλα φυτοφάρμακα (Falqui-Cao, Wang et al. 2001).

### **2.5) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΜΕ ΜΠΑΡΑ ΑΝΑΔΕΥΣΗΣ-ΠΡΟΣΡΟΦΗΣΗΣ (*Stir Bar Sorptive Extraction*)**

Η SBSE είναι σχετικά νέα τεχνική, θεωρητικά παρόμοια με την μικροεκχύλιση στερεάς φάσης. Έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την εξαγωγή των οργανικών ενώσεων από τρόφιμα με μεγάλη υγρασία, τα βιολογικά αλλά και περιβαλλοντικά δείγματα. Στην τεχνική SBSE το δείγμα αναδεύεται για ένα δεδομένο χρόνο με μια μπάρα ανάδευσης (πολυμερές) η επιφάνεια της οποίας είναι καλυμμένη με ένα προσροφητικό μέσο, έως ότου ο αναλύτης φθάσει σε ισορροπία μεταξύ του πολυμερούς και της υγρής φάσης ανάλογα με σταθερά κατανομής τους. Κατόπιν η προς ανάλυση ουσίες εκροφώνται λόγω υψηλών θερμοκρασιών στο λιμένα εγχυτήρων της αέριας χρωματογραφίας ή με υγρή αφαίρεση για την ανάλυση HPLC.

Η δυνατότητα εφαρμογής SBSE για να ανιχνεύσει τα φυτοφάρμακα στα φρούτα και τα λαχανικά και το μέλι έχει αποδειχθεί επιτυχώς (Wennrich, Ropp et al. 2001; Blasco, Font et al. 2002), όπου για το τελευταίο κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι αν και η γραμμικότητα και η ακρίβεια που λαμβάνονται από τις τεχνικές SPME και SBSE είναι παρόμοιες, η δεύτερη είναι ακριβέστερη, πιο ευαίσθητη και παρουσιάζει μικρότερες παρεμβολές λόγω του υποστρώματος μελιού σε σχέση με τη πρώτη.



**Σχήμα 5.** Μπάρα ανάδευσης μέσα σε δείγμα με σκοπό την προσρόφηση του αναλύτη στην επιφάνεια PDMS

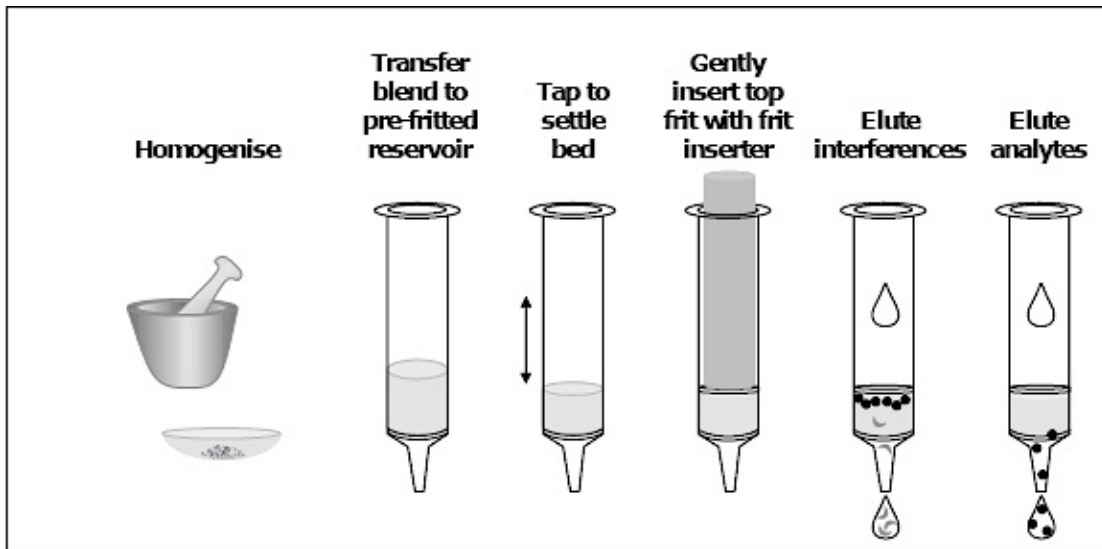
(<http://precedings.nature.com/documents/5736/version/1/files/npre20115736-1.pdf>)

## **2.6) ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (*Matrix Solid Phase Dispersion*)**

Η MSPD είναι μια τεχνική εκχύλισης και καθαρισμού που αναπτύχθηκε αρχικά το 1989 για να αποφύγει τα γενικά μειονεκτήματα της SPE για την εξαγωγή των αναλυτών από τα στερεά ή ημιστερεά δείγματα (Barker 2007). Αυτή η τεχνική απαιτήσε λιγότερο χρόνο και διαλύτη από τη SPE και παρέχει παρόμοια αποτελέσματα. Επιπλέον, αποφεύγει τα προηγούμενα βήματα αραιώσης για τα στερεά ή ημιστερεά δείγματα προκειμένου να αυτά εξαχθούν από το SPE. Στην MSPD το δείγμα ομογενοποιείται κι αναμιγνύεται με ένα προσροφητικό μέσο, γενικά florisil ή C<sub>18</sub>, και μεταφέρεται έπειτα σε μια στήλη. Το υλικό προσρόφησης έχει διάφορες λειτουργίες:

- (1) δρα ως ένωση που σπάζει τη φυσική δομή του δείγματος,
- (2) προσροφά τις ενώσεις του υποστρώματος,
- (3) λειτουργεί ως στερεά ουσία για την πλήρωση της στήλης και
- (4) επιτρέπει τη κλασματοποίηση του δείγματος. Η στήλη διαχωρίζεται με εκλούεται τελικά με έναν κατάλληλο διαλύτη και έπειτα το εκχύλισμα μπορεί να αναλυθεί άμεσα. Τυχούσες παρεμβάλουσες ουσίες, όπως οι χρωστικές ή άλλες πολικές ενώσεις, διατηρούνται στο προσροφητικό μέσο. Αυτή η τεχνική αξιολογήθηκε επιτυχώς για την εκχύλιση των OCPs, από το μέλι (Barker 2007) με τον ακόλουθο τρόπο:

το δείγμα αραιώθηκε στη μεθανόλη και μεταφέρθηκε σε μια στήλη με florisil και άνυδρο θειικό άλας νατρίου. Κατόπιν τα φυτοφάρμακα διαχωρίστηκαν με εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα. Αυτή η μέθοδος παρέχει ανακτήσεις μεταξύ των ορίων 60% και 113% και όριο ανίχνευσης χαμηλότερο από  $0.015 \text{ mg kg}^{-1}$ .



**Σχήμα 6.** Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής MSPD.

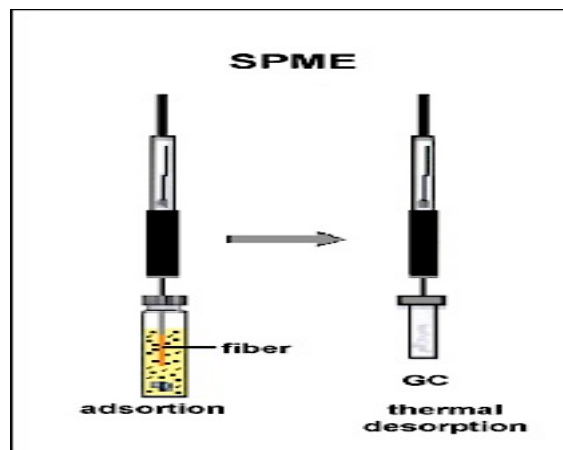
([http://www.jasco.hu/konyvtar/TN111\\_Matrix\\_solid\\_phase\\_dispersion\\_MSPD.pdf](http://www.jasco.hu/konyvtar/TN111_Matrix_solid_phase_dispersion_MSPD.pdf))

## **2.7) ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ (Solid Phase Micro Extraction)**

Η τεχνική SPME έχει γίνει ιδιαίτερα δημοφιλής για την ανάλυση των οργανικών ενώσεων επειδή συνδυάζει τη δειγματοληψία και τη προσυγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας σε ένα ενιαίο βήμα. Σε αυτήν την τεχνική μια ίνα πυριτίου που επιστρώνεται με μια πολυμερή ταινία βυθίζεται στο δείγμα. Τα φυτοφάρμακα προσροφώνται στη στάσιμη φάση και αργότερα εκροφώνται λόγω θερμότητας στον εισαγωγέα ενός αερίου χρωματογράφου. Η SPME μειώνει τα προβλήματα που συνδέονται με την SPE, διατηρώντας τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

(i) οι διαλύτες αποβάλλονται πλήρως, (ii) τα κενά μειώνονται πολύ, (iii) ο χρόνος εκχύλισης μειώνεται σε λεπτά, (iv) παρέχει καλά αποτελέσματα σε ένα ευρύ φάσμα των συγκεντρώσεων αναλύτη, (v) δεν απαιτεί την πλήρη αφαίρεση του αναλύτη από το υγρό υπόστρωμα, και (vi) μπορεί να αυτοματοποιηθεί εύκολα (Pawliszyn 1990; Fernandez 2002),

κι έχει αξιολογήθηκε επιτυχώς για την εξαγωγή των OCPs από το μέλι. Προφανώς, ένα σημαντικό θέμα σε αυτήν την μεθοδολογία είναι η σύνθεση των ινών. Κατά συνέπεια, τα περισσότερα φυτοφάρμακα έχουν εξαχθεί με polydimethylsiloxane (PDMS) (Blasco 2002), καθώς αυτό παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι άλλων ινών όπως (i) ενισχυμένη αναπαραγωγικότητα, (ii) χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, (iii) μεγαλύτερη γραμμικότητα, (iv) βελτιωμένους συντελεστές συσχέτισης, (β) χαμηλός χρόνος εξαγωγής, και (vi) καλύτερα χρωματογραφήματα (Jimenez, Bernal et al. 1998)



**Σχήμα 7.** Τεχνική προκατεργασίας δείγματος για φυτοφάρμακα σε μέλι με SPME (Rial-Otero 2007)

## **2.8) ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ ΥΓΡΟΥ-ΥΓΡΟΥ (DISPERSIVE LIQUID LIQUID MICRO EXTRACTION)**

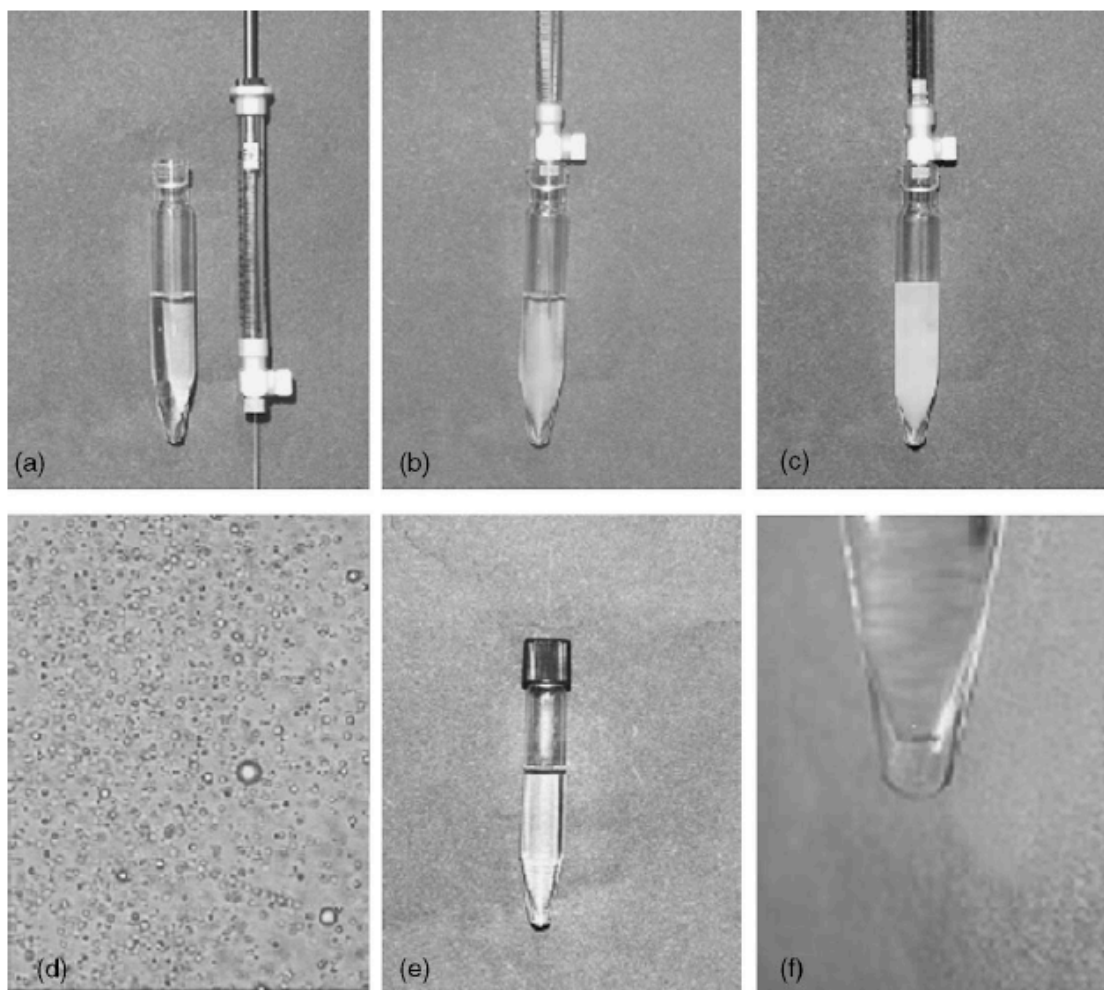
Προκειμένου να υπερνικηθούν τα μειονεκτήματα των τεχνικών SPME και SPE, αναπτύχθηκε η μικροεκχύλιση διασποράς υγρού-υγρού (DLLME) (Fu 2009; Zang 2009; Chena 2010) που είναι βασισμένη σε ένα τριαδικό διαλυτικό σύστημα, όπως η ομοιογενής εκχύλιση υγρού-υγρού. Σε αυτήν την τεχνική, το κατάλληλο μίγμα διαλύτη εκχύλισης κι διασποράς εγχύονται σε ένα υδατικό δείγμα βίαια μέσω σύριγγας, κι ο διαλύτης εκχύλισης διασκορπίζεται στο υδατικό δείγμα με τη μορφή πολύ λεπτών σταγονιδίων, δίνοντας έτσι τη μέγιστη δυνατή επιφάνεια ώστε ο αναλύτης να μεταφέρεται εύκολα στο διαλύτη εκχύλισης. Όταν η ισορροπία εκχύλισης αποκαθίσταται, ακολουθεί ο διαχωρισμός των φάσεων με τη βοήθεια φυγοκέντρου, όπου το εκχύλισμα καθιζάνει λόγω βαρύτητας και στη

συνέχεια ακολουθεί συνήθως χρωματογραφική ανάλυση. Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής DLLME είναι :

- α) απλότητα της αρχής λειτουργίας,
- β) ταχύτητα,
- γ) χαμηλό κόστος,
- δ) υψηλοί παράγοντες προσυγκέντρωσης,
- ε) χαμηλή κατανάλωση διαλυτών,
- στ) δυνατότητα ανάλυσης δειγμάτων με πολύπλοκα υποστρώματα, και
- ζ) υψηλή εκλεκτικότητα

Και το πιο σημαντικό, θα μπορούσε να εφαρμοστεί για αναλύσεις ρουτίνας καθώς η εκχύλιση λαμβάνει χώρα σε λίγα δευτερόλεπτα. Ως κύριο μειονέκτημα της μεθόδου είναι το γεγονός ότι η παραλαβή της εμπλουτισμένης οργανικής φάσης γίνεται από το κάτω μέρος του δοκιμαστικού σωλήνα όπως φαίνεται και στο Σχήμα 8 (Wang, You et al. 2010).

Αυτή η μέθοδος έχει εφαρμοστεί επιτυχώς σε μέλι για την ανάλυση των αντιβιοτικών chloramphenicol και thiamphenicol (Chen, Ying et al. 2009).



**Σχήμα 8.** Φωτογραφίες των διάφορων σταδίων της DLLME a) Πριν την εισαγωγή του μίγματος των διαλυτών στο μίγμα, b) Βίαιη έγχυση του διαλυτικού μίγματος μέσα στο δείγμα, c) Τέλος έγχυσης - ισορροπία εκχύλισης, d) Φωτογραφία οπτικού μικροσκοπίου ( $\chi$  1000) όπου διακρίνονται τα σταγονίδια των διαλυτών σε μορφή νέφους, e) Μετά τη φυγοκέντρηση, f) Μεγεθυμένη όψη της οργανικής φάσης μετά τη φυγοκέντρηση.

### **3. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας νέας αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό 15 υπολειμματικών οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού, με χρωματογραφία αερίου (GC) και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD), μετά από μικροεκχύλιση υγρού – υγρού τύπου διασποράς (dispersive liquid liquid microextraction, DLLME).



## 4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 4.1. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους χρησιμοποιήθηκαν πιπέτες:

- A) 20-200  $\mu\text{L}$  της εταιρείας CAPP (Denmark)
- B) 2-20  $\mu\text{L}$  της εταιρείας CAPP (Denmark)
- Γ) 100 $\mu\text{L}$  - 1 mL της εταιρείας HAMILTON (USA)
- Δ) 10-100 $\mu\text{L}$  της εταιρείας GILSON (France)

Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη μικροσύριγγες:

- A) 0-1000  $\mu\text{L}$  της εταιρείας HAMILTON (USA)
- B) 0-10  $\mu\text{L}$  της εταιρείας SGE (Australia)
- Γ) 0-100  $\mu\text{L}$  της εταιρείας HAMILTON (Switzerland)

Το σύστημα της αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Thermo Electron Corporation με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων και αυτόματο δειγματολήπτη TRIPLUS AS. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων του τύπου ELMA-S30H της ELMA-SONIC (Germany) και φυγόκεντρος τύπου LABOFUGE III της εταιρείας HERAUS (Germany). Όπου χρειάστηκε μέτρηση του pH χρησιμοποιήθηκε Ph-μετρο ORION 3 STAR της εταιρείας THERMO ELECTRON CORPORATION (USA). Η ζύγιση των δειγμάτων έγινε σε 4 δεκαδικών ψηφίων της εταιρείας KERN-ABJ (Germany). Η μέτρηση της αγωγιμότητας πραγματοποιήθηκε σε ένα αγωγιμόμετρο ACCUMET BASIC – AB30 (USA), ενώ οι υάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες που χρησιμοποιήθηκαν για την μικροεκχύλιση DLLME ήταν όγκου 10 mL και προμηθεύτηκαν από την εταιρία CORNING (Mexico).

Οι πειραματικές συνθήκες για το σύστημα της χρωματογραφίας αερίου ήταν:

**Θερμοκρασία εισαγωγέα:** 250 °C (κατάσταση splitless)

**Θερμοκρασιακό πρόγραμμα της στήλης:** 100 °C (hold 2min)

25 °C/min 150 °C (hold 0 min)

7 °C/min 225 °C (hold 0 min)

10 °C/min 290 °C (hold 5 min)

**Χρόνος ανάλυσης:** 26.21 min

**Όγκος δείγματος ( $V_{inj}$ ):** 2  $\mu$ L

**Συνθήκες του ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD):** θερμοκρασία βάσης: 320 °C, θερμοκρασία ανιχνευτή: 350 °C, Ref. current: 1 nA, Pulse amplitude: 50V, Pulse width: 0.5 ( $\mu$ sec), βοηθητικό αέριο: Make-up ( $N_2$ ): 30 mL/min

#### 4.2. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Το πρότυπο μίγμα των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων συγκέντρωση 1000 mg L<sup>-1</sup> το καθένα προμηθεύτηκε από την εταιρία ACCUSTANDARDS ενώ το εσωτερικό πρότυπο (1-βρωμο-δεκαεξάνιο) της εταιρείας MERCK (Γερμανία). Όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη ήταν αναλυτικής καθαρότητας. Το υδροχλωρικό οξύ και το στερεό NaOH ήταν της εταιρείας Carlo Erba (Ιταλία) ενώ η χρωστική ένωση Sudan ήταν καθαρότητας 90 %. Οι παρακάτω οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν προμηθεύτηκαν από:

- Ακετονιτρίλιο, μεθανόλη και ακετόνη της εταιρείας S.T Baker (Ολλανδία),
- Αιθανόλη της Panreac (Ισπανία),
- Τετραχλωροαιθυλένιο της εταιρείας Alpha Aesar (Γερμανία),
- Χλωροφόρμιο και διχλωρομεθάνιο του οίκου Merck (Γερμανία),
- n-hexane του οίκου Merck (Ισπανία),
- Υδροχλωρικό οξύ της εταιρείας Carlo erba (Ιταλία),
- sodium-hydroxide , sudan III

#### 4.3. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Τα πρότυπα μίγματα των οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων παρασκευάζονται με αραιώση με ακετονιτρίλιο από ένα πρότυπο μίγμα ( $1000 \text{ mg L}^{-1}$ ). Όλα τα μίγματα ήταν τοποθετημένα σε σκουρόχρωμα φιαλίδια και συντηρούνταν στους  $-18 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Οι αραιώσεις των διαλυμάτων για την παρασκευή προτύπων μιγμάτων γίνονταν κάθε ημέρα εργασίας.

## 5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

### 5.1. Αρχή της μεθόδου

Στην παρούσα εργασία προτείνεται μια νέα τεχνική προκατεργασίας δείγματος – η μικροεκχύλιση υγρού τύπου διασποράς (dispersive liquid liquid microextraction, DLLME) – για τον προσδιορισμό υπολειμματικών οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Η προτεινόμενη μεθοδολογία βασίζεται, στη δημιουργία μικροσταγονιδίων ενός οργανικού διαλύτη εκχύλισης (χλωροφόρμιο) μέσα στην υδατική φάση του διαλύματος μελιού (διασπορά), όταν αυτός προστεθεί «βίαια» με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας. Λόγω της πολύ μεγάλης επιφάνειας επαφής των δυο μη-αναμιγνυόμενων φάσεων, επιτυγχάνεται ικανοποιητική απόδοση σε μικρό σχετικά χρονικό διάστημα (περίπου 1 min). Η διασπορά του διαλύτη εκχύλισης στην υδατική φάση ενισχύεται αφού προαναμιχθεί με ένα οργανικό διαλύτη (διαλύτης διασποράς), π.χ. ακετονιτρίλιο, ο οποίος είναι αναμίξιμος και με τις δυο μη-αναμιγνυόμενες φάσεις. Μετά τη φυγοκέντριση και το διαχωρισμό των φάσεων, λαμβάνεται μια ποσότητα χλωροφορμίου, με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας, εξατμίζεται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύεται σε ακετονιτρίλιο. Τέλος, συγκεκριμένος όγκος του τελικού δείγματος ( $V_{inj.} = 2 \mu\text{L}$ ) εισάγεται στη χρωματογραφία αερίου για ανάλυση.

Συνοψίζοντας, τα στάδια της ανάλυσης είναι τα εξής:

- Σε υδατικό διάλυμα μελιού ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ), εισάγονται «βίαια» με μικροσύριγγα, 50  $\mu\text{L}$  χλωροφορμίου αφού προαναμιχθούν με 750  $\mu\text{L}$  ακετονιτρίλιου.
- Ανάδευση του μίγματος με το χέρι για 1 λεπτό περίπου
- Φυγοκέντριση στους 2500 rpm για 5 λεπτά.
- Παραλαβή 20  $\mu\text{L}$  χλωροφορμικής στοιβάδας
- Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα  $\text{N}_2$
- Επαναδιάλυση σε 20  $\mu\text{L}$  ακετονιτρίλιου και ανάλυση με χρωματογραφία αερίου

## **5.2. Βελτιστοποίηση της μεθόδου**

Τα στάδια βελτιστοποίησης των παραμέτρων της μεθόδου περιλαμβάνουν μια πλήρη σειρά πειραμάτων για την:

- ▶ Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών διαχωρισμού των φυτοφαρμάκων στην χρωματογραφία αερίου. Στο στάδιο αυτό περιλαμβάνεται κυρίως τη μελέτη του θερμοκρασιακού προγράμματος της στήλης.
- ▶ Εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της τεχνικής DLLME. Σκοπός του σταδίου αυτού είναι, η εύρεση των βέλτιστων τιμών των παραμέτρων που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μικροεκχύλισης όπως π.χ. το είδος και ο όγκος του οργανικού διαλύτη εκχύλισης αλλά και του διαλύτη διασποράς αντίστοιχα, το pH και η ιονική ισχύς του δείγματος και τέλος η ταχύτητα φυγοκέντρισης.

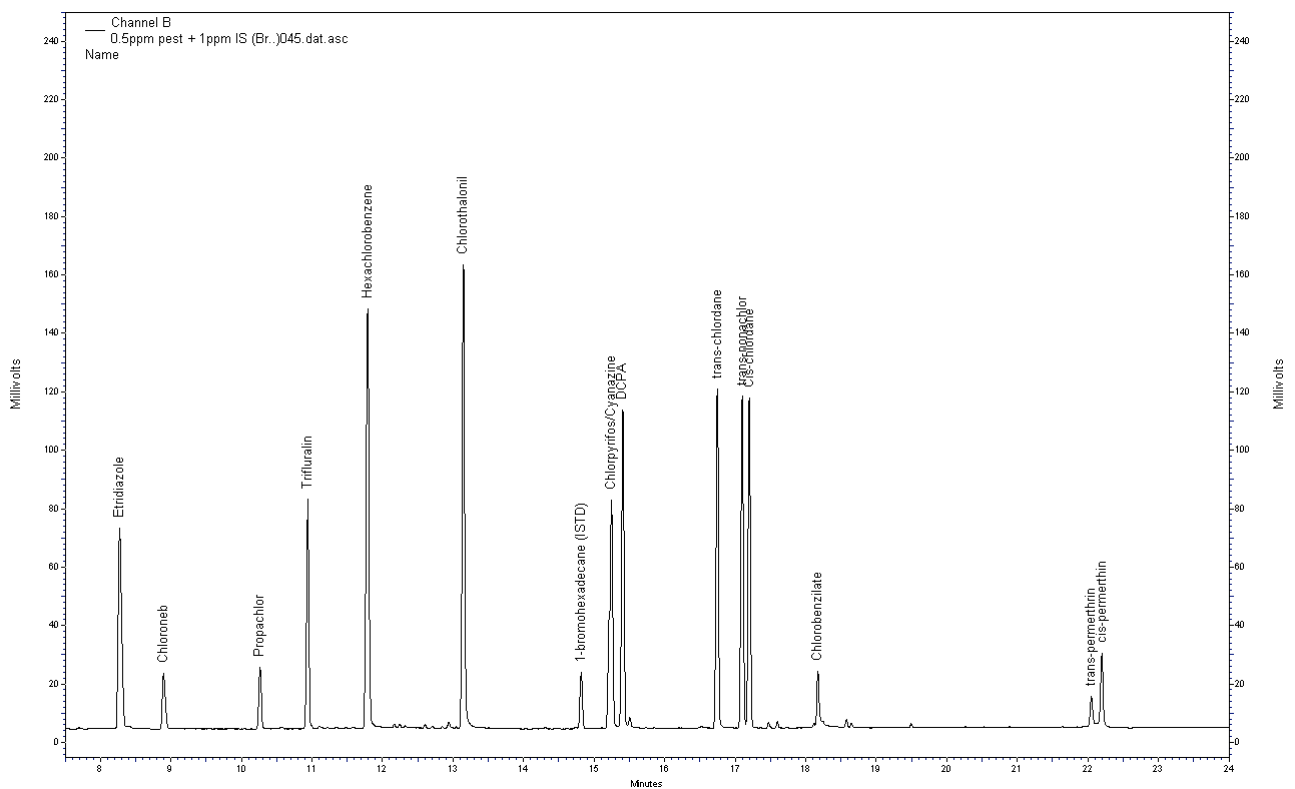
### **5.2.1. Ανάπτυξη του χρωματογραφικού διαχωρισμού – επιλογή εσωτερικού προτύπου**

Οι αρχικές χρωματογραφικές συνθήκες διαχωρισμού υιοθετήθηκαν από προηγούμενη μελέτη που έγινε με τη συγκεκριμένη οικογένεια φυτοφαρμάκων (Zacharis, Tzanavaras et al. 2010), ενώ η σειρά έκλουσής τους ταυτοποιήθηκε με χρωματογραφία αερίου με ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών (GC-EI-MS). Οι τελικές συνθήκες διαχωρισμού περιγράφονται στο κεφάλαιο 8.2. Για το ζεύγος των φυτοφαρμάκων cyanazine και chlorpyrifos δεν επιτεύχθηκε πλήρης διαχωρισμός και για το λόγο αυτό οι δυο αυτές ενώσεις θα συνυπολογίζονται σε όλη τη περαιτέρω μελέτη.

Η χρήση εσωτερικού προτύπου στην παρούσα εργασία είναι απαραίτητη, ώστε να εξασφαλίζεται η καλύτερη δυνατή επαναληψιμότητα και ακρίβεια των αποτελεσμάτων των ποσοτικών προσδιορισμών. Τα κριτήρια επιλογής του εσωτερικού προτύπου είναι:

- ✓ μην υπάρχει στα πραγματικά δείγματα.
- ✓ μην αντιδρά με κάποιο από τα προσδιοριζόμενα συστατικά.
- ✓ δίνει μόνο μία κορυφή στο χρωματογράφημα.
- ✓ παραμένει σταθερό σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης.
- ✓ είναι ανιχνεύσιμο με τον ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων.

Με βάση τα παραπάνω ως εσωτερικό πρότυπο επιλέχθηκε το 1-βρωμοδεκαεξάνιο το οποίο πληροί τις παραπάνω προϋποθέσεις και διαχωρίζεται ικανοποιητικά από τα μελετώμενα φυτοφάρμακα. Επίσης, ο χρόνος συγκράτησής του είναι 14,8 min ενώ δεν αυξάνεται ο συνολικός χρόνος ανάλυσης. Ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα διαχωρισμού των 15 μελετώμενων φυτοφαρμάκων και του εσωτερικού προτύπου φαίνεται στο σχήμα 9.



**Σχήμα 9.** Ανάλυση ενός μίγματος 15 οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων ( $500 \mu\text{g L}^{-1}$ ) και του εσωτερικού προτύπου ( $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ ) με τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

Οι χρόνοι συγκράτησης των ενώσεων, αλλά και η διαχωριστική ικανότητα (resolution) της στήλης φαίνονται στον Πίνακα 7. Όπως παρατηρείται από τις τιμές του Πίνακα 7, η διαχωριστική ικανότητα ήταν πάνω από 2 σε όλες τα ζεύγη φυτοφαρμάκων, εκτός από το ζεύγος cyanazine-chlorpyrifos όπου παρατηρήθηκε συνέκλουση. Σημειώνεται ότι, η διαχωριστική ικανότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με την USP (United State Pharmacopoeia) από την παρακάτω μαθηματική σχέση:

$$R_s = \frac{2(t_{R,B} - t_{R,A})}{w_A + w_B}$$

όπου  $R_s$  είναι η διαχωριστική ικανότητα,  $t_{R,A}$ ,  $t_{R,B}$ ,  $w_A$  και  $w_B$  είναι οι χρόνοι συγκράτησης και τα εύρη στη βάση των κορυφών των ενώσεων A και B, αντίστοιχα.

**Πίνακας 7.** Χρόνος συγκράτησης και διαχωριστική ικανότητα της στήλης.

<b>Φυτοφάρμακο</b>	<b>Χρόνος συγκράτησης (min)</b>	<b>Διαχωριστική ικανότητα<sup>a</sup> (<math>R_s</math>)</b>
Etridiazole	8.26	-
Chloroneb	8.29	7.3
Propachlor	10.25	18.7
Trifluralin	10.93	10.8
Hexachlorobenzene	11.74	12.9
Chlorothalonil	13.13	20
1-bromodecahexane (ISTD)	14.79	26.2
Chlorpyrifos-cyanazine	15.14	6.3
DCPA	15.93	2.3
trans-chlordane	16.73	20.5
cis-chlordane	17.09	5.4
trans-nonachlor	17.19	2.1
chlorobenzilate	18.20	15.9
cis-permethrin	22.06	65.9
trans-permethrin	22.20	2.4

<sup>a</sup> υπολογίστηκε κατά USP

Έγινε έλεγχος της γραμμικότητας προσδιορισμού των παραπάνω ενώσεων με πρότυπα μίγματα σε ακετονιτρίλιο. Για το σκοπό αυτό, παρασκευάστηκαν πρότυπα μίγματα των φυτοφαρμάκων σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 5 – 500  $\mu\text{g L}^{-1}$  με σταθερή συγκέντρωση εσωτερικού προτύπου (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Για τη κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης υπολογίστηκαν οι λόγοι του εμβαδού της κορυφής του κάθε φυτοφαρμάκου, προς το εμβαδόν κορυφής του εσωτερικού προτύπου. Το κάθε διάλυμα μετρήθηκε τρεις φορές ( $n = 3$ ).

Στον Πίνακα 8 δίνονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά (κλίση και τεταγμένη επί την αρχή) για κάθε φυτοφάρμακο, οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης  $r$  καθώς και εύρος της γραμμικής περιοχής. Υπογραμμίζετε ότι, η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, RSD %) των μετρήσεων δεν ξεπερνούσε το 5 %, ενώ το RSD των χρόνων συγκράτησης ήταν μικρότερο του 0.5 % σε όλες τις περιπτώσεις.

**Πίνακας 8.** Γραμμικότητα για τον προσδιορισμό των 15 φυτοφαρμάκων με εσωτερικό πρότυπο (1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) χωρίς μικροεκχύλιση.

<b>Φυτοφάρμακο</b>	<b><math>Y = AX + B</math></b>	<b>Εύρος (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b><math>r</math></b>
Etridiazole	$Y = 0.0900 X + 0.3563$	10-250	0,9971
Chloroneb	$Y = 0.0149 X + 0.2759$	50-500	0,9990
Propachlor	$Y = 0.0150 X + 0.1582$	50-500	0,9985
Trifluralin	$Y = 0.0860 X + 1.2027$	10-100	0,9966
Hexachlorobenzene	$Y = 0.3188 X + 1.7892$	5-50	0,9968
Chlorothalonil	$Y = 0.0011 X + 0.1493$	50-500	0,9987
Chlorpyrifos+cyanazine	$Y = 0.051 X + 0.059$	10 – 100	0,9992
DCPA	$Y = 0.1298 x + 1.751$	10-250	0,9974
trans-chlordane	$Y = 0.2562 X - 0.2466$	5-50	0,9998
cis-chlordane	$Y = 0.2157 X + 1.4194$	5-50	0,9955
trans-nonachlor	$Y = 0.2172 X + 1.2976$	5-50	0,9949
chlorobenzilate	$Y = 0.0182 X - 0.0139$	100-500	0,9999
cis-permethrin	$Y = 0.0025 X - 0.0687$	100-500	0,9982
trans-permethrin	$Y = 0.0095 X + 0.1136$	50-500	0,9985



## 5.2.2. Μελέτη των συνθηκών της μικροεκχύλισης DLLME

### 5.2.2.1 Προκαταρκτικά πειράματα

Η μελέτη των παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση της μικροεκχύλισης έγινε χρησιμοποιώντας υδατικό διάλυμα από ένα συνδυασμένο (pooled) μίγμα από 5 εμπορικά διαθέσιμα δείγματα μελιού ( $n = 5$ ). Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων πραγματοποιήθηκε με τη μονοπαραμετρική (uni-variate) μέθοδο στην οποία μελετάται μια παράμετρος κάθε φορά διατηρώντας τις υπόλοιπες σταθερές. Σημειώνεται ότι, τα δείγματα μελιού που χρησιμοποιήθηκαν είναι εμπορικά διαθέσιμα, και δεν περιείχαν τα εν λόγω φυτοφάρμακα.

Ένας από τους βασικούς στόχους των προκαταρκτικών πειραμάτων ήταν η μελέτη της συγκέντρωσης του μελιού στο υδατικό διάλυμα, με απώτερο σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Οι αρχικές συνθήκες της μικροεκχύλισης ήταν: 500  $\mu\text{L}$  ακετονιτρίλιο (ACN) + 50  $\mu\text{L}$   $\text{CHCl}_3$ , ενώ για το διαχωρισμό των φάσεων το μίγμα φυγοκεντρήθηκε στους 2000 rpm για 3 min.

Τα πειράματα έδειξαν ότι η επαναληψιμότητα δεν ήταν ικανοποιητική ( $> 30\%$ ) για συγκεντρώσεις μελιού πάνω από  $50 \text{ g L}^{-1}$ . Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στο ότι, αυξάνοντας τη συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος μελιού αυξάνεται και η πυκνότητά του, με αποτέλεσμα τα μικροσταγονίδια του χλωροφορμίου να συναντούν δυσκολία στην καταβύθισή τους συνιστώντας στον μη επαναλήψιμο τελικό όγκο της οργανικής στοιβάδας. Ειδικά, σε συγκεντρώσεις της τάξης των  $200 \text{ g L}^{-1}$ , ένα μέρος των μικροσταγονιδίων παρέμειναν στην επιφάνεια του διαλύματος μετά τη φυγοκεντρηση, γεγονός που υποδηλώνει ότι η πυκνότητα του υδατικού διαλύματος ήταν μεγαλύτερη από αυτή του χλωροφορμίου στις συγκεκριμένες συνθήκες. Τελικά, η τιμή των  $50 \text{ g L}^{-1}$  επιλέχθηκε ως συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος μελιού και υιοθετήθηκε για τα επόμενα πειράματα. Επίσης, αξίζει να σημειωθεί ότι σε όλα τα πειράματα μετά το πέρας της μικροεκχύλισης παρατηρήθηκε ένα λευκό «λευκό» στρώμα μεταξύ της υδατικής και της οργανικής φάσης. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην καταβύθιση διαφόρων πολυσακχαριτών από το υπόστρωμα του μελιού λόγω της φυγοκέντρωσης και της παρουσίας οργανικών διαλυτών στο μίγμα εκχύλισης.

Ο παράγοντας προσυγκέντρωσης (enrichment factor, EF) χρησιμοποιείται ευρέως στις τεχνικές μικροεκχύλισης ως ένας γνώμονας αποτελεσματικότητας των τεχνικών αυτών. Η παράμετρος αυτή δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$EF = \frac{C_{aq}}{C_{org}}$$

όπου  $C_{aq}$  και  $C_{org}$  είναι οι συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων στην υδατική και στην οργανική φάση, αντίστοιχα.

Στη παρούσα μελέτη, οι συγκεντρώσεις των ενώσεων  $C_{aq}$  ήταν σταθερές και ίσες με  $10 \mu\text{g L}^{-1}$  (ή  $200 \text{ ng g}^{-1}$  μελιού), ενώ ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων στην οργανική στοιβάδα  $C_{org}$  έγινε με τη βοήθεια καμπυλών βαθμονόμησης που λήφθηκαν για κάθε φυτοφάρμακο, χωρίς εσωτερικό πρότυπο. Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα μίγματα των ενώσεων στο εύρος συγκεντρώσεων από 250 έως  $2000 \mu\text{g L}^{-1}$ .

**Πίνακας 9.** Γραμμικότητα για τον προσδιορισμό των 15 φυτοφαρμάκων, χωρίς εσωτερικό πρότυπο.

Φυτοφάρμακο	Y = A x + B	Εύρος ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	r
Etridiazole	Y = 43866200 X + 21997192	250 - 2000	0,9922
Chloroneb	Y = 10887531 X + 6289993	250 - 2000	0,9956
Propachlor	Y = 10601313 X + 6055905	250 - 2000	0,9941
Trifluralin	Y = 33967200 X + 19179808	250 - 2000	0,9922
Hexachlorobenzene	Y = 47615921 X + 81585947	500 - 2000	0,9895
Chlorothalonil	Y = 63954737 X + 47311670	500 - 2000	0,9957
Chlorpyrifos+cyanazine	Y = 24718270X + 27879220	500 - 4000	0,9913
DCPA	Y = 37862871 X + 53496097	500 - 2000	0,9943
trans-chlordane	Y = 31651242 X + 48733595	500 - 2000	0,9910
cis-chlordane	Y = 27646632 X + 47110892	500 - 2000	0,9898
trans-nonachlor	Y = 282737345 X + 47110892	500 - 2000	0,9881
chlorobenzilate	Y = 25204767 X + 7091286	250 - 2000	0,9971
cis-permethrin	Y = 6740937 X + 1600190	250 - 2000	0,9959
trans-permethrin	Y = 13994004 X + 6230276	250 - 2000	0,9951

### 5.2.2.2. Μελέτη του είδους του διαλύτη εκχύλισης

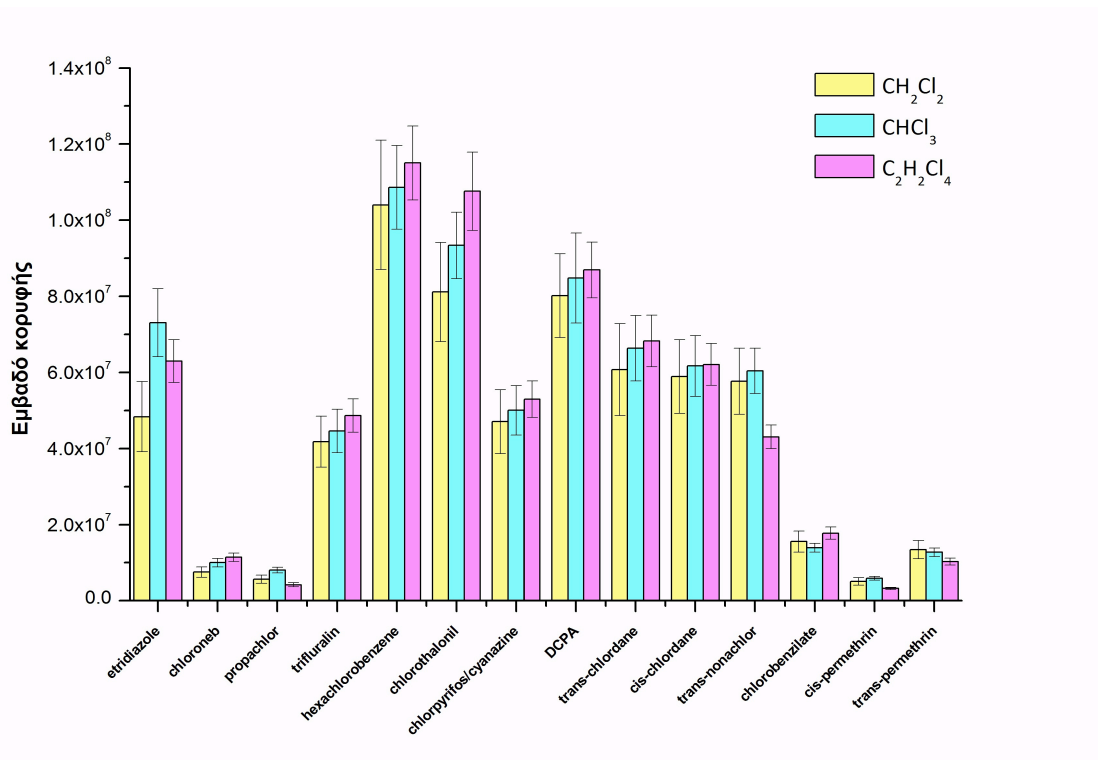
Το είδος του διαλύτη εκχύλισης παίζει πρωταρχικό ρόλο στην απόδοση της μικροεκχύλισης DLLME και θα πρέπει i) να έχει μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό (και συγκεκριμένα από το υδατικό διάλυμα μελιού), ii) μικρή διαλυτότητα στο νερό, iii) μεγάλη εκχυλιστική ικανότητα και iv) καλή χρωματογραφική συμπεριφορά. Οι διαλύτες εκχύλισης που μελετήθηκαν το διχλωρομεθάνιο ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $d_{25} = 1,32 \text{ g/mL}$ ), το χλωροφόρμιο ( $\text{CHCl}_3$ ,  $d_{25} = 1,47 \text{ g/mL}$ ), και το τετραχλωροαιθάνιο  $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$  ( $d_{25} = 1,54 \text{ g/mL}$ ).

Η μελέτη του είδους του διαλύτη εκχύλισης έγινε διατηρώντας σταθερό τον τελικό όγκο του διαλύτη που σχηματίζεται μετά το διαχωρισμό των φάσεων. Για τον σκοπό αυτό, έγινε μια σειρά πειραμάτων με διαφορετικούς προστιθέμενους όγκους των παραπάνω διαλυτών, ώστε τελικά να παραμένουν περίπου 40  $\mu\text{L}$  οργανικού διαλύτη μετά την εκχύλιση. Σημειώνεται ότι, η συγκεκριμένη μελέτη έγινε χωρίς την παρουσία φυτοφαρμάκων, ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε μια κόκκινη υδρόφοβη χρωστική ένωση (Sudan III) ως δείκτης της οργανικής φάσης ώστε ο υπολογισμός του τελικού όγκου να γίνεται με μεγαλύτερη ευκολία.

Οι προστιθέμενοι όγκοι των διαλυτών  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ ,  $\text{CHCl}_3$  και  $\text{C}_2\text{H}_2\text{Cl}_4$  ήταν 83  $\mu\text{L}$ , 52  $\mu\text{L}$  και 45  $\mu\text{L}$ , αντίστοιχα ενώ οι αρχικές συνθήκες του πειράματος ήταν:

- διαλύτης διασποράς - ακετονιτρίλιο όγκου 1000  $\mu\text{L}$ ,
- δείγμα: υδατικό διάλυμα μελιού ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ) επιμολυσμένο με  $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$  φυτοφαρμάκων,
- ταχύτητα φυγοκέντρησης: 2000 rpm για 5 min

Για κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις ( $n = 3$ ).

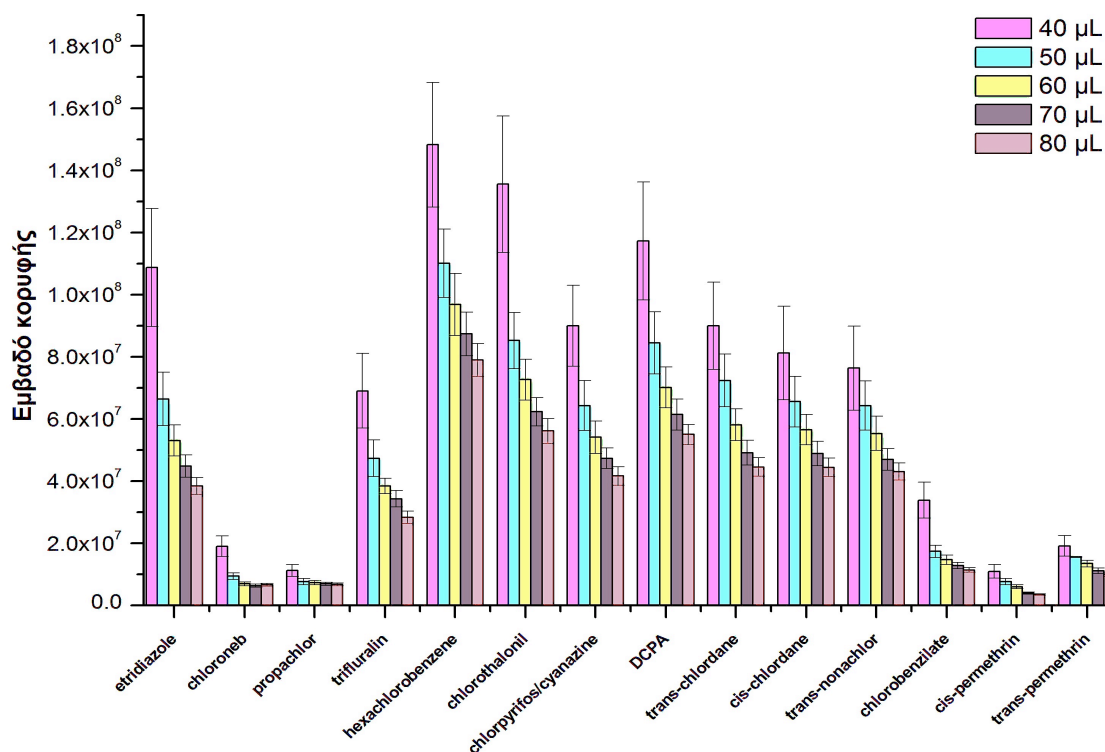


**Σχήμα 10.** Μελέτη του είδους του διαλύτη εκχύλισης στα εμβαδά κορυφής των φυτοφαρμάκων.

Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 10, τα πειραματικά αποτελέσματα έδειξαν ότι, το C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>Cl<sub>4</sub> είχε τη μεγαλύτερη εκχυλιστική ικανότητα, σε σχέση με τους άλλους διαλύτες, για την πλειοψηφία των φυτοφαρμάκων. Παρολαυτά όμως, επιλέχθηκε το χλωροφόρμιο ως διαλύτης εκχύλισης, διότι παρατηρήθηκε μικρότερος θόρυβος της βασικής γραμμής.

### 5.2.2.3. Μελέτη του όγκου διαλύτη εκχύλισης

Γενικά, η αύξηση του προστιθέμενου όγκου του διαλύτη εκχύλισης επηρεάζει διαφορετικά δυο «φαινόμενα», τα οποία δρουν ανταγωνιστικά σε ότι αφορά την απόδοση της εκχύλισης. Αφενός μεν, η αύξηση του όγκου προκαλεί θεωρητικά αύξηση της απόδοσης εκχύλισης, αφετέρου δε προκαλεί μείωση στην τελική συγκέντρωση των ενώσεων στην οργανική φάση, λόγω αύξηση του τελικού όγκου του διαλύτη που σχηματίζεται μετά το πέρας της εκχύλισης.



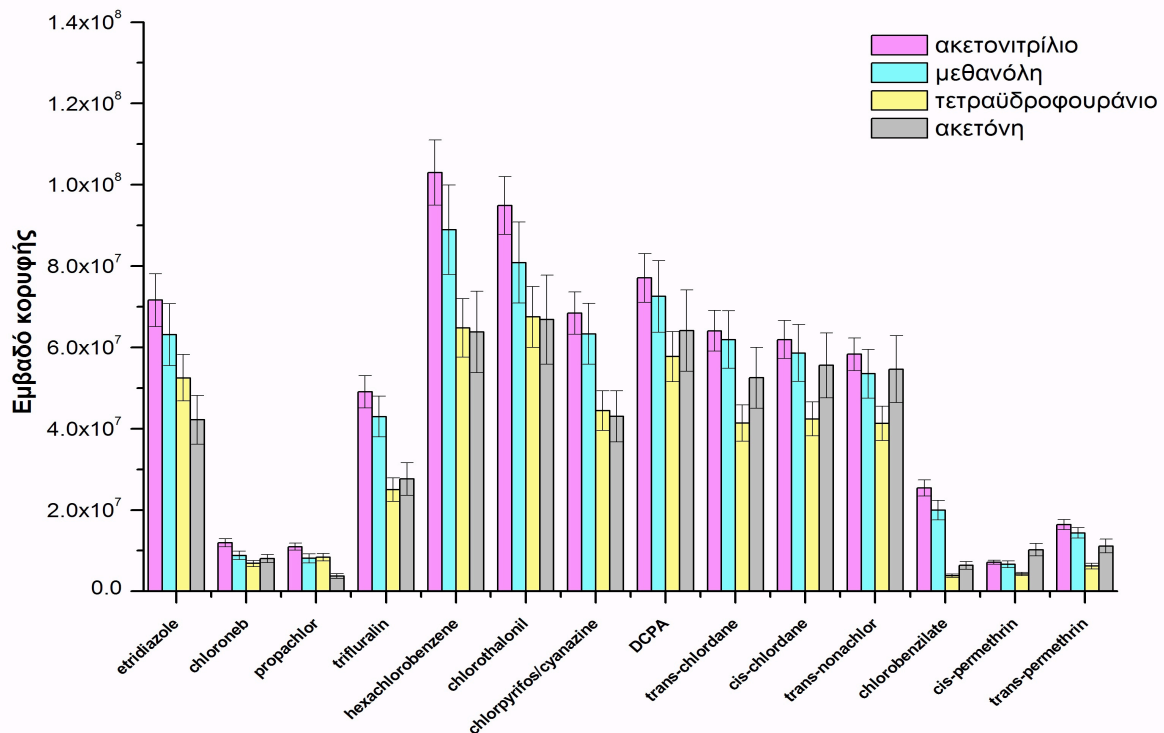
**Σχήμα 11.** Μελέτη του όγκου του χλωροφορμίου στα εμβαδά κορυφής των φυτοφαρμάκων.

Η επίδραση του όγκου του χλωροφορμίου στην απόδοση της μικροεκχύλιση (εμβαδά κορυφών) μελετήθηκε στο εύρος τιμών από 40 έως 80 µL, διατηρώντας τις υπόλοιπες συνθήκες του πειράματος σταθερές. Όπως εικονίζεται, στο Σχήμα 11, η αύξηση του προστιθέμενου όγκου του χλωροφορμίου, είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση των εμβαδών κορυφής των φυτοφαρμάκων. Παρόλο που με όγκο 40 µL παρατηρήθηκαν μεγαλύτερα εμβαδά κορυφής, εντούτοις όμως υπήρχε τεχνική δυσκολία στην παραλαβή της χλωροφορμικής στοιβάδας μετά την εκχύλιση. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε τελικά η τιμή των 50 µL, ως ένας συμβιβασμός μεταξύ της ευαισθησίας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου.

#### 5.2.2.4. Μελέτη του είδους του διαλύτη διασποράς

Επόμενη παράμετρος μελέτης ήταν η επίδραση του είδους του διαλύτη διασπορά στην απόδοση της εκχύλισης (εκφραζόμενη ως εμβαδό κορυφής). Κύριο χαρακτηριστικό του

διαλύτη διασποράς είναι ότι θα πρέπει να είναι διαλυτός και στις δυο μη-αναμιγνυόμενες φάσεις (υδατική & οργανική φάση). Οι διαλύτες που μελετήθηκαν ήταν το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη, το τετραϋδροφουράνιο και η ακετόνη. Τα πειράματα έδειξαν ότι μεγαλύτερα εμβαδά κορυφών καταγράφηκαν με διαλύτη ακετονιτρίλιο για την πλειοψηφία των φυτοφαρμάκων (Σχήμα 12.). Συνεπώς, το ακετονιτρίλιο επιλέχθηκε ως διαλύτης διασποράς και υιοθετήθηκε για τα επόμενα πειράματα.

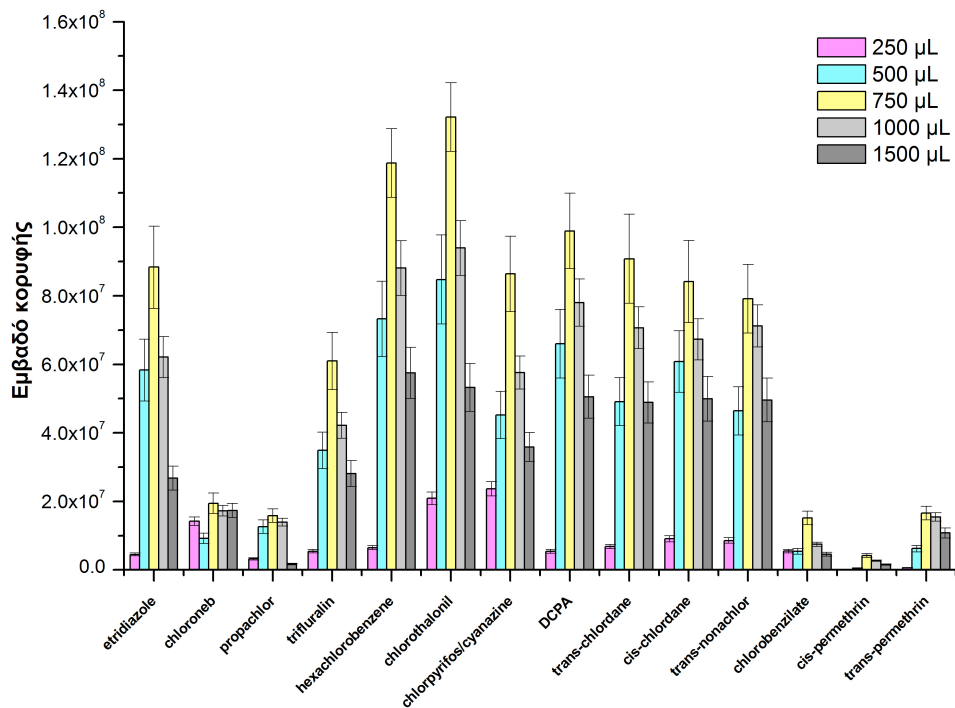


**Σχήμα 12.** Μελέτη του είδους του διαλύτη διασποράς στα εμβαδά κορυφής των φυτοφαρμάκων.

### 5.2.2.5. Μελέτη του όγκου του διαλύτη διασποράς

Ο όγκος του διαλύτη διασποράς επηρεάζει το μέγεθος των μικροσταγονιδίων και συνεπώς την αποτελεσματικότητα της μικροεκχύλισης DLLME. Ο όγκος του ακετονιτρίλιου μελετήθηκε στην περιοχή 250 έως 1500 μL. Ο όγκος των 250 μL δημιούργησε ένα πολύ «ασθενές» γαλάκτωμα, ενώ ικανοποιητική διασπορά (μακροσκοπικά) παρατηρήθηκε σε όγκο πάνω από 750 μL. Όπως φαίνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα του σχήματος

13., μεγαλύτερα σήματα λήφθηκαν στην τιμή 750  $\mu\text{L}$ , η οποία και επιλέχθηκε ως βέλτιστη τιμή όγκου του διαλύτη διασποράς.



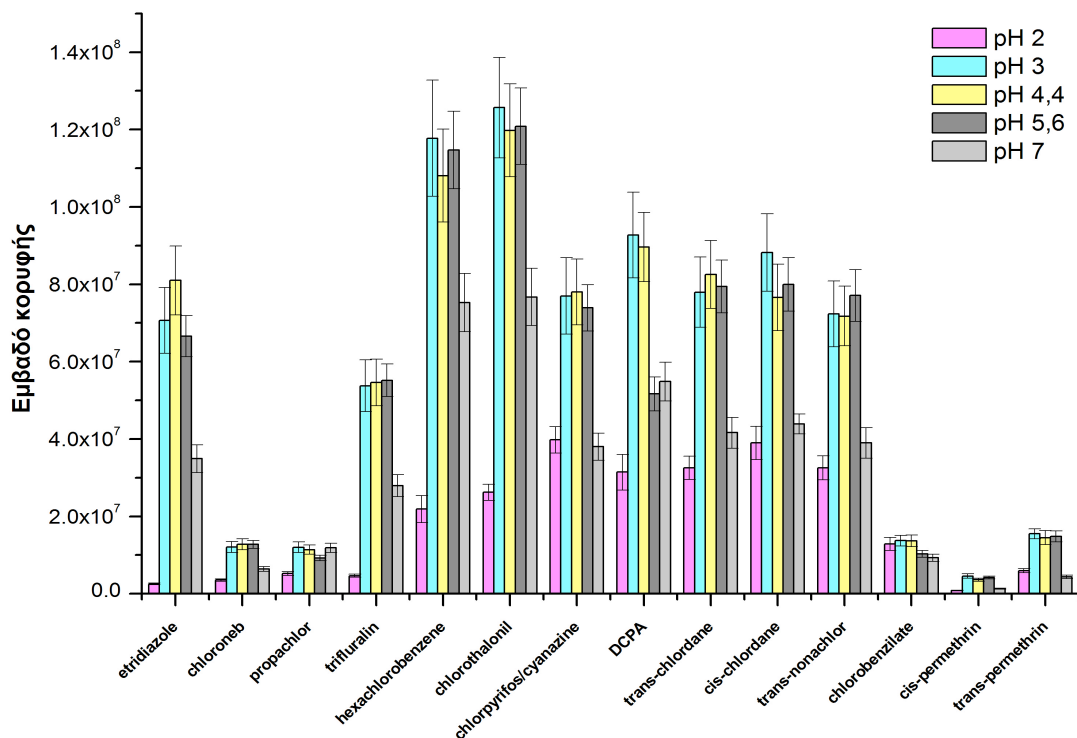
**Σχήμα 13.** Μελέτη του όγκου του διαλύτη διασποράς στα εμβαδά κορυφής των φυτοφαρμάκων.

### 5.2.2.6. Μελέτη του pH του δείγματος

Γενικά, η τιμή του pH ενός διαλύματος παίζει σπουδαίο ρόλο στην εκχυλιστικότητα μιας ένωσης όταν αυτή φέρει ιονίζουσες ομάδες. Έγινε μελέτη της επίδρασης του pH του δείγματος στην απόδοση της εκχύλισης στο εύρος τιμών από 2 έως 7. Δεδομένου ότι το pH του δείγματος μελιού (υδατικό διάλυμα συγκέντρωσης 50  $\text{g L}^{-1}$ ) ήταν 4.4, η τιμή του ρυθμίστηκε στις επιθυμητές τιμές προσθέτοντας μικρές ποσότητες διαλύματος HCl ή NaOH ( $1 \text{ mol L}^{-1}$ ), αντίστοιχα.

Τα πειράματα έδειξαν ότι, τα εμβαδά κορυφών των ενώσεων ήταν συγκρίσιμα μεταξύ τους για το εύρος τιμών από 3 έως 5,6. Ειδικά για pH δείγματος ίσο με 2, παρατηρήθηκε έντονος θόρυβος της βασικής γραμμής πιθανώς λόγω της εκχύλισης όξινων ενώσεων από το υπόστρωμα του μελιού στην στοιβάδα του χλωροφορμίου (π.χ. οργανικά

οξέα, κτλ). Από τιμές του Σχήματος 14. και για λόγους απλότητας, η τιμή του pH 4.4 επιλέχθηκε και υιοθετήθηκε για τα επόμενα πειράματα.

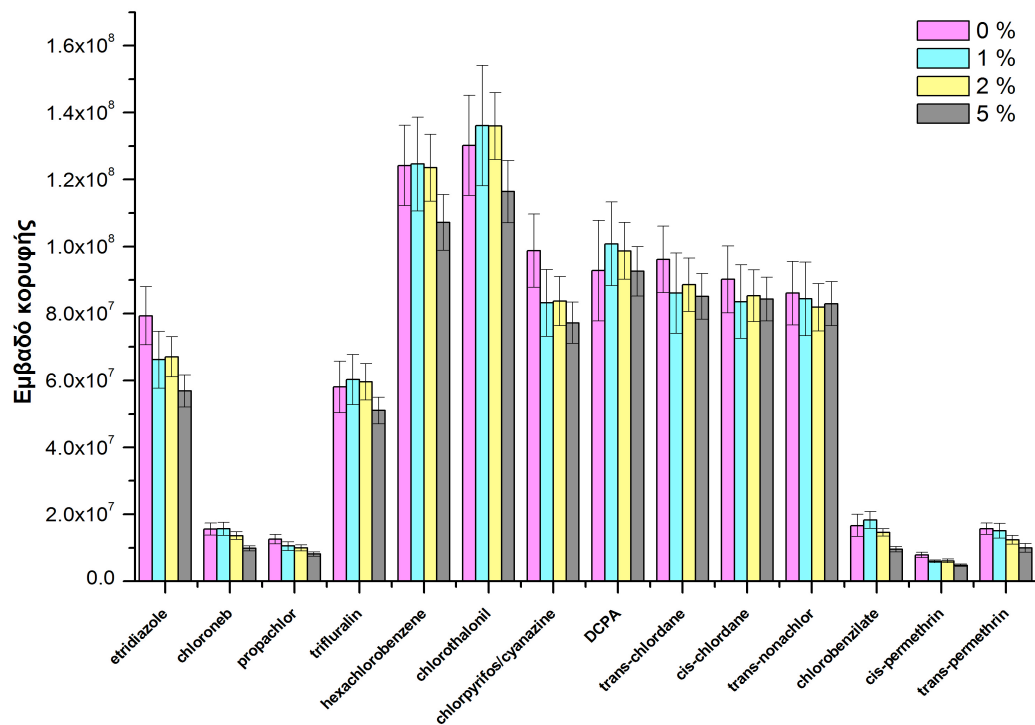


**Σχήμα 14.** Μελέτη του pH του δείγματος στα εμβαδά κορυφής των φυτοφαρμάκων.

### 5.2.2.7. Μελέτη της ιονικής ισχύς του δείγματος

Γενικά, η ιονική ισχύς του δείγματος αυξάνει την εκχυλιστικότητα μιας ένωσης λόγω του φαινομένου της επίδρασης άλατος (salting out effect). Στην παρούσα μελέτη, η επίδραση της ιονικής ισχύος στην απόδοση της DLLME μελετήθηκε στο εύρος τιμών 0 – 5 % w/v NaCl. Όπως προκύπτει και από τα πειραματικά αποτελέσματα του Σχήματος 15. δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μεταβολή των εμβαδών κορυφής των φυτοφαρμάκων με αύξηση της ιονικής ισχύος. Για λόγους απλότητας δεν επιλέχθηκε η ρύθμιση της ιονικής ισχύος για τα επόμενα πειράματα.

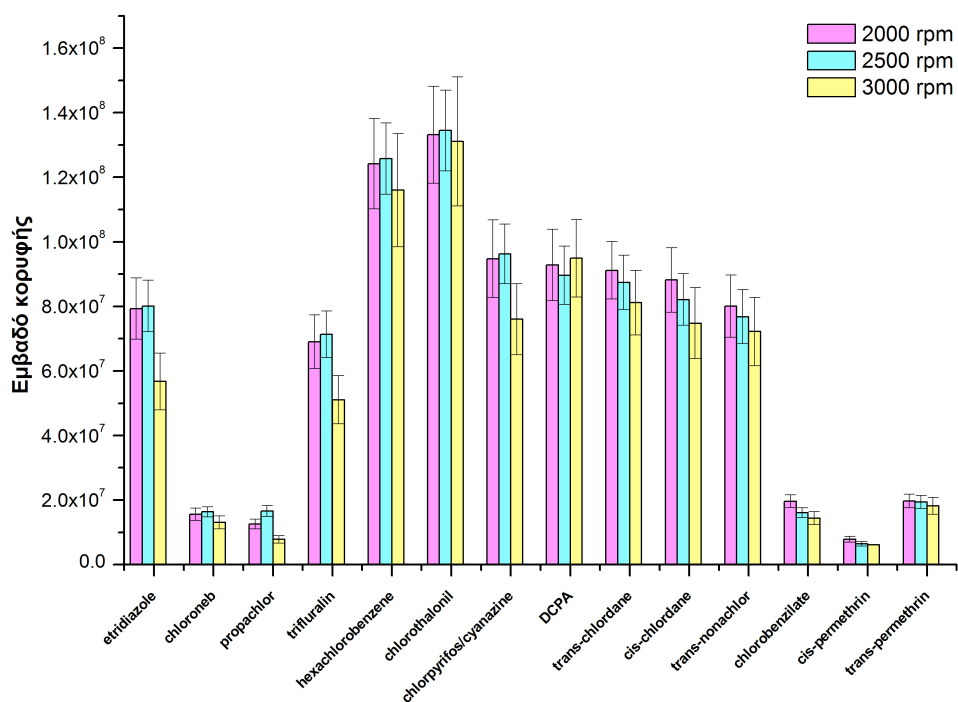




**Σχήμα 15.** Μελέτη της ιονικής ισχύος στα εμβασά κορυφής των φυτοφαρμάκων.

### 5.2.2.8. Μελέτη της ταχύτητας φυγοκέντρισης

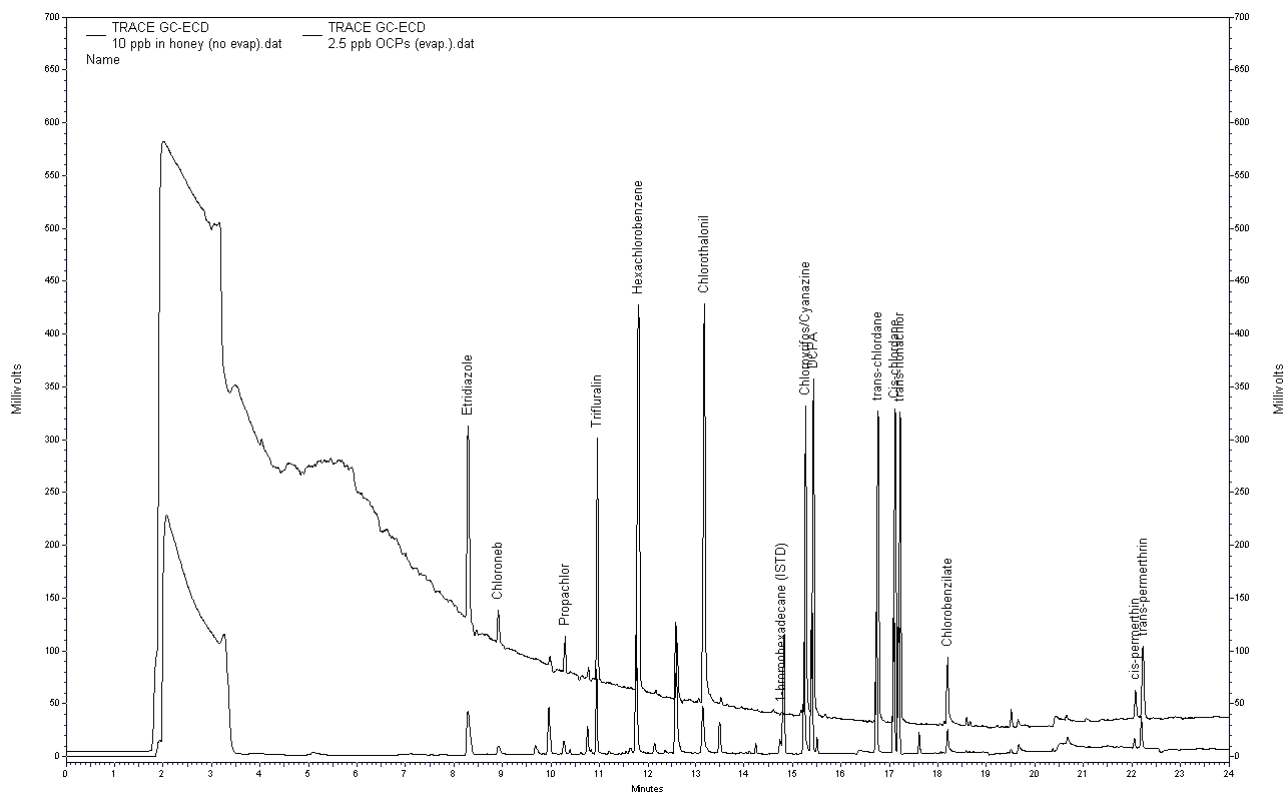
Τέλος, εξετάσθηκε η επίδραση της ταχύτητας φυγοκέντρισης στην αποτελεσματικότητα της καταβύθισης των μικροσταγονιδίων χλωροφορμίου και συνεπώς στην απόδοση της μικροεκχύλισης. Η συγκεκριμένη μελέτη έγινε για τρεις ταχύτητες φυγοκέντρισης 2000, 2500 και 3000 rpm για χρόνο 5 min. Τα εμβασά κορυφής των φυτοφαρμάκων ήταν συγκρίσιμα μεταξύ τους για όλες τις τιμές της ταχύτητας φυγοκέντρισης, ενώ παρατηρήθηκε αυξημένος θόρυβος στη βασική γραμμή για την τιμή των 3000 rpm. Τελικά η τιμή των 2500 rpm επιλέχθηκε για τα επόμενα πειράματα.



**Σχήμα 16.** Μελέτη της ταχύτητας φυγοκέντρωσης στα εμβασά κορυφής των φυτοφαρμάκων.

Όπως είναι γνωστό, ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων παρουσιάζει εξαιρετική ευαισθησία σε ενώσεις που έχουν άτομο αλογόνου στο μόριο τους. Το γεγονός αυτό, αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα της μεθόδου για τον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε πολύ χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης.

Όπως προαναφέρθηκε, μετά το πέρας της μικροεκχύλισης, τα φυτοφάρμακα βρίσκονταν στην στοιβάδα του χλωροφορμίου. Η απευθείας ανάλυση του δείγματος αυτού, δημιουργούσε προβλήματα στην βασική γραμμή του ανιχνευτή (κυρίως στα πρώτα λεπτά της ανάλυσης), λόγω της πολύ μεγάλης κορυφής του διαλύτη. Αυτό είχε σαν αποτέλεσμα τη μειωμένη ευαισθησία στον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων etridiazole, chloroneb, propachlor, trifluralin και hexachlorobenzene. Το πρόβλημα αυτό επιλύθηκε, με αλλαγή του διαλυτικού μέσου δηλαδή με εξάτμιση του χλωροφορμίου μέχρι ξηρού με ρεύμα N<sub>2</sub> και επαναδιάλυση του δείγματος σε ίσο όγκο ακετονιτριλίου. Στο Σχήμα 17 φαίνονται συγκριτικά δυο χρωματογραφήματα ανάλυσης επιμολυσμένου δείγματος μελιού με και χωρίς εξάτμιση του χλωροφορμίου.



**Σχήμα 17.** Ανάλυση ενός συνδυασμένου δείγματος μελιού το οποίο έχει επιμολυνθεί με μίγμα φυτοφαρμάκων και εσωτερικού προτύπου με και χωρίς εξάτμιση του χλωροφορμίου.

### **5.3. Επικύρωση της μεθόδου (validation)**

Η προτεινόμενη μέθοδος επικυρώθηκε για την εφαρμογή της στον προσδιορισμό των συγκεκριμένης οικογένειας φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Οι παράμετροι που επικυρώθηκαν ήταν:

1. Η γραμμικότητα και το εύρος προσδιορισμού
2. Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού
3. Η επαναληψιμότητα και η ακρίβεια
4. Η εκλεκτικότητα

Υπογραμμίζεται ότι, η επικύρωση της μεθόδου έγινε σε ένα συνδυασμένο (pooled) δείγμα μελιού ( $n = 5$ ), ώστε να συνυπολογιστούν τα πιθανά σφάλματα λόγω του υποστρώματος.

#### **5.3.1. Γραμμικότητα - εύρος προσδιορισμού**

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των μελετώμενων φυτοφαρμάκων στα δείγματα μελιού ήταν αναγκαία η κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης. Για τον σκοπό αυτό, μια σειρά δειγμάτων μελιού επιμολύνθηκαν (spiked) με πρότυπα διαλύματα μίγματος των φυτοφαρμάκων σε συγκεντρώσεις  $0.1 - 20 \mu\text{g L}^{-1}$  (ή  $2 - 400 \text{ ng g}^{-1}$  δείγματος), ενώ η τελική συγκέντρωση του εσωτερικού προτύπου ήταν σταθερή ίση με  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Για κάθε επιμολυσμένο δείγμα πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Η χάραξη των καμπυλών βαθμονόμησης έγινε με βάση το μέσο όρο του λόγου του εμβαδού της κορυφής του φυτοφαρμάκου, προς το εμβαδό της κορυφής του εσωτερικού προτύπου, συναρτήσει της συγκέντρωσης του κάθε φυτοφαρμάκου.

Στον Πίνακα 10 δίνονται οι καμπύλες βαθμονόμησης, το εύρος γραμμικής περιοχής καθώς και οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης.

**Πίνακας 10.** Αναλυτικά χαρακτηριστικά της προτεινόμενης μεθόδου.

Φυτοφάρμακο	Y = Ax + B	Εύρος (μg L <sup>-1</sup> )	r
Etridiazole	Y = 0.1828 X – 0.0113	0.1 - 20	0,9986
Chloroneb	Y = 0.1161 X – 0.0330	0.5 – 20	0,9938
Propachlor	Y = 0.0225 X – 0.0108	0.5 – 20	0,9988
Trifluralin	Y = 0.1374 X + 0.0061	0.1 – 10	0,9971
Hexachlorobenzene	Y = 0.3344 X + 0.1832	0.1 – 10	0,9965
Chlorothalonil	Y = 0.4404 X - 0.1012	0.1 – 10	0,9972
Cyanazine + chlorpyrifos	Y = 0.0989 X + 0.0321	0.2 – 20	0,9974
DCPA	Y = 0.2396 x + 0.0676	0.1 – 10	0,9932
trans-chlordane	Y = 0.2257 X + 0.1088	0.1 – 10	0,9961
cis-chlordane	Y = 0.2227 X + 0.1087	0.1 – 10	0,9963
trans-nonachlor	Y = 0.2410 X + 0.1188	0.1 – 10	0,9966
chlorobenzilate	Y = 0.1302 X + 0.0398	0.5 – 10	0,9988
cis-permethrin	Y = 0.0107 X + 0.0042	0.5 – 20	0,9980
trans-permethrin	Y = 0.0326 X + 0.0141	0.1 – 20	0,9988

### 5.3.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού (LOD & LOQ)

Ως όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και όριο ποσοτικής αποτίμησης (limit of quantitation, LOQ) της προτεινόμενης μεθόδου ορίστηκε η συγκέντρωση μάζας της κάθε προσδιοριζόμενης ένωσης, της οποίας το σήμα (S) ήταν 3 και 10 φορές μεγαλύτερο, αντίστοιχα, από το θόρυβο του ανιχνευτή (N). Το επίπεδο του θορύβου υπολογίστηκε από το λογισμικό αποτίμησης των αποτελεσμάτων ChromQuest®.

Στον Πίνακα 11 δίνονται τα όρια ανίχνευσης και τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού των ενώσεων στο συνδυασμένο δείγμα μελιού, καθώς επίσης και ο παράγοντας προσυγκέντρωσης (enrichment factor, EF). Ο παράγοντας EF υπολογίστηκε από την εξίσωση

$$EF = \frac{C_{aq}}{C_{org}} .$$

Όπως προκύπτει και από τις τιμές του πίνακα, τα όρια ανίχνευσης των

φυτοφαρμάκων που επετεύχθησαν ήταν αρκετά χαμηλότερα από τα μέγιστα επιτρεπτά

όρια που ορίζει η Ευρωπαϊκή νομοθεσία (MRL, maximum residues levels), όπως π.χ. για το φυτοφάρμακο chlordane ορίζει σαν όριο τα 10 ng g<sup>-1</sup>.

([http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm) 2005)

*Πίνακας 11. Όρια ανίχνευσης, ποσοτικού προσδιορισμού και παράγοντας προσυγκέντρωσης των προσδιοριζόμενων συστατικών.*

Φυτοφάρμακο	LOD (μg L <sup>-1</sup> )/(ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (μg L <sup>-1</sup> )/(ng g <sup>-1</sup> )	Παράγοντας προσυγκέντρωσης <sup>a</sup> (EF)
Etridiazole	0.03 / 0,6	0.10 / 2.0	100
Chloroneb	0.10 / 2,0	0.33 / 6.6	65
Propachlor	0.08 / 1,6	0.26 / 5.2	47
Trifluralin	0.03 / 0,6	0,10 / 2,0	113
Hexachlorobenzene	0.02 / 0,4	0,07 / 1.4	112
Chlorothalonil	0.03 / 0,6	0,10 / 2.0	90
Cyanazine+chlorpyrifos	0.06 / 1,2	0,20 / 4.0	85
DCPA	0.02 / 0,4	0,07 / 1.4	80
trans-chlordane	0.02 / 0,4	0,07 / 1.4	115
cis-chlordane	0.02 / 0,4	0,07 / 1.4	120
trans-nonachlor	0.02 / 0,4	0,07 / 1.4	106
chlorobenzilate	0.10 / 2,0	0,33 / 6.6	69
cis-permethrin	0.15 / 3,0	0.50 / 10.0	72
trans-permethrin	0.03 / 0,6	0,10 / 2.0	52

<sup>a</sup> Υπολογίστηκε σε επιμολυσμένο δείγμα μελιού συγκέντρωσης 10 μg L<sup>-1</sup>

### 5.3.3. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου στην ίδια ημέρα και κατά την διάρκεια διαδοχικών ημερών

Ο έλεγχος της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας της μεθόδου κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας (intra-day repeatability) αλλά και κατά τη διάρκεια πέντε διαδοχικών ημερών ( $n = 5$ ) (inter-day precision) πραγματοποιήθηκε με ανάλυση επιμολυσμένων δειγμάτων μελιού, με εσωτερικό πρότυπο σε συγκέντρωση  $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ . Για την επικύρωση της μεθόδου κατά τη διάρκεια της ίδιας ημέρας και διαδοχικών ημερών, έγιναν πέντε ( $n = 5$ ) και τρεις ( $n = 3$ ), αντίστοιχα, διαδοχικές εγχύσεις για κάθε ένα από τα δείγματα σε επίπεδα συγκεντρώσεων φυτοφαρμάκων  $0,5, 1,0$  και  $2,5 \mu\text{g L}^{-1}$ .

Η αποτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση την καμπύλη βαθμονόμησης της κάθε ένωσης (Πίνακας 12). Η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκφράζεται με την τιμή της σχετικής τυπικής απόκλισης (relative standard deviation,  $s_r$ ), ενώ η ακρίβεια με την ανάκτηση (recovery,  $R$ ). Στον πίνακα 12 περιγράφονται αναλυτικά τα αποτελέσματα κατόπιν στατιστικής επεξεργασίας με τη βοήθεια των παρακάτω εξισώσεων. Συμπερασματικά, η μέθοδος παρουσιάζει ικανοποιητική ακρίβεια και επαναληψιμότητα, κατά τη διάρκεια μιας ημέρας αλλά και σε διαδοχικές ημέρες, ενώ οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις κυμαίνονται από  $0,01\%$  έως  $0,27\%$  και οι ανακτήσεις από  $91\%$  έως  $111\%$ , αντίστοιχα.

Η τυπική απόκλιση, η σχετική τυπική απόκλιση και η ανάκτηση υπολογίστηκαν από τις παρακάτω μαθηματικές σχέσεις.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n-1}}, \quad RSD\% = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100, \quad R\% = \frac{\text{μετρηθείσα } C}{\text{επίπεδο επιμόλυνσης}} \cdot 100\%$$

όπου:  $x$  είναι η ευρεθείσα συγκέντρωση μιας μέτρησης,  $\bar{x}$  η μέση ευρεθείσα συγκέντρωση των 5 διαδοχικών μετρήσεων,  $n$  το πλήθος των μετρήσεων.

**Πίνακας 12.** Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου κατά τη διάρκεια της ίδια ημέρας σε συνδυασμένο δείγμα μελιού.

<b>Φυτοφάρμακο</b>	<b>Προστέθηκαν (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>Μετρήθηκαν <math>\pm</math> SD (<math>\mu\text{g L}^{-1}</math>)</b>	<b>RSD (%)</b>	<b>Ανάκτηση (R, %)</b>
Etridiazole	0,50	0,53 $\pm$ 0,03	5,7	106
	1,00	1,07 $\pm$ 0,11	10,2	107
Chloroneb	1,00	1,07 $\pm$ 0,13	12,1	107
	2,50	2,59 $\pm$ 0,16	6,2	104
Propachlor	1,00	0,95 $\pm$ 0,09	9,4	95
	2,50	2,52 $\pm$ 0,23	9,1	101
Trifluralin	0,50	0,53 $\pm$ 0,06	11,3	105
	1,00	0,92 $\pm$ 0,15	16,3	92
Hexachlorobenzene	0,50	0,49 $\pm$ 0,05	10,2	99
	1,00	1,06 $\pm$ 0,16	15,1	106
Chlorothalonil	0,50	0,56 $\pm$ 0,01	1,8	112
	1,00	1,07 $\pm$ 0,14	13,1	107
Cyanazine + chlorpyrifos	0,50 + 0,50	1,06 $\pm$ 0,08	7,5	106
	1,00 + 1,00	2,22 $\pm$ 0,27	12,1	111
DCPA	0,50	0,49 $\pm$ 0,03	6,1	98
	1,00	1,03 $\pm$ 0,13	12,6	103
trans-chlordane	0,50	0,55 $\pm$ 0,05	9,0	110
	1,00	1,05 $\pm$ 0,10	9,5	105



cis-chlordane	0,50	$0,52 \pm 0,06$	11,5	105
	1,00	$1,04 \pm 0,14$	13,4	104
trans-nonachlor	0,50	$0,49 \pm 0,08$	16,3	98
	1,00	$0,99 \pm 0,11$	11,1	99
chlorobenzilate	1,00	$1,09 \pm 0,12$	11,0	109
	2,50	$2,60 \pm 0,19$	7,3	104
cis-permethrin	1,00	$0,89 \pm 0,11$	12,3	89
	2,50	$2,35 \pm 0,20$	8,5	94
trans-permethrin	0,50	$0,51 \pm 0,08$	15,6	102
	1,00	$1,09 \pm 0,18$	16,5	110

---

**Πίνακας 13.** Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου κατά τη διάρκεια πέντε διαδοχικών ημερών (n = 5) σε συνδυασμένο δείγμα μελιού.

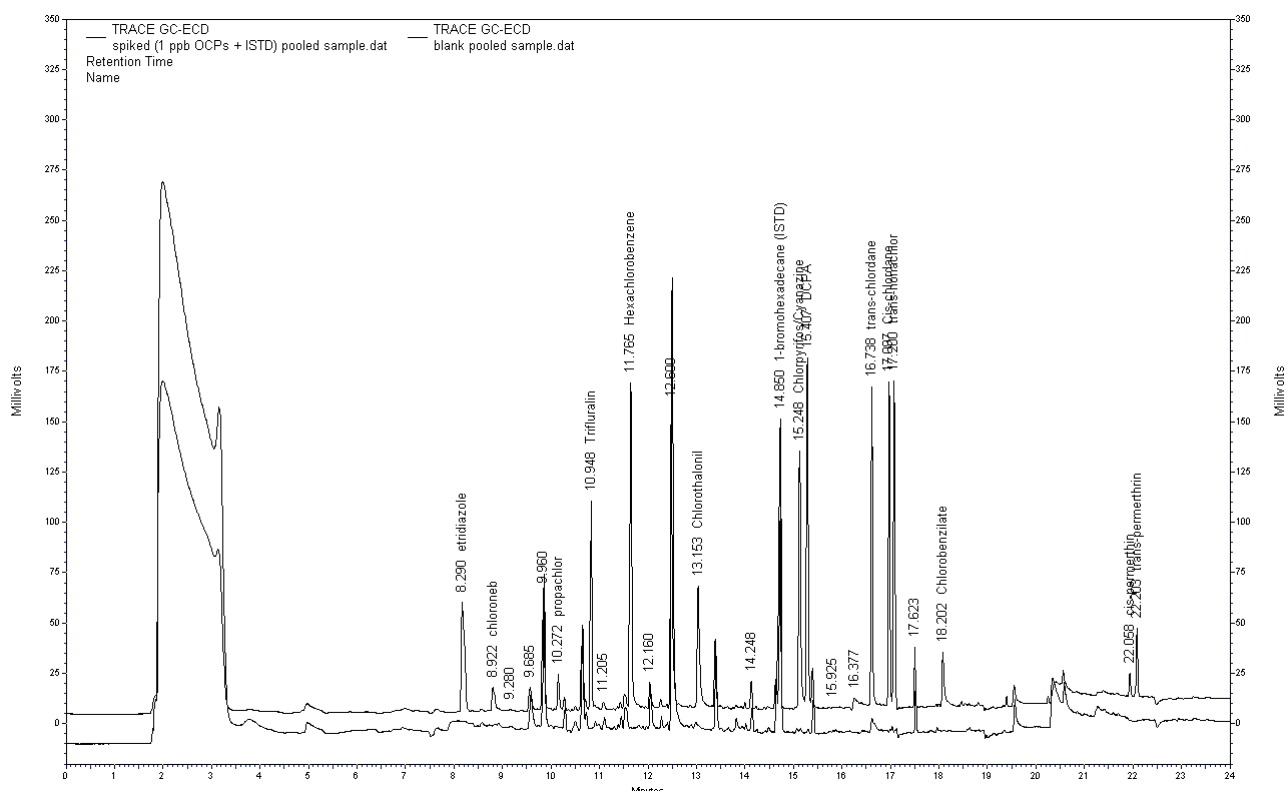
Φυτοφάρμακο	Προστέθηκαν ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Μετρήθηκαν $\pm$ SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD(%)	Ανάκτηση (R, %)
Etridiazole	0,50	0,49 $\pm$ 0,09	18,3	99
	1,00	1,06 $\pm$ 0,16	15,1	106
Chloroneb	1,00	0,98 $\pm$ 0,07	7,1	98
	2,50	2,53 $\pm$ 0,13	5,1	101
Propachlor	1,00	0,97 $\pm$ 0,03	3,1	97
	2,50	2,61 $\pm$ 0,10	3,8	104
Trifluralin	0,50	0,44 $\pm$ 0,02	4,5	87
	1,00	1,04 $\pm$ 0,11	10,5	104
Hexachlorobenzene	0,50	0,54 $\pm$ 0,03	5,5	107
	1,00	1,12 $\pm$ 0,06	5,3	112
Chlorothalonil	0,50	0,57 $\pm$ 0,04	7,0	113
	1,00	0,91 $\pm$ 0,13	14,2	91
Cyanazine+chlorpyrifos	0,50 + 0,50	1,06 $\pm$ 0,06	5,6	106
	1,00 + 1,00	1,82 $\pm$ 0,13	7,1	91
DCPA	0,50	0,54 $\pm$ 0,04	7,4	108
	1,00	1,08 $\pm$ 0,06	5,5	108
trans-chlordane	0,50	0,48 $\pm$ 0,06	12,5	96
	1,00	0,99 $\pm$ 0,13	13,1	99

cis-chlordane	0,50	0,56 ± 0,02	3,5	115
	1,00	1,05 ± 0,14	13,3	105
trans-nonachlor	0,50	0,54 ± 0,03	5,5	108
	1,00	1,08 ± 0,10	9,2	108
chlorobenzilate	1,00	1,12 ± 0,13	11,6	112
	2,50	2,41 ± 0,16	6,6	96
cis-permethrin	1,00	1,11 ± 0,07	6,3	111
	2,50	2,36 ± 0,10	4,2	94
trans-permethrin	0,50	0,51 ± 0,02	3,9	102
	1,00	0,91 ± 0,10	11,0	91

#### **5.3.4. Εκλεκτικότητα**

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου, σε ότι αφορά την ύπαρξη παρεμποδίσεων από ενδογενή συστατικά του μελιού, ελέγχθηκε με την ανάλυση ενός συνδυασμένου δείγματος, το οποίο προέκυψε από την ανάμιξη 5 διαφορετικών δειγμάτων μελιού διαφόρων ποικιλιών (π.χ. ανθόμελο, πευκόμελο, θυμάρι, κτλ). Όλα τα δείγματα μελιού προμηθεύτηκαν από την τοπική αγορά. Κατά την ανάλυση του συνδυασμένου δείγματος, δεν παρατηρήθηκαν κορυφές που να οφείλονται σε παρεμποδίζουσες ουσίες λόγω του υποστρώματος, στους χρόνους συγκράτησης των φυτοφαρμάκων αλλά και του εσωτερικού προτύπου.

Ένα αντιπροσωπευτικό χρωματογράφημα ανάλυσης ενός λευκού συνδυασμένου δείγματος μελιού και ενός επιμολυσμένου σε συγκέντρωση 1 μg L<sup>-1</sup> φυτοφαρμάκων εικονίζεται στο Σχήμα 18.



**Σχήμα 18.** Ανάλυση ενός λευκού συνδυασμένου δείγματος μελιού και ενός επιμολυσμένου με μίγμα 15 οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε συγκέντρωση  $1 \mu\text{g L}^{-1}$ .

## 5.4. Εφαρμογές της μεθόδου

### 5.4.1. Προκατεργασία δειγμάτων

Η προκατεργασία των δειγμάτων περιλάμβανε στην παρασκευή ενός υδατικού διαλύματος μελιού συγκέντρωσης  $50 \text{ g L}^{-1}$ . Συγκεκριμένα, 5 g δείγματος αραιώθηκαν σε μια ογκομετρική φιάλη των 100 mL και το μίγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερύχων για 5 λεπτά. Κατόπιν, 5 mL από το προκύπτον διάλυμα τοποθετούνταν σε γυάλινους κωνικούς δοκιμαστικούς σωλήνες πριν την εφαρμογή της μικροεκχύλισης.

### 5.4.2. Τελικό πρωτόκολλο ανάλυσης

Το τελικό πρωτόκολλο της τεχνικής μικροεκχύλισης DLLME περιλάμβανε τα εξής στάδια:

- 1) Σε 5 mL υδατικού διαλύματος μελιού ( $50 \text{ g L}^{-1}$ ), εισάγονται με βίαιο τρόπο μίγμα 50  $\mu\text{L}$  χλωροφορμίου και 750  $\mu\text{L}$  ακετονιτριλίου με τη βοήθεια μιας μικροσύριγγας.
- 2) Ανάδευση του μίγματος με το χέρι για 1 λεπτό περίπου
- 3) Φυγοκέντριση στις 2500 rpm για 5 λεπτά.
- 4) Παραλαβή 20  $\mu\text{L}$  από τη χλωροφορμική στοιβάδα
- 5) Εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα  $\text{N}_2$
- 6) Επαναδιάλυση σε 20  $\mu\text{L}$  ακετονιτριλίου και
- 7) Τοποθέτηση σε ειδικά φιαλίδια μικρού εσωτερικού όγκου (50  $\mu\text{L}$ ) για αυτόματο δειγματολήπτη και ανάλυση με χρωματογραφία αερίου

#### **5.4.2. Ανάλυση δειγμάτων**

Η προτεινόμενη μέθοδος εφαρμόστηκε στον προσδιορισμό των συγκεκριμένων οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Τα δείγματα αυτά προκατεργάστηκαν και εκχυλίστηκαν σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που αναφέρονται παραπάνω, ενώ σε όλες τις περιπτώσεις, πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις για κάθε δείγμα. Τα αποτελέσματα φαίνονται συγκεντρωτικά στους Πίνακες 14 - 18.

**Πίνακας 14.** Προσδιορισμός οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγμα μελιού Νο 1 (από κωνοφόρα & άνθη).

Φυτοφάρμακο	Προστέθηκαν ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Μετρήθηκαν $\pm$ SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD(%)	Ανάκτηση (R, %)
Etridiazole	$\Delta\text{A}^{\text{a}}$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,01$	9,1	110
	0,50	$0,51 \pm 0,05$	9,8	102
	1,00	$0,81 \pm 0,08$	9,9	81
	2,50	$2,49 \pm 0,36$	14,5	100
Chloroneb	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	$0,46 \pm 0,03$	6,5	92
	1,00	$0,80 \pm 0,09$	11,2	80
	2,50	$2,33 \pm 0,35$	15,0	93
Propachlor	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	$0,59 \pm 0,03$	5,1	118
	1,00	$0,88 \pm 0,13$	14,8	88
	2,50	$2,54 \pm 0,18$	7,1	102
Trifluralin	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,02$	18,2	110
	0,50	$0,48 \pm 0,02$	4,2	96
	1,00	$0,98 \pm 0,14$	10,2	98
	2,50	$2,58 \pm 0,18$	7,0	103
Hexachlorobenzene	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	$0,10 \pm 0,01$	10,0	100
	0,50	$0,48 \pm 0,07$	14,5	96
	1,00	$1,04 \pm 0,16$	15,3	103
	2,50	$2,37 \pm 0,02$	0,8	94

Chlorothalonil	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,10 \pm 0,01$	10,0	100
	0,50	$0,57 \pm 0,09$	15,7	113
	1,00	$1,04 \pm 0,20$	19,2	104
	2,50	$2,48 \pm 0,23$	9,2	99
Cyanazine+chlorpyrifos	$\Delta A$	-	-	-
	0,10 + 0,10	$0,20 \pm 0,04$	20,0	100
	0,50 + 0,50	$1,16 \pm 0,14$	12,0	116
	1,00 + 1,00	$2,08 \pm 0,36$	17,3	104
	2,50 + 2,50	$4,84 \pm 0,22$	4,5	97
DCPA	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,01$	9,1	105
	0,50	$0,55 \pm 0,09$	16,3	110
	1,00	$0,94 \pm 0,12$	12,7	94
	2,50	$2,65 \pm 0,18$	6,7	106
trans-chlordane	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,08 \pm 0,01$	12,5	75
	0,50	$0,57 \pm 0,02$	3,5	114
	1,00	$0,98 \pm 0,17$	17,3	98
	2,50	$2,30 \pm 0,18$	7,8	92
cis-chlordane	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,02$	20,0	105
	0,50	$0,47 \pm 0,05$	10,6	93
	1,00	$1,13 \pm 0,16$	14,1	113
	2,50	$2,63 \pm 0,27$	10,2	105

trans-nonachlor	-	-	-	-
	0,10	0,11 ± 0,02	18,1	95
	0,50	0,57 ± 0,05	8,7	113
	1,00	1,18 ± 0,09	7,6	118
	2,50	2,39 ± 0,20	8,3	96
chlorobenzilate	-	-	-	-
	0,50	0,49 ± 0,09	18,3	99
	1,00	1,09 ± 0,21	19,2	110
	2,50	2,40 ± 0,10	4,2	96
cis-permethrin	-	-	-	-
	0,50	0,55 ± 0,06	10,9	109
	1,00	1,05 ± 0,18	17,1	105
	2,50	2,46 ± 0,17	6,9	98
trans-permethrin	ΔA	-	-	-
	0,10	0,10 ± 0,01	10,0	100
	0,50	0,57 ± 0,03	5,2	114
	1,00	1,09 ± 0,21	19,2	110
	2,50	2,65 ± 0,11	4,2	106

---

<sup>α</sup> ΔA: Δεν ανιχνεύθηκε



**Πίνακας 15.** Προσδιορισμός οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγμα μελιού Νο 2 (από κωνοφόρα & άνθη).

Φυτοφάρμακο	Προστέθηκαν ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Μετρήθηκαν $\pm$ SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD(%)	Ανάκτηση (R, %)
Etridiazole	$\Delta\text{A}^\alpha$	-	-	-
	0,10	0,11 $\pm$ 0,01	9,0	113
	0,50	0,50 $\pm$ 0,08	16,0	100
	1,00	1,07 $\pm$ 0,15	14,0	107
	2,50	2,51 $\pm$ 0,16	6,3	100
Chloroneb	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	0,57 $\pm$ 0,03	5,2	114
	1,00	0,90 $\pm$ 0,17	18,8	90
	2,50	2,49 $\pm$ 0,12	4,8	100
Propachlor	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	0,58 $\pm$ 0,04	6,8	117
	1,00	1,08 $\pm$ 0,20	18,5	108
	2,50	2,54 $\pm$ 0,11	4,3	101
Trifluralin	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	0,11 $\pm$ 0,01	9,1	115
	0,50	0,50 $\pm$ 0,08	16,0	100
	1,00	1,13 $\pm$ 0,17	15,0	113
	2,50	2,38 $\pm$ 0,10	4,2	95
Hexachlorobenzene	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	0,09 $\pm$ 0,01	11,1	95
	0,50	0,48 $\pm$ 0,07	14,5	96
	1,00	0,96 $\pm$ 0,13	13,5	96
	2,50	2,40 $\pm$ 0,02	0,8	96

Chlorothalonil	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,01$	9,0	115
	0,50	$0,53 \pm 0,06$	11,3	105
	1,00	$0,91 \pm 0,11$	12,0	91
	2,50	$2,48 \pm 0,15$	6,0	99
Cyanazine+chlorpyrifos	$\Delta A$	-	-	-
	0,10 + 0,10	$0,22 \pm 0,02$	9,0	105
	0,50 + 0,50	$0,92 \pm 0,08$	8,6	89
	1,00 + 1,00	$2,32 \pm 0,32$	13,7	116
	2,50 + 2,50	$5,04 \pm 0,38$	7,5	101
DCPA	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,09 \pm 0,01$	11,1	90
	0,50	$0,53 \pm 0,08$	15,1	105
	1,00	$1,10 \pm 0,17$	15,4	110
	2,50	$2,67 \pm 0,18$	6,7	107
trans-chlordane	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,08 \pm 0,01$	12,5	75
	0,50	$0,49 \pm 0,01$	2,0	97
	1,00	$1,04 \pm 0,14$	13,4	104
	2,50	$2,31 \pm 0,10$	4,3	92
cis-chlordane	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,02$	18,2	115
	0,50	$0,49 \pm 0,01$	2,0	97
	1,00	$1,09 \pm 0,10$	9,1	109
	2,50	$2,57 \pm 0,14$	5,4	103

trans-nonachlor	ΔA	-	-	-
	0,10	0,10 ± 0,01	10	100
	0,50	0,57 ± 0,02	3,5	113
	1,00	0,97 ± 0,18	18,5	97
	2,50	2,33 ± 0,17	7,2	93
chlorobenzilate	ΔA	-	-	-
	0,50	0,54 ± 0,02	3,7	107
	1,00	1,17 ± 0,10	8,5	117
	2,50	2,60 ± 0,03	1,15	104
cis-permethrin	ΔA	-	-	-
	0,50	0,51 ± 0,01	1,9	101
	1,00	1,17 ± 0,05	4,2	117
	2,50	2,49 ± 0,16	6,4	99
trans-permethrin	ΔA	-	-	-
	0,10	0,09 ± 0,01	11,1	95
	0,50	0,44 ± 0,03	6,8	88
	1,00	1,16 ± 0,06	5,2	116
	2,50	2,53 ± 0,18	7,1	101

---

<sup>α</sup> ΔA: Δεν ανιχνεύθηκε

**Πίνακας 16.** Προσδιορισμός οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγμα μελιού Νο 3 (από άνθη, κωνοφόρα & θυμάρι).

Φυτοφάρμακο	Προστέθηκαν ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Μετρήθηκαν $\pm$ SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD(%)	Ανάκτηση (R, %)
Etridiazole	$\Delta\text{A}^\alpha$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,02$	18,2	115
	0,50	$0,51 \pm 0,08$	15,6	102
	1,00	$0,93 \pm 0,06$	6,4	93
	2,50	$2,57 \pm 0,18$	7,0	102
Chloroneb	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	$0,51 \pm 0,07$	13,7	102
	1,00	$0,86 \pm 0,14$	16,2	86
	2,50	$2,63 \pm 0,18$	6,8	105
Propachlor	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,5	$0,57 \pm 0,07$	12,2	114
	1	$1,08 \pm 0,10$	9,2	108
	2,5	$2,62 \pm 0,15$	5,7	105
Trifluralin	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,01$	9,1	114
	0,50	$0,52 \pm 0,01$	1,9	104
	1,00	$1,13 \pm 0,01$	4,95	113
	2,50	$2,43 \pm 0,10$	0,9	97
Hexachlorobenzene	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,02$	18,1	115
	0,50	$0,50 \pm 0,06$	12,0	100
	1,00	$1,02 \pm 0,18$	16,7	102

	2,50	2,50 ± 0,18	7,2	100
Chlorothalonil	ΔA	-	-	-
	0,10	0,09 ± 0,01	11,1	115
	0,50	0,52 ± 0,05	9,6	103
	1,00	1,10 ± 0,14	12,7	110
	2,50	2,50 ± 0,13	5,2	100
Cyanazine+chlorpyrifos	ΔA	-	-	-
	0,10 + 0,10	0,18 ± 0,02	11,1	85
	0,50 + 0,50	0,94 ± 0,08	8,5	94
	1,00 + 1,00	2,20 ± 0,16	7,2	110
	2,50 + 2,50	5,10 ± 0,20	3,9	102
DCPA	ΔA	-	-	-
	0,10	0,10 ± 0,01	10,0	105
	0,50	0,47 ± 0,04	8,5	94
	1,00	1,08 ± 0,13	12,0	108
	2,50	2,61 ± 0,21	8,0	104
trans-chlordane	ΔA	-	-	-
	0,10	0,10 ± 0,01	10	100
	0,50	0,57 ± 0,02	3,5	113
	1,00	1,07 ± 0,10	9,3	107
	2,50	2,66 ± 0,01	0,3	106
cis-chlordane	ΔA	-	-	-
	0,10	0,09 ± 0,01	11,1	95
	0,50	0,54 ± 0,02	3,7	107
	1,00	1,05 ± 0,14	13,3	105
	2,50	2,49 ± 0,09	3,6	100

trans-nonachlor	ΔA	-	-	-
	0,10	0,09 ± 0,01	11,1	95
	0,50	0,56 ± 0,01	1,7	111
	1,00	0,88 ± 0,10	11,3	88
	2,50	2,44 ± 0,10	4,0	98
chlorobenzilate	-	-	-	-
	0,50	0,47 ± 0,04	8,5	94
	1,00	1,00 ± 0,08	8,0	100
	2,50	2,51 ± 0,22	8,8	100
cis-permethrin	-	-	-	-
	0,50	0,53 ± 0,05	9,4	105
	1,00	0,93 ± 0,11	11,8	93
	2,50	2,65 ± 0,15	5,6	106
trans-permethrin	ΔA	-	-	-
	0,10	0,10 ± 0,01	10	100
	0,50	0,51 ± 0,06	11,7	101
	1,00	1,11 ± 0,08	7,2	111
	2,00	2,53 ± 0,16	6,3	101

---

<sup>α</sup> ΔA: Δεν ανιχνεύθηκε

**Πίνακας 17.** Προσδιορισμός οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγμα μελιού Νο 4 (από άνθη & θυμάρι).

Φυτοφάρμακο	Προστέθηκαν ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Μετρήθηκαν $\pm$ SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD(%)	Ανάκτηση (R, %)
Etridiazole	$\Delta\text{A}^\alpha$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,01$	9,0	105
	0,50	$0,54 \pm 0,10$	18,5	108
	1,00	$1,10 \pm 0,10$	9,0	110
	2,50	$2,3 \pm 0,12$	5,2	92
Chloroneb	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	$0,52 \pm 0,06$	11,5	103
	1,00	$0,73 \pm 0,04$	5,4	73
	2,50	$2,48 \pm 0,30$	12,1	99
Propachlor	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	$0,57 \pm 0,02$	3,5	113
	1,00	$1,18 \pm 0,06$	5,1	118
	2,50	$2,28 \pm 0,02$	0,8	91
Trifluralin	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	$0,10 \pm 0,01$	10,0	105
	0,50	$0,53 \pm 0,03$	5,6	106
	1,00	$1,03 \pm 0,14$	13,6	103
	2,50	$2,31 \pm 0,01$	0,4	92
Hexachlorobenzene	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	$0,09 \pm 0,01$	11,1	95
	0,50	$0,49 \pm 0,07$	14,2	98

	1,00	1,01 ± 0,20	19,8	111
	2,50	2,50 ± 0,16	6,4	100
Chlorothalonil	ΔA	-	-	-
	0,10	0,11 ± 0,01	9,0	115
	0,50	0,53 ± 0,06	11,3	105
	1,00	1,10 ± 0,13	11,9	110
	2,50	2,59 ± 0,22	8,4	103
Cyanazine+chlorpyrifos	ΔA	-	-	-
	0,10 + 0,10	0,18 ± 0,02	6,2	85
	0,50 + 0,50	0,96 ± 0,06	5,83	96
	1,00 + 1,00	1,7 ± 0,08	4,7	85
	2,50 + 2,50	5,34 ± 0,24	4,5	107
DCPA	ΔA	-	-	-
	0,10	0,10 ± 0,01	10	100
	0,50	0,46 ± 0,02	4,3	92
	1,00	1,09 ± 0,13	12,0	109
	2,50	2,45 ± 0,16	6,5	98
trans-chlordane	ΔA	-	-	-
	0,10	0,09 ± 0,01	11,1	90
	0,50	0,53 ± 0,04	7,5	105
	1,00	1,15 ± 0,10	8,7	115
	2,50	2,55 ± 0,21	8,2	102
cis-chlordane	ΔA	-	-	-
	0,10	0,09 ± 0,01	11,1	90
	0,50	0,55 ± 0,04	7,3	110
	1,00	1,17 ± 0,19	16,2	117



	2,50	2,41 ± 0,18	7,4	96
trans-nonachlor	ΔA	-	-	-
	0,10	0,088 ± 0,004	4,6	88
	0,5	0,53 ± 0,04	7,5	106
	1,00	1,00 ± 0,01	1,00	100
	2,50	2,49 ± 0,11	4,4	99
chlorobenzilate	-	-	-	-
	0,50	0,49 ± 0,07	14,2	98
	1,00	0,92 ± 0,03	3,2	92
	2,50	2,52 ± 0,21	8,3	101
cis-permethrin	-	-	-	-
	0,50	0,56 ± 0,10	17,8	111
	1,00	0,91 ± 0,05	5,4	91
	2,50	2,38 ± 0,23	9,6	95
trans-permethrin	ΔA	-	-	-
	0,10	0,10 ± 0,01	10,0	90
	0,50	0,52 ± 0,04	7,6	104
	1,00	1,12 ± 0,06	5,3	112
	2,50	2,60 ± 0,02	0,7	104

---

<sup>α</sup> ΔA: Δεν ανιχνεύθηκε

**Πίνακας 18.** Προσδιορισμός οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγμα μελιού Νο 5.

Φυτοφάρμακο	Προστέθηκαν ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	Μετρήθηκαν $\pm$ SD ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	RSD(%)	Ανάκτηση (R, %)
Etridiazole	$\Delta\text{A}^\alpha$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,01$	9,0	113
	0,50	$0,58 \pm 0,03$	5,1	115
	1,00	$1,07 \pm 0,18$	16,8	107
	2,50	$2,64 \pm 0,21$	7,9	106
Chloroneb	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	$0,54 \pm 0,02$	3,7	107
	1,00	$0,86 \pm 0,07$	8,1	86
	2,50	$2,53 \pm 0,19$	7,5	101
Propachlor	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,50	$0,56 \pm 0,07$	12,5	112
	1,00	$1,11 \pm 0,10$	9,0	111
	2,50	$2,18 \pm 0,14$	6,4	87
Trifluralin	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	$0,08 \pm 0,01$	12,50	80
	0,50	$0,59 \pm 0,06$	10,1	118
	1,00	$1,15 \pm 0,09$	7,8	115
	2,50	$2,49 \pm 0,21$	8,4	100
Hexachlorobenzene	$\Delta\text{A}$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,01$	9,0	110
	0,50	$0,49 \pm 0,09$	18,3	99
	1,00	$0,87 \pm 0,16$	18,3	87
	2,50	$2,16 \pm 0,22$	10,1	86

Chlorothalonil	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,02$	18,1	115
	0,50	$0,57 \pm 0,03$	5,2	114
	1,00	$1,12 \pm 0,07$	6,2	112
	2,50	$2,20 \pm 0,16$	7,2	88
Cyanazine+chlorpyrifos	$\Delta A$	-	-	-
	0,10 + 0,10	$0,22 \pm 0,02$	9,0	110
	0,50 + 0,50	$1,00 \pm 0,12$	12,0	100
	1,00 + 1,00	$2,38 \pm 0,26$	10,9	119
	2,50 + 2,50	$4,34 \pm 0,38$	8,7	87
DCPA	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,08 \pm 0,01$	12,5	85
	0,50	$0,52 \pm 0,01$	1,9	104
	1,00	$1,15 \pm 0,18$	15,6	115
	2,50	$2,57 \pm 0,23$	8,9	103
trans-chlordane	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,01$	9,1	105
	0,50	$0,56 \pm 0,04$	7,1	111
	1,00	$1,00 \pm 0,11$	11,0	100
	2,50	$2,45 \pm 0,32$	13,0	98
cis-chlordane	$\Delta A$	-	-	-
	0,10	$0,11 \pm 0,02$	18,2	105
	0,50	$0,56 \pm 0,07$	12,5	112
	1,00	$0,98 \pm 0,16$	16,3	98
	2,50	$2,40 \pm 0,24$	10,0	96

trans-nonachlor	ΔA	-	-	-
	0,10	0,09 ± 0,01	11,1	88
	0,50	0,59 ± 0,09	15,2	117
	1,00	0,86 ± 0,01	1,2	100
	2,50	2,29 ± 0,23	10,0	91
chlorobenzilate	ΔA	-	-	-
	0,50	0,58 ± 0,03	5,1	116
	1,00	0,90 ± 0,13	14,4	90
	2,50	2,37 ± 0,22	9,2	95
cis-permethrin	ΔA	-	-	-
	0,50	0,52 ± 0,06	11,5	103
	1,00	0,76 ± 0,06	7,8	76
	2,50	2,21 ± 0,16	7,2	88
trans-permethrin	ΔA	-	-	-
	0,10	0,08 ± 0,01	12,5	75
	0,50	0,55 ± 0,05	9,1	109
	1,00	1,17 ± 0,06	5,1	117
	2,50	2,65 ± 0,23	8,6	106

---

<sup>α</sup> ΔA: Δεν ανιχνεύθηκε

## 6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην εργασία αυτή προτείνεται μια νέα τεχνική προκατεργασίας δείγματος – η μικροεκχύλιση υγρού τύπου διασποράς (DLLME) – για τον προσδιορισμό υπολειμματικών οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού, με χρωματογραφία αερίου και ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων. Η μικροεκχύλιση DLLME που αναπτύχθηκε, είναι σχετικά γρήγορη, σε σχέση με άλλες τεχνικές προκατεργασίας που χρησιμοποιούνται για αυτό τον σκοπό, αφού ο χρόνος εκχύλισης δεν ξεπερνά το 1 λεπτό. Έχει χαμηλό λειτουργικό κόστος και δεν απαιτείται εξειδικευμένη οργανολογία. Η χρησιμοποίηση μικρών όγκων οργανικών διαλυτών (της τάξης των 50  $\mu\text{L}$ ) σε σχέση με την κλασσική εκχύλιση υγρού, τη καθιστά προσιτή και φιλική προς το περιβάλλον (Πράσινη Χημεία). Οι ανακτήσεις της μεθόδου κυμαίνονταν από 75-119%, ενώ τα όρια ανίχνευσης που επετεύχθησαν κυμαίνονταν από 0,02-0,15  $\mu\text{g L}^{-1}$  (ή 0,4-3,0  $\text{ng g}^{-1}$ ) τα οποία ήταν αρκετά χαμηλότερα από αυτά που ορίζει η Ευρωπαϊκή νομοθεσία.

## 7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albero, B., C. Sanchez-Brunete, et al. (2004). "Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry." J Agric Food Chem **52**(19): 5828-5835.
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Stajnbaher, D., Schenck, F. J. (2003). "Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce." Journal of AOAC International **86**(22): 412-431.
- Arthur, C. L., Pawliszyn, J. (1990). Anal. Chem **62**: 2145.
- Atienza, J., J. J. Jimenez, et al. (1993). "Supercritical fluid extraction of fluvalinate residues in honey. Determination by high-performance liquid chromatography." J Chromatogr **655**(1): 95-99.
- Banerjee, K., Oulkar, D. P., Dasgupta, S., Patil, S. B., Patil, S. H., Savant, R. (2007). "Validation and uncertainty analysis of a multi-residue method for pesticides in grapes using ethyl acetate extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry." Journal of Chromatography A: 98-109.
- Barker, S. A. (2007). "Matrix solid phase dispersion (MSPD)." Journal of Biochemical and Biophysical Methods **70**(2): 151-162.
- Blasco, C., M. Fernandez, et al. (2003). "Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain." J Agric Food Chem **51**(27): 8132-8138.
- Blasco, C., G. Font, et al. (2002). "Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry." J Chromatogr A **970**(1-2): 201-212.
- Blasco, C., Font, G., Pico, Y. (2002). J. Chromatogr. A(970): 201.
- Bolozdynya, A. E., Aprile, E.E., Bolotnikov, A.E., Doke, T. (2006). Noble Gas Detectors.
- Busch, K. L. (2001). Units in mass spectroscopy.
- Chen, H., J. Ying, et al. (2009). "Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography as an efficient and sensitive technique for simultaneous determination of chloramphenicol and thiamphenicol in honey." Anal Chim Acta **632**(1): 80-85.

- Chena, H., Chena, R., Li, S. (2010). "Low-density extraction solvent-based solvent terminated dispersive liquid–liquid microextraction combined with gas chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of carbamate pesticides in water samples." Journal of Chromatography A **1217**(8): 1244-1248.
- Diagne, R. G., G. D. Foster, et al. (2002). "Comparison of soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans." J Agric Food Chem **50**(11): 3204-3207.
- Eskilsson, C. S. and E. Bjorklund (2000). "Analytical-scale microwave-assisted extraction." J Chromatogr A **902**(1): 227-250.
- Falqui-Cao, C., Z. Wang, et al. (2001). "Focused microwave assistance for extracting some pesticide residues from strawberries into water before their determination by SPME/HPLC/DAD." J Agric Food Chem **49**(11): 5092-5097.
- Fernandez, M., Pico', Y., Manes, J. (2002). "Analytical Methods for Pesticide Residue Determination in Bee Products." Journal of Food Protection **65**(9): 1503.
- Fu, L. Y., Liu, X.J., Hu, J., Zhao, X.N., Wang, H.L., Wang, X.D. (2009). "Determination of organophosphorus pesticides in environmental water samples by dispersive liquid–liquid microextraction with solidification of floating organic droplet followed by high performance liquid chromatography." ANALYTICAL AND BIOANALYTICAL CHEMISTRY **397**(6): 2543-2549.
- Harris, D. C. (1999). Gas Chromatography.
- Herrera, A., C. Perez-Arquillue, et al. (2005). "Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection." Anal Bioanal Chem **381**(3): 695-701.  
[http://ec.europa.eu/sanco\\_pesticides/public/index.cfm](http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm) (2005).  
<http://precedings.nature.com/documents/5736/version/1/files/npre20115736-1.pdf>.  
<Http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm>.  
<http://www.chromatography-online.org/topics/retention/time.html%3E>.  
[http://www.jasco.hu/konyvtar/TN111\\_Matrix\\_solid\\_phase\\_dispersion\\_MSPD.pdf](http://www.jasco.hu/konyvtar/TN111_Matrix_solid_phase_dispersion_MSPD.pdf).  
<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>, 6.  
[http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=fr\\_CH&cid=10146521](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=fr_CH&cid=10146521) from  
[http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=fr\\_CH&cid=10146521](http://www.waters.com/waters/nav.htm?locale=fr_CH&cid=10146521).

- Jansson, C. (2000). "Multiresidue method for the gas chromatographic determination of pesticides in honey after solid-phase extraction cleanup." J AOAC Int **83**(3): 714-719.
- Jimenez, J. J., J. L. Bernal, et al. (1998). "Solid-phase microextraction applied to the analysis of pesticide residues in honey using gas chromatography with electron-capture detection." J Chromatogr A **829**(1-2): 269-277.
- Lehotay, S. J. (2004). Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticide Residues. 2004 FIFRA Fall Pesticide Analytical Workshop.
- McCance, W. (1991). The composition of foods. London.
- McNair, H. M., Miller, J.M., Bonelli, E. J. (1998). "Basic Gas Chromatography." Journal of Chemical Education **75**(9): 49-224.
- Merck, I. (2010) "Merck Index.", 9598.
- Mitra, S. (2003). Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. New York, Wiley & Sons Inc.
- Pawliszyn, J., Arthur, C.L. (1990). "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers." Anal. Chem **62**(19): 2145-2148.
- Prados-Rosales, R. C., J. L. Luque Garcia, et al. (2003). "Rapid analytical method for the determination of pesticide residues in sunflower seeds based on focused microwave-assisted Soxhlet extraction prior to gas chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr A **993**(1-2): 121-129.
- Rial-Otero, R., Gaspar, E.M., Moura, I., Capelo, J.L. (2007). "Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview." Talanta **71**: 511.
- Rissato, S. R., M. S. Galhiane, et al. (2004). "Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection." J Chromatogr A **1048**(2): 153-159.
- Rissato, S. R., Galhiane, M.S., Knoll, F.R.N., Apon, B.M. (2004). J. Chromatogr. A **1048**(153).
- Schwedt, G. (1996). Εγχειρίδιο των φυσικών και χημικών μεθόδων ανάλυσης. New York, Επιστημονικές εκδόσεις " Γρ. Παρισιάνος ".
- Skoog, D., Holler, J.F., Nieman, T.A. (1997 ). Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης.
- Stellman, J. M. (1998). Encyclopaedia of Occupational Health and Safety. Encyclopaedia of Occupational Health and Safety. J. Stellman, Margaret. Geneva, International Labour Office. III.



- Tsigouri, A. D., Menkissoglu-Spiroudi, U. et al. (2001). "Study of tau-fluvalinate persistence in honey." Pest Manag Sci **57**(5): 467-471.
- Tsiipi, D., M. Triantafyllou, et al. (1999). "Determination of organochlorine pesticide residues in honey, applying solid phase extraction with RP-C18 material." Analyst **124**(4): 473-475.
- Vetter, W., M. Weichbrodt, et al. (1998). "Combined microwave-assisted extraction and gel permeation chromatography for the determination of chlorinated hydrocarbons in seal blubber and cod livers." Chemosphere **37**(9-12): 2439-2449.
- Wennrich, L., P. Popp, et al. (2001). "Determination of organochlorine pesticides and chlorobenzenes in strawberries by using accelerated solvent extraction combined with sorptive enrichment and gas chromatography/mass spectrometry." J AOAC Int **84**(4): 1194-1201.
- Wilkowska, A., Marek Biziuk, M. (2011). "Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology." Food Chemistry **125**: 803-812.
- Zacharis, C. K., P. D. Tzanavaras, et al. (2010). "Solvent-based de-emulsification dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of trace organochlorine pesticides in environmental water samples." J Chromatogr A **1217**(38): 5896-5900.
- Zang, X. H., Wu, Q.H., Zhang, M.Y., Xia, G.H., Wang, Z. (2009). "Developments of Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Technique." Chinese Journal of Analytical Chemistry **37**(2): 161-168.
- Άρθρο 2 της ΕΟΚ.,οδηγία 74/409.
- Άρθρο 3 της ΕΟΚ.,οδηγία 74/409.
- Άρθρο 8 της ΕΟΚ.,οδηγία 74/409.
- Θρασυβούλου, Θ. Α. (2009). Πρακτική μελισσοκομία. Θεσσαλονίκη.
- Μπαλαγιάννης, Γ. Π. (1994). Εγχειρίδιο Γεωργικών Φαρμάκων. Πειραιάς.
- Μπίκος, Α. (1991). Όλα για το μέλι. Αθήνα
- Παπαδογιάννης, Ι. Ν., Σαμανίδου, Β.Φ. (2001). Ενόργανη Χημική Ανάλυση. Θεσσαλονίκη, ΠΗΓΑΣΟΣ.
- Υφαντίδης, Δ. Μ. (1995). Παθήσεις του μελισσιού. Θεσσαλονίκη.