



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό
φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο μέλι**

Ερμιόνη Σ. Γότση

Τεχνολόγος Γεωπόνος, M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2021



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό
φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο μέλι**

Ερμιόνη Σ. Γότση

Τεχνολόγος Γεωπόνος, M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ιωάννινα 2021

« Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2 »



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Ιωάννινα, 26-4-2021

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ, ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ,
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ, 45110 ΙΩΑΝΝΙΝΑ

ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ ΤΗΣ ΥΠΟΨΗΦΙΑΣ ΔΙΔΑΚΤΟΡΟΣ

κ. ΕΡΜΙΟΝΗΣ ΓΟΤΣΗ

ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΠΟΝΟΜΗ ΤΟΥ ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΥ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟΥ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

Η επταμελής εξεταστική επιτροπή, όπως ορίστηκε σύμφωνα με την απόφαση της Συνέλευσης του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (Συνεδρίαση 1034/23.03.2021) για την κρίση της Διδακτορικής Διατριβής της κ. Ερμιόνης Γότση, συνήλθε σε συνεδρίαση μέσω Τηλεδιάσκεψης διά του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, την Δευτέρα 26 Απριλίου 2021 και ώρα 12.00, όπου παρακολούθησε τη δημόσια υποστήριξη της Διδακτορικής Διατριβής της υποψήφιας διδάκτορος κ. Ερμιόνης Γότση, με τίτλο θέματος:

«Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο μέλι»

Παρόντα μέσω τηλεδιάσκεψης ήταν τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής και τα μέλη της ακαδημαϊκής κοινότητας και μεταπτυχιακοί φοιτητές.

Πριν την έναρξη της συνεδρίας, ο Πρόεδρος της επιτροπής, Καθηγητής Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, ενημέρωσε τα μέλη για τη διαδικασία με βάση τις κείμενες διατάξεις. Η κ. Ερμιόνη Γότση ανέπτυξε για μία περίπου ώρα τα κυριότερα αποτελέσματα της διατριβής της, απάντησε σε ερωτήσεις του ακροατηρίου και στη συνέχεια σε ερωτήματα της εξεταστικής επιτροπής.

Στη συνέχεια αποχώρησε η κ. Ερμιόνη Γότση μαζί με το ακροατήριο, ενώ η επταμελής εξεταστική επιτροπή, μετά από σύσκεψη και λεπτομερή συζήτηση, έκρινε ότι η διατριβή είναι πρωτότυπη και συμβάλλει στην εξέλιξη της επιστήμης και έτσι αποφάσισε ομόφωνα να προτείνει στη Συνέλευση του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων την αναγόρευση της κ. Ερμιόνη Γότση σε διδάκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και την απονομή του διδακτορικού διπλώματος με βαθμό "ΑΡΙΣΤΑ" (Δέκα – 10).

Ιωάννινα, 26 Απριλίου 2021

Η Εξεταστική Επιτροπή

- | | | | |
|---------------------------|---|---|--|
| 1. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος | Καθηγητής Τμήμα Χημείας, Παν. Ιωαννίνων |  | ATHANASIOS VLESSIDIS
28.04.2021 12:02 |
| 2. Βλεσσίδης Αθανάσιος | Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν. Ιωαννίνων |  | VASILEIOS SAKKAS
28.04.2021 13:46 |
| 3. Σακκάς Βασίλειος | Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν. Ιωαννίνων |  | VASILEIOS SAKKAS
28.04.2021 13:46 |
| 4. Κωνσταντίνου Ιωάννης | Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Παν. Ιωαννίνων |  | VASILEIOS SAKKAS
28.04.2021 13:46 |
| 5. Χελά Δήμητρα | Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Παν. Ιωαννίνων |  | VASILEIOS SAKKAS
28.04.2021 13:46 |
| 6. Πατακιούτας Γεώργιος | Αναπλ. Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας, Παν. Ιωαννίνων |  | VASILEIOS SAKKAS
28.04.2021 13:46 |
| 7. Αντωνοπούλου Μαρία | Επίκ. Καθηγήτρια, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος,
Πανεπιστήμιο Πατρών |  | VASILEIOS SAKKAS
28.04.2021 13:46 |

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Συνέλευση: **901^A/13-02-20015**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής

Επιβλέπων:

Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Μέλη:

Αθανάσιος Βλεσσίδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Βασίλειος Σακκάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ημερομηνία ορισμού θέματος: **902/22-07-2015**

Ημερομηνία τροποποίησης θέματος: **1018/30-06-2020**

Θέμα: **«Ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο μέλι»**

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Συνέλευση: **1034/23-03-2021**

1. Τριαντάφυλλος Αλμπάνης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. Αθανάσιος Βλεσσίδης, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. Βασίλειος Σακκάς, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
4. Ιωάννης Κωνσταντίνου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
5. Δήμητρα Χελά, Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
6. Γεώργιος Πατακιούτας, Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Γεωπονίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
7. Μαρία Αντωνοπούλου, Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Πανεπιστήμιο Πατρών

Στη μητέρα μου Βασιλική,
και στον καλύτερο πατέρα που θα είναι για πάντα παρών.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Ερευνητικό Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Χημείας και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη.

Με αφορμή την ολοκλήρωση της μακροχρόνιας αυτής προσπάθειας θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη για την ευκαιρία που μου έδωσε να εκπονήσω τη διδακτορική μου διατριβή στο εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων. Η υποστήριξη και καθοδήγηση του υπήρξαν καθοριστικές για την αποπεράτωση της παρούσας εργασίας.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας κ. Αθανάσιο Βλεσσίδη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημείας κ. Βασίλειο Σακκά που δέχτηκαν να αποτελέσουν μέλη της Συμβουλευτικής Επιτροπής. Η συνεργασία και η συμβολή τους, σε θεωρητικό και πειραματικό επίπεδο, συνέβαλαν ουσιαστικά στην πραγματοποίηση της διατριβής αυτής. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής επιτροπής κ. Ιωάννη Κωνσταντίνου, κ. Δήμητρα Χελά, κ. Γεώργιο Πατακιούτα και κ. Μαρία Αντωνοπούλου, για την αποδοχή να αξιολογήσουν τη Διατριβή.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στο ερευνητικό προσωπικό του εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων Δρ. Βασιλική Μπότη για την πολύτιμη συνεργασία της, κυρίως όμως για τη φιλία και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχαν στις δύσκολες στιγμές. Επίσης, ιδιαίτερα ευχαριστώ για την συνεργασία μας στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας και Χημείας Τροφίμων τους συναδέλφους Δρ. Χαρούλα Τσούτση, Δρ. Χριστίνα Κοσμά, Δρ. Μαργαρίτα Καψή, Δρ. Μερίνα Καλαμπόκα και Νότη Τραντόπουλο για την υποστήριξη τους τόσο σε επιστημονικό όσο και σε προσωπικό επίπεδο.

Τέλος, ένα ευχαριστώ είναι το λιγότερο που οφείλω στην μητέρα μου για την αμέριστη βοήθεια και συμπαράσταση, την κατανόηση και την ενθάρρυνση που μου προσέφερε καθ' όλη την διάρκεια της παρούσας διατριβής.

Ερμιόνη Σ. Γότση
Ιωάννινα, Απρίλιος 2021

Περιεχόμενα

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
Κεφάλαιο 1.....	1
Γεωργικά φάρμακα και οι επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και στην διατροφή ...	1
1.1. Ιστορική αναδρομή	1
1.2. Χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην παραγωγή του μελιού και υπολείμματα τους στα μελισσοκομικά προϊόντα	4
1.2.1. Τρόποι επιβάρυνσης του μελιού και των άλλων προϊόντων κυψέλης με υπολείμματα φυτοφαρμάκων και άλλων ρύπων.....	4
1.2.1.1. Επιβάρυνση μελισσοκομικών προϊόντων με τον έμμεσο τρόπο.....	5
1.2.1.1.1. Κατηγορίες και ταξινόμηση γεωργικών φαρμάκων.....	5
1.2.1.1.1.1. Οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα (OCPs).....	9
1.2.1.1.1.2. Οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα (OPPs).....	10
1.2.1.1.1.3. Καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα	11
1.2.1.1.1.4. Νεονικοτινοειδή παρασιτοκτόνα	11
1.2.1.2. Επιβάρυνση μελιού με τον άμεσο τρόπο	12
1.3. Τοξικότητα γεωργικών φαρμάκων	12
1.4. Γεωργικά φάρμακα στην αγορά	15
Κεφάλαιο 2.....	17
Γενικά στοιχεία για την παραγωγή του μελιού. Τεχνολογίες παραλαβής, κατηγορίες και σύσταση του μελιού.....	17
2.1. Γενικά στοιχεία για το μέλι	17
2.2. Μελισσοκομία και παραλαβή μελιού	20
2.2.1. Παραλαβή μελιού με παραδοσιακά συστήματα πίεσης.....	20
2.2.2. Παραλαβή μελιού με φυγοκέντρωση σε οριζόντιο φυγοκεντρικό σύστημα.....	21
2.3. Μέλι.....	21
2.3.1. Κατηγορίες μελιού.....	21
2.3.2. Χημική σύσταση του μελιού	24

Κεφάλαιο 3	30
Χρήση των γεωργικών φαρμάκων στην παραγωγή του μελιού	30
3.1. Οι ασθένειες των μελισσών	30
3.1.1. Βαρροϊκή Ακαρίαση (Varroa destructor).....	30
3.1.2. Αμερικάνικη σηψιγονία (Α.Σ.Γ.)	31
3.1.3. Ευρωπαϊκή σηψιγονία (Ε.Σ.Γ.)	33
3.1.4. Νοσεμίαση	33
3.1.5. Χρόνια παράλυση.....	34
3.2. Υπολείμματα στο μέλι από σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών	34
3.3. Ισχύουσα νομοθεσία για τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στο μέλι.....	36
Κεφάλαιο 4	40
Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στο μέλι	40
4.1. Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών	40
4.1.1. Δειγματοληψία	41
4.1.2. Διατήρηση δείγματος.....	41
4.1.3. Προκατεργασία-Ανάλυση δείγματος.....	42
4.1.3.1. Εκχύλιση με διαλύτη (Solvent Extraction-SE).....	44
4.1.3.2. Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Ρευστού (Supercritical Fluid Extraction-SFE).....	44
4.1.3.3. Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction).....	46
4.1.3.4. QUECHERS (Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe)	48
4.1.3.5. Εκχύλιση με Μικροκύματα (Microwave Assisted Extraction).....	49
4.1.3.6. Εκχύλιση με ράβδο ανάδευσης-προσρόφησης (Stir Bar Sorptive Extraction).....	50
4.1.3.7. Εκχύλιση Διασποράς Στερεάς Φάσης (Matrix Solid Phase Dispersion)	51
4.1.3.8. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Micro Extraction).....	53
4.1.3.9. Μικροεκχύλιση Διασποράς Υγρού-Υγρού (Dispersive Liquid Liquid Microextraction)	55
4.1.4. Υγρή και αέρια χρωματογραφία.....	56

4.1.4.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).....	57
4.1.4.2. Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS.....	58
4.1.4.3. Αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας.....	59
4.1.5. Επίδραση υποστρώματος.....	60
4.1.6. Επικύρωση Αναλυτικής Μεθόδου	60
4.1.6.1. Γενικές Απαιτήσεις Επικύρωσης.....	61
4.1.6.1.1. Ορθότητα-Ανάκτηση.....	62
4.1.6.1.2. Πιστότητα.....	63
4.1.6.1.3. Γραμμικότητα.....	63
4.1.6.1.4. Συστηματικό Σφάλμα.....	64
4.1.6.1.5. Όριο Ανίχνευσης.....	64
4.1.6.1.6. Όριο Ποσοτικού Προσδιορισμού	64
4.1.6.1.7. Όριο Αναφοράς.....	65
4.1.6.1.8. Αβεβαιότητα	65
4.1.6.1.9. Εκλεκτικότητα-Διακριτικότητα	67
4.1.6.1.10. Ανθεκτικότητα	67
4.2. Ανασκόπηση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού παρασιτοκτόνων στο μέλι.....	67
ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ	76
Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	78
Κεφάλαιο 5.....	78
Υλικά και Μέθοδοι.....	78
5.1. Χημικά, υλικά και όργανα.....	78
5.1.1. Δείγματα μελιού	78
5.1.2. Πρότυπες ενώσεις και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν.....	79
5.1.3. Διαλύτες.....	80
5.1.4. Αντιδραστήρια.....	80
5.1.5. Υλικά και σκεύη	81

5.1.6. Όργανα-Συσκευές	82
5.1.7. Επιλογή των δραστικών ουσιών και ταυτοποίηση των επιλεχθέντων ενώσεων με υγρή χρωματογραφία.....	82
5.2. Ανάπτυξη αναλυτικών μεθοδολογιών και εφαρμογές τους.....	84
5.2.1. Εμβολιασμός δειγμάτων μελιού στις αναλυτικές διαδικασίες.....	84
5.2.2. Συστήματα χρωματογραφίας	85
5.2.2.1. Ανάλυση των επιλεγμένων δραστικών ουσιών με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, σειριακό φωτοδιόδων (HPLC-UV/DAD).....	85
5.2.2.2. Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των επιλεγμένων δραστικών ουσιών στα δείγματα μελιού με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS.....	86
5.2.2.3. Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των επιλεγμένων δραστικών ουσιών στα δείγματα μελιού με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS).....	87
5.2.3. Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης και καθαρισμού των 4 δραστικών ουσιών από το μέλι.....	87
5.2.3.1. Τεχνική εκχύλισης διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD) που δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά της στην ανάκτηση των επιλεγμένων δραστικών από το μέλι.....	89
5.2.3.2. Τεχνική εκχύλισης QuEChERS που δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά της στην ανάκτηση των επιλεγμένων δραστικών από το μέλι	89
5.2.3.2.1. Τεχνικές καθαρισμού του υπερκείμενου που προέκυψε από την εκχύλιση QuEChERS που δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά της στην ανάκτηση των επιλεγμένων δραστικών από το μέλι	90
5.2.4. Επικύρωση μεθόδων	91
5.2.4.1. Επίδραση υποστρώματος (Matrix effects).....	94
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	96
Κεφάλαιο 6.....	96
Βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων σε μέλι.....	96
A. Βελτιστοποίηση.....	96
6.1. Εισαγωγή	96
6.2. Μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν τις εκχύλισεις QuEChERS και διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD)	96

6.3. Καθαρισμός Εκχυλισμάτων (clean-up).....	96
6.4. Μεθοδολογία ανάλυσης των τεσσάρων δραστικών ουσιών στο μέλι	99
6.4.1. Αρχική μελέτη εκχύλισης QuEChERS και διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD) των τεσσάρων αναλυτών από το μέλι.....	99
6.4.2. Ανακτήσεις των τεσσάρων αναλυτών από το μέλι με την τεχνική εκχύλισης QuEChERS που μελετήθηκαν.....	100
B. Επικύρωση.....	105
6.5. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των 4 αναλυτών στο μέλι	105
6.5.1. Ανακτήσεις.....	105
6.5.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.....	106
6.5.3. Γραμμικότητα.....	106
6.5.4. Επίδραση υποστρώματος.....	107
6.6. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των 4 αναλυτών στο μέλι.....	108
Κεφάλαιο 7	110
Ανίχνευση των 4 δραστικών ουσιών σε δείγματα μελιού.....	110
7.1. Δείγματα μελιού που εξετάστηκαν.....	110
7.2. Γενική εκτίμηση της εφαρμογής της μεθόδου και των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεχθέντων δραστικών ουσιών στο τυποποιημένο μέλι διαφόρων κατηγοριών.....	110
7.3. Γενική εκτίμηση της εφαρμογής της μεθόδου και των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεχθέντων δραστικών ουσιών στο μέλι συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων.....	111
7.4. Γενική εκτίμηση της εφαρμογής της μεθόδου και των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεχθέντων δραστικών ουσιών στο βιολογικό μέλι	112
7.5. Αναλυτικά αποτελέσματα των εργαστηριακών αναλύσεων ανά δραστική ουσία που εξετάστηκαν	112
7.5.1. Amitraz.....	112
7.5.2. Bromopropylate.....	115
7.5.3. Tau-fluvalinate.....	116
7.5.4. Coumaphos.....	119
7.6. Συνολική εκτίμηση των προσδιορισθέντων δραστικών ουσιών και των επιπέδων συγκέντρωσης τους στις διάφορες κατηγορίες μελιού που εξετάστηκαν.....	121

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	125
Κεφάλαιο 8.....	125
Συμπεράσματα διδακτορικής διατριβής.....	125
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	130
SUMMARY	135
Ε. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	139
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	169
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	173

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**Κεφάλαιο 1****Γεωργικά φάρμακα και οι επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και στην διατροφή****1.1. Ιστορική αναδρομή**

Η φυτοπροστασία ως ιδέα απασχολούσε τις ανθρώπινες κοινωνίες από την απαρχή των ιστορικών χρόνων με σκοπό τη βελτίωση της παραγωγής, ιδιαίτερα σε περιόδους όπου οι κοινωνικοπολιτικές συνθήκες δημιουργούσαν έλλειψη αγαθών. Στην Οδύσσεια αναφέρεται πως ο Οδυσσέας χρησιμοποιούσε ορυκτό θείο για την απολύμανση των ανακτόρων της Ιθάκης, ενώ οι Ρωμαίοι κατά την πολιορκία της Καρχηδόνας χρησιμοποίησαν θαλασσόνερο για να καταστρέψουν τη σοδειά των πολιορκούμενων. Το 900 μ.Χ. οι Κινέζοι χρησιμοποιούν αρσενικό ως εντομοκτόνο και η χρήση αυτή βρίσκει εφαρμογή και στην Ευρώπη της Αναγέννησης, ενώ τον 15^ο αιώνα τοξικές χημικές ενώσεις του αρσενικού, του υδράργυρου και του μολύβδου χρησιμοποιούνται στις συγκομιδές ως παρασιτοκτόνα. Τον 17^ο αιώνα θειικά άλατα της νικοτίνης που εξήχθησαν από φύλλα καπνού χρησιμοποιήθηκαν ως εντομοκτόνο ενώ καινοτομίες της Βιομηχανικής Εποχής υπήρξαν η χρήση του θειικού ασβεστίου ως μυκητοκτόνου, του θειικού χαλκού ως παρασιτοκτόνο στις σιτοκαλλιέργειες και του «βορδιγάλειου πολτού» ως μυκητοκτόνου ενάντια στον περονόσπορο της αμπέλου. Τον 19^ο αιώνα εισήχθησαν στις καλλιέργειες ως φυτοπροστατευτικά, χημικές ουσίες της κατηγορίας των πυρεθροειδών που παρήχθησαν με φυσικό τρόπο από ρίζες φυτών. Οι γνώσεις που εισήχθησαν την εποχή αυτή, εφαρμόστηκαν εν πολλοίς μέχρι τη μεγάλη έκρηξη στην παραγωγή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που συνέβη ταυτόχρονα με το Β' Παγκόσμιο Πόλεμο.

Στα χρόνια που ακολουθούν, λόγω της αύξησης του πληθυσμού και κατά συνέπεια της ανάγκης εξασφάλισης μεγαλύτερης και καλύτερης παραγωγής, εντείνεται η έρευνα για την ανάπτυξη νέων συνθετικών φυτοφαρμάκων. Από το δεύτερο παγκόσμιο πόλεμο και μετέπειτα, η βιομηχανία παραγωγής

φυτοφαρμάκων είναι από τις πιο αναπτυσσόμενες και υπολογίζεται ότι έχουν παρασκευαστεί περίπου 1.350 χημικές ενώσεις από τις 750 εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται σε διάφορα εμπορικά σκευάσματα φυτοφαρμάκων (Tomlin C.D.S., 1997).

Στα τελευταία 50 χρόνια η συμβολή των φυτοφαρμάκων στην αύξηση της γεωργικής παραγωγής είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η εντατική και συχνά αλόγιστη χρήση τους όμως προκαλεί την εμφάνιση διαφόρων περιβαλλοντικών προβλημάτων, όπως ρύπανση των υδάτων, του εδάφους και της ατμόσφαιρας. Ακόμα, συνέπεια της αλόγιστης χρήσης τους είναι η αύξηση του κινδύνου για την ανθρώπινη υγεία, που προέρχεται είτε από την απευθείας έκθεση του ανθρώπου στα φυτοφάρμακα κατά την παρασκευή, διακίνηση και εφαρμογή τους είτε από τα υπολείμματα τους στις τροφές, στο πόσιμο νερό και στην ατμόσφαιρα. Επίσης, ένα άλλο πρόβλημα το οποίο παρατηρείται, είναι ότι ορισμένα έντομα και παράσιτα αναπτύσσουν ανθεκτικότητα στις ουσίες που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση τους και έτσι απαιτούνται όλο και μεγαλύτερες ποσότητες φυτοφαρμάκων, καθώς και χρήση τοξικότερων ουσιών. Τέλος, η χρήση τους πολλές φορές καταστρέφει και ωφέλιμα έντομα, όπως οι μέλισσες και άλλα έντομα που είναι απαραίτητα στην επικονίαση των φυτών.

Το 1962 η συγγραφέας Rachel Carson εκδίδει το βιβλίο της "Silent spring" στο οποίο αναφέρει τους κινδύνους από την εκτεταμένη χρήση των φυτοφαρμάκων και προβλέπει μαζικές καταστροφές οικοσυστημάτων του πλανήτη εάν δεν ληφθούν άμεσα μέτρα (Carson R., 1962). Το συγκεκριμένο βιβλίο αποτελεί το έναυσμα για τη δημιουργία του περιβαλλοντικού κινήματος. Τα παραπάνω προβλήματα, που προέρχονται από την υπέρμετρη χρήση φυτοφαρμάκων, υποχρεώνουν τις κυβερνήσεις διαφόρων χωρών στη λήψη μέτρων, όπως την απαγόρευση της παραγωγής και χρήσης ορισμένων φυτοφαρμάκων, κυρίως των οργανοχλωριωμένων (στις Η.Π.Α. το 1969 και στην Ελλάδα το 1972). Σήμερα, η διαπίστωση των αρνητικών επιπτώσεων της χρήσης των φυτοφαρμάκων οδήγησε στη σύσταση αρμόδιων φορέων για την ρύθμιση και τον έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και στην σταδιακή θέσπιση αυστηρών νομοθετικών πλαισίων σε

όλα τα αναπτυγμένα κράτη (**Πίνακας 1.1.**) με σκοπό τον πλήρη έλεγχο της παραγωγής και της χρήσης τους.

Πίνακας 1.1. Ιστορική αναδρομή των βασικότερων νομοθετικών ρυθμίσεων και ελεγκτικών μηχανισμών στην ιστορία των γεωργικών φαρμάκων και των υπολειμμάτων τους.

Χρονολογία	Γεγονός
1945	Επίσημη σύσταση του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agricultural Organization-FAO) των Ηνωμένων Εθνών με έδρα την Ρώμη της Ιταλίας
1947	Έκδοση της πρώτης ομοσπονδιακής πράξης για τα εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα και τρωκτικοκτόνα (Federal Insecticide, Fungicide and Rodenticide-FIFRA) η οποία είχε περισσότερο συμβουλευτικό χαρακτήρα προς τους αγρότες
1961	Σύσταση της αρμόδιας Επιστημονικής Επιτροπής Υπολειμμάτων Φυτοφαρμάκων (Joint Meeting on Pesticides Residues-JMPR) η οποία εποπτεύεται από τους οργανισμούς Παγκόσμιας Υγείας (WHO) και Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) (FAO/WHO) και αποτελεί το συμβουλευτικό και επιστημονικό σώμα των κυβερνητικών μελών τους
1963	Εκτίμηση των πρώτων ημερήσιων αποδεκτών δόσεων (Acceptable Daily Intake-ADI) και μέγιστων επιτρεπτών ορίων (Maximum Residue Limit-MRL) τα οποία για πρώτη φορά θεώρησε το 1966
1963	Σύσταση της Επιτροπής Κώδικα Θρέψης (Codex Alimentarius Commission) από τους FAO/WHO για την ανάπτυξη πρότυπων τροφίμων, οδηγιών και σχετικών δημοσιεύσεων όπως κώδικες και χρήσεις για την διασφάλιση της υγείας των καταναλωτών. Την επιστημονική συμβουλευτική της επιτροπή αποτελεί η JMPR
1967	Η Ε.Ο.Κ. υιοθέτησε το νομοθετικό πλαίσιο 67/548 για την κατηγοριοποίηση και επισήμανση επικίνδυνων χημικών ουσιών
1970	Σύσταση της Επιτροπής Περιβαλλοντικής Προστασίας (Environmental Protection Agency-EPA) του ομοσπονδιακού κράτους των Η.Π.Α.
1972	Θεσπίστηκε η πρώτη νομοθετική πράξη για την ρύθμιση της παρασκευής, κατανομής και χρήσης των παρασιτοκτόνων (FIFRA, 1972) και η εξουσία διαχείρισης της ανατέθηκε στην EPA
1976-1979	Η Ευρωπαϊκή Ένωση προβαίνει στην έκδοση της οδηγίας 76/895 (και 90/642, OJL350, 1990) περί MRL's σε συγκεκριμένα προϊόντα φυτικής προέλευσης (OJL340, 1976), της οδηγίας 78/631 περί της κατηγοριοποίησης, συσκευασίας και επισήμανσης γεωργικών φαρμάκων (OJL206, 1978) και της οδηγίας 79/117 περί της απαγόρευσης της χρήσης και πώλησης γεωργικών φαρμάκων που περιέχουν επικίνδυνες δραστικές ουσίες (OJL33, 1979)

1.2. Χρήση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην παραγωγή του μελιού και υπολείμματα τους στα μελισσοκομικά προϊόντα.

1.2.1. Τρόποι επιβάρυνσης του μελιού και των άλλων προϊόντων κυψέλης με υπολείμματα φυτοφαρμάκων και άλλων ρύπων.

Δύο είναι οι τρόποι επιβάρυνσης των μελισσοκομικών προϊόντων από τις διάφορες χημικές ουσίες. Ο πρώτος είναι ο άμεσος τρόπος, που είναι ο πιο σημαντικός, και αφορά στα ακαρεοκτόνα, στα αντιβιοτικά και στα πτητικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιεί εντός της κυψέλης ο ίδιος ο μελισσοκόμος. Ο δεύτερος, ο έμμεσος τρόπος, έγκειται στη μεταφορά των διαφόρων ουσιών από τις ίδιες τις μέλισσες κατά την συλλογή νέκταρος, μελιτώματος, νερού και γύρης. Ο κύριος όγκος των εργασιών που δημοσιεύτηκαν σχετικά με τον έμμεσο τρόπο επιβάρυνσης των μελισσοκομικών προϊόντων αφορά σε φυτοπροστατευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις γεωργικές καλλιέργειες. Επιπλέον, σε σχέση με τη μεταφορά περιβαλλοντικών ρύπων στην κυψέλη, διερευνήθηκε κυρίως η παρουσία και η τύχη των βαρέων μετάλλων στα προϊόντα της μέλισσας, καθώς και στα ίδια τα έντομα. Σε λίγες περιπτώσεις εξετάστηκε η παρουσία νιτροφουρανίων, τοξινών και PCBs στα μελισσοκομικά προϊόντα και με βάση τα αποτελέσματα των δημοσιευμένων εργασιών δεν αναμένεται να αποτελέσουν πρόβλημα για την δημόσια υγεία, καθώς είτε δεν ανιχνεύτηκαν, είτε οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις δεν ξεπέρασαν τα 0.003 mg kg^{-1} (Annual Report on Surveillance for Veterinary Residues in the UK, 2007). Οι Saitta M. et al., (2017) μελέτησαν ρυπογόνες ουσίες που ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες, συμπεριλαμβανόμενων των PCBs, πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAH), οργανικών χλωριωμένων παρασιτοκτόνων (OCPs), οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα (OPPs), πυρεθροειδή εντομοκτόνα (PYRs), μυκητοκτόνα (Fs), ζιζανιοκτόνα (Hs), σε 47 δείγματα μελιού που συλλέχθηκαν από παραγωγούς της Ιταλίας την περίοδο 2012-2013. Τα μέλια που αναλύθηκαν περιείχαν όλα υπολείμματα OPPs και PAHs σε ποσοστό 46.8%, οι PCBs ήταν πάντα κάτω από τα LODs. Το 53.2% των δειγμάτων είχαν ρυπανθεί από OCPs, PYRs. Επιπλέον, το 46.8% των δειγμάτων υπερέβη τα ανώτερα όρια

καταλοίπων (MRLs) που καθορίστηκαν από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Saitta M. et al., 2017).

1.2.1.1. Επιβάρυνση μελισσοκομικών προϊόντων με τον έμμεσο τρόπο

Αρχικά υποστηρίχθηκε από πολλούς ερευνητές ότι η μεταφορά φυτοπροστατευτικών ουσιών από τον αγρό στην κυψέλη αποφεύγεται με διάφορους τρόπους. Ο κυριότερος από αυτούς είναι ο θάνατος της μέλισσας πριν προλάβει να μεταφέρει το νέκταρ ή τη γύρη και κατά συνέπεια η αποτροπή της εισόδου σημαντικών ποσοτήτων φυτοφαρμάκων στην κυψέλη. Εξάλλου, διατυπώθηκε η θεωρία ότι οι μέλισσες «φρουροί» αντιλαμβάνονται την τοξικότητα του φορτίου της κάθε συλλέκτριας και απαγορεύουν την είσοδο της, προστατεύοντας ταυτόχρονα το αποθηκευμένο μέλι. Τέλος, σύμφωνα με κάποιους ερευνητές, σε περίπτωση που το ρυπασμένο νέκταρ περάσει στην κυψέλη, οι «οικιακές μέλισσες» δεν το επεξεργάζονται περαιτέρω (Johansen C., Mayer D., 1990).

Σε αντίθεση με τα παραπάνω διαπιστώθηκε ότι οι μέλισσες μπορούν να μεταφέρουν στην κυψέλη συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων μέχρι 25 φορές μεγαλύτερες από τη θανατηφόρο για τις ίδιες δόση (Jaycox E.R., 1964). Ο κύριος όγκος των εργασιών που δημοσιεύτηκαν σχετικά με μεταφορά υπολειμμάτων από το περιβάλλον στην κυψέλη, αφορά σε φυτοπροστατευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στις διάφορες καλλιέργειες (Shendy A.H. et al., 2016).

1.2.1.1.1. Κατηγορίες και ταξινόμηση γεωργικών φαρμάκων

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

καθώς επίσης και οι ουσίες που χρησιμοποιούνται ως ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών.

Οι φυτοπροστατευτικές ουσίες που εφαρμόζονται σε διάφορες καλλιέργειες κατατάσσονται σε διάφορες ομάδες με βάση τη χημική τους δομή (οργανοφωσφορικές, πυρεθρινοειδείς, οργανοχλωριωμένες, καρβαμιδικές, νεονικοτινοειδείς), τον τρόπο πρόσληψης (διασυστηματικές, επαφής), το στόχο (εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, βακτηριοκτόνα, νηματωδοκτόνα, τρωκτικοκτόνα, ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών) και τον τρόπο παρασκευής (σύνθετες ή φυσικές). Τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών που ανιχνεύτηκαν κατά καιρούς σε προϊόντα κυψέλης ανήκουν στις ομάδες των ακαρεοκτόνων, κτηνιατρικών φάρμακων, μυκητοκτόνων, ζιζανιοκτόνων, εντομοκτόνων και νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων (Gawel M. et al., 2019). Στους **Πίνακες 1.3., 1.4. και 1.5.** παρουσιάζονται οι σημαντικότερες κατηγορίες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των εντομοκτόνων, ζιζανιοκτόνων, μυκητοκτόνων αντίστοιχα, οι οποίες αποτελούν και το μεγαλύτερο ποσοστό της παγκόσμιας κατανάλωσης των παρασιτοκτόνων (**Πίνακας 1.2.**) ενώ στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται οι βασικές κατηγορίες ταξινόμησης των παρασιτοκτόνων σύμφωνα με την χημική τους δομή.

Πίνακας 1.2. Πωλήσεις γεωργικών φαρμάκων παγκοσμίως, σε εκατομμύρια δολάρια.

Κατηγορία	1960		1970		1990		2005	
	Πωλήσεις	%	Πωλήσεις	%	Πωλήσεις	%	Πωλήσεις	%
Εντομοκτόνα	310	36.5	1002	37.1	7655	29	7798	25
Ζιζανιοκτόνα	170	20	939	34.8	11625	44	14971	48
Μυκητοκτόνα & Βακτηριοκτόνα	340	40	599	22.2	5545	21	7486	24
Άλλα	30	3.5	159	5.9	1575	6	936	3
Σύνολο	850	100	2700	100	26400	100	31191	100

Πηγή: Zhang W. et al., 2011.

Πίνακας 1.3. Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των εντομοκτόνων*.

Νο	Ομάδα
1.	Οργανοφωσφορικά α. Μη διασυστηματικά (παραμένουν στην εξωτερική επιφάνεια των φυτικών ιστών ή έχουν και μικρή διεισδυτική ικανότητα) (azinphos-methyl, chlorpyrifos, chlorpyrifos methyl*, diazinon*, dichlorvos*, ethion, fenitrothion, fenthion*, malathion*, mecarbam, methidathion, parathion*, parathion methyl*, phosalone, phosmet*, pirimiphos methyl, quinalphos, triazophos κ.α.)(*=παρουσιάζουν δράση ατμών) β. Διασυστηματικά (Διεισδύουν στο εσωτερικό των φυτικών οργάνων και μέσω των ηθμωδών αγγείων μεταφέρονται και διαχέονται μέσα στους φυτικούς ιστούς) (acephate, demeton-S-methyl, dimethoate, disulfoton, fenamiphos, formothion, heptenophos, methamidophos, monochrotophos, omethoate, phorate, phosphamidon, terbufos, thiometon, vamidothion)
2.	Οργανοχλωριωμένα (lindane (ή γ-HCH) αποκλειστικά για εφαρμογή στο έδαφος πριν τη σπορά και endosulfan)
3.	Καρβαμικά (aldicarb, butocarb, carbaryl, carbofuran, carbosulfan, fenoxycarb, fyrathiocarb, methomyl, oxamyl, pirimicarb, thiodicarb, thiofanox κ.α.)
4.	Συνθετικές Πυρεθρίνες ή Πυρεθροειδή (α-cypermethrin, bifenthrin, bioresmethrin, cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, esfenvalerate, fenvalerate, λ-cyhalothrin, permethrin, ζ-cypermethrin)
5.	Παράγωγα βενζοϋλουρίας (diflubenzuron, teflubenzuron, triflumuron)
6.	Εντομοκτόνα διαφόρων χημικών ομάδων (abamectin, buprofezin, cyromazine, imidachloprid)
7.	Πολτοί : είναι γαλακτώματα ή γαλακτωματοποιησίμα σκευάσματα ελαίων, συνήθως ορυκτελαίου, παραφινελαίου τα οποία χρησιμοποιούνται για ψεκασμούς κατά τη βλαστική περίοδο (θερινοί πολτοί) εναντίων κοκκοειδών αυγών εντόμων και ακάρεων κ.λ.π. ή στα φυλλοβόλα δέντρα κατά την περίοδο του λήθαργου (χειμερινοί πολτοί)
8.	Υποκαπνιστικά (aluminium phosphide, dazomet, 1-3 dichloropropene κ.α.)
9.	Βιολογικά εντομοκτόνα (Bacillus thuringiensis subsp.Kurstaki)

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

Πηγή: Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε., 2008, Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α., 2010.

Πίνακας 1.4. Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των ζιζανιοκτόνων*.

Νο	Ομάδα
1.	Εκλεκτικά αγρωστοειδή (Γνωστά και ως παρεμποδιστές της καρβοξυλάσης του ακετυλο-συνενζύμου Α ή αναστολείς της σύνθεσης λιπαρών οξέων) α. Αρυλοξυφαινοξυ-προπιονικά (clodinafor, diclofor, fenoxaprop, fluazifor κ.α.) β. Πράγγωγα κυκλοεξανοδιόνης (sethoxydim, tralkoxydim)

2. Παρεμποδιστές της οξεικογαλακτικής συνθετάσης (ALS)
 - α. Σουλφονουρίες (bensulfuron, chlorsulfuron, nicosulfuron, primisulfuron κ.α.)
 - β. Ιμιδαζολινόνες (imazamethabenz, imazapyr)
 - γ. Τριαζοπυριμιδίνες (cloransulan, flumetsulan)
3. Ορμονικά ζιζανιοκτόνα
 - α. Φαινοξυ-αλκανοϊκά παράγωγα (2,4-D, MCPA, dichlorprop, mecorprop)
 - β. Παράγωγα βενζοϊκού οξέος (dicamba)
 - γ. Παράγωγα πικονυλικού οξέος (chlorpyralid, triclopyr)
4. Δινιτροανιλίνες (benfluralin, dinitramine, ethalfuralin, pendimethalin, trifluralin)
5. Τριαζίνες (Αναστολείς φωτοσύνθεσης)
 - α. Συμμετρικές Τριαζίνες (atrazine, cyanazine, simazine, prometryn κ.α.)
 - β. Ασύμμετρες Τριαζίνες (metamitron, metribuzin)
6. Παράγωγα φαινυλουρίας (diuron, fluometuron, isoproturon, linuron, monolinuron)
7. Ουρακίλες (Αναστολείς φωτοσύνθεσης)(bromacil, lenacil, terbacil)
8. Καρβαμιδικά
 - α. Φαινυλοκαρβαμιδικά (desmedipham, phenmedipham)
 - β. Θειοκαρβαμιδικά (cycloate, EPTC, molinate, pebulate, thiobencarb, triallate)
9. Αμίδια
 - α. Χλωροακεταμίδια (alachlor, metolachlor, predilachlor, propachlor)
 - β. Άλλα αμίδια (napropamide, propyzamide, naptalam, tebutam)
10. Διπυριδίλια (difenzoquat, diquat, paraquat)
11. Νιτρίλια (Αναστολείς φωτοσύνθεσης)(dichlobenil, bromoxynil, ioxynil)
12. Διάφορα : ethofumesate, oxadiazon, oxyfluorfen, bentazone, pyridate, quinclorac, amitrole, glyphosate, trimesium, glufosinate, chlorthal dimethyl-DCPA

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

Πηγή: Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε., 2008, Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α., 2010.

Πίνακας 1.5. Ομάδες ταξινόμησης των δραστικών ουσιών των μυκητοκτόνων*.

No	Ομάδα
1.	Ανόργανα (θείο, χαλκός, χαλκός βορδιγάλειος, χαλκός οξικινολικός, χαλκός οξυχλωριούχος, χαλκός βουργούνδιος κ.α.)
2.	Αρωματικοί Υδρογονάνθρακες (chloroneb, ethazole, quintozone-PCNP κ.α.)

3. Βενζαμίδια
4. Βενζιμιδαζόλια
5. Βενζονιτρίλια
6. Καρβαμιδικά (propamocarb)
Καρβαμιδικά Ακετανιλίδια (mtalaxyl, benalaxyl, furalaxyl κ.α.)
Καρβαμιδικά Φαινυλαμίδια (ofurace)
7. Αναστολείς διμεθυλίωσης (Dimethylation Inhibitors-DMI) (cyproconazole, fenarimol, cyclobutanil, propiconazole, triadimefon)
8. Δικαρβοξυμίδια (iprodione, vincosolin)
9. Οργανοφωσφορικά (fozetyl)
10. Διθειοκαρβαμιδικά (mancozeb, maneb, thiram, zineb, mancozeb κ.α.)
11. Στρομπιλουρίνες

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

Πηγή: Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε., 2008, Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α., 2010.

1.2.1.1.1.1. Οργανοχλωριωμένα παρασιτοκτόνα (OCPs)

Ιδιαίτερα επικίνδυνες φυτοπροστατευτικές ουσίες θεωρούνται οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, καθώς έχει διαπιστωθεί η δυνατότητα τους να βιοσυσσωρεύονται και να βιομεγενθύνονται στην τροφική αλυσίδα. Ειδικότερα, στις ιδιότητες αυτών των ενώσεων περιλαμβάνονται :

- Παραμένουν σταθεροί στο περιβάλλον για πολλά χρόνια
- Βιοσυσσωρεύονται στο λιπώδη ιστό
- Βιομεγενθύνονται στην τροφική αλυσίδα
- Έχουν επιπτώσεις στο περιβάλλον και στους οργανισμούς (κυρίως χρόνιες)
- Μετακινούνται στο περιβάλλον με κάθε μέσο (αέρα, νερό, έδαφος, έμβρια όντα)

Η περίπτωση της βιομεγένθυνσης του οργανοχλωριωμένου υδρογονάνθρακα DDT στο περιβάλλον αποτελεί την πλέον χαρακτηριστική, καθώς η συγκέντρωση

που ανιχνεύεται στα υψηλότερα στρώματα της τροφικής αλυσίδας είναι 10.000.000 φορές από αυτήν που απαντά στο νερό. Στη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έγιναν πολλές προσπάθειες για παγκόσμια κατάργηση της χρήσης των ουσιών που ανήκουν στην ομάδα των Έμμονων Οργανικών Ρύπων (POP), στην οποία εντάσσονται και οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες (Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, 2011). Οι χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες εξαιτίας του πολύ μικρού ρυθμού αποδόμησης, μελετώνται ακόμα σε μελισσοκομικά προϊόντα (Shendy A.H. et al., 2016)(Saitta M. et al., 2017)(Malhat F.M. et al., 2015). Το ενθαρρυντικό στοιχείο είναι ότι, ενώ το διάστημα 1969-1980 το ποσοστό των ρυπασμένων μελιών με χλωριωμένους υδρογονάνθρακες ήταν 96.1%, το 1992 είχε μειωθεί στο 52.3% (Θρασυβούλου Α. και συνεργάτες, 1992).

1.2.1.1.1.2. Οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα (OPPs)

Το πρόβλημα που εντοπίζεται σε αυτήν την κατηγορία των παρασιτοκτόνων είναι η σχετικά μεγάλη τοξικότητα για τον άνθρωπο. Το θετικό στην περίπτωση των οργανοφωσφορικών ενώσεων είναι ότι δεν είναι σταθερές στο περιβάλλον και δε βιοσυγκεντρώνονται. Πιθανότατα, αυτή είναι η αιτία που υπολείμματα οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων ανιχνεύτηκαν σε πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις και πολύ πιο σπάνια στα προϊόντα κυψέλης, συγκριτικά με τους χλωριωμένους υδρογονάνθρακες ή τα ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιούν οι ίδιοι οι μελισσοκόμοι. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Αίγυπτο και αφορούσε σε μέλι, από τα 39 προς ανάλυση δείγματα μελιού βρέθηκαν 10 θετικά δείγματα και η μέση συγκέντρωση που προσδιορίστηκε για τις οργανοφωσφορικές ενώσεις αντιστοιχούσε και δεν ξεπέραγε σε $5.2 \mu\text{g kg}^{-1}$ (Naggar Y.A. et al., 2015). Οι López D.R. et al., (2014), διαπίστωσαν την παρουσία οργανοφωσφορικών και οργανοχλωριωμένων ενώσεων στο 52.4% των δειγμάτων μελιού που ανέλυσαν. Οι κύριες ανιχνεύσιμες ενώσεις ήταν chlorpyrifos (36.1%), profenofos (16.4%), DDT (6.6%), γ -HCH (4.9%) και fenitrothion (1.6%). Τέλος, σε έρευνα ανιχνεύτηκαν οργανοφωσφορικές ενώσεις σε συγκεντρώσεις από 0.005 mg kg^{-1} έως 0.006 mg kg^{-1} (Amendola G. et al., 2011).

1.2.1.1.1.3. Καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα

Τα καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα έχουν παρόμοιο τρόπο δράσης με τα οργανοφωσφορικά. Οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες είναι ιδιαιτέρως ασταθείς στο περιβάλλον, ωστόσο ανιχνεύτηκαν σε αρκετες περιπτώσεις σε προϊόντα κυψέλης. Αναφορικά με τα καρβαμιδικά παρασιτοκτόνα (παρά την ευκολία αποδόμησης τους), οι συγκεντρώσεις υπολειμμάτων που ανιχνεύτηκαν στη γύρη κυμάνθηκαν από 0.7 ng g^{-1} έως 1.2 ng g^{-1} για την δραστική ουσία carbaryl, ενώ η μέγιστη συγκέντρωση του carbofuran που προσδιορίστηκε ήταν 1.0 ng g^{-1} (Wiest L. et al., 2011). Στο μέλι ανιχνεύτηκαν υπολείμματα carbaryl, carbendazim, carbofuran, fenoxycarb, diethofencarb και methiocarb σε συγκεντρώσεις που δεν ξεπέρασαν τα 4.1 ng g^{-1} . Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε στην Ελλάδα, οι Kasiotis K.M. et al., (2014), ανιχνεύτηκε σε ένα μόνο θετικό δείγμα μελιού το μυκητοκτόνο carbendazim σε συγκέντρωση 1.6 ng g^{-1} (Kasiotis K.M. et al., 2014).

1.2.1.1.1.4. Νεονικοτινοειδή παρασιτοκτόνα

Οι περισσότερες έρευνες που πραγματοποιήθηκαν σχετικά με τα νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα, αναφέρονται στις δραστικές ουσίες acetamiprid, clothianidin, thiacloprid, thiamethoxam και imidacloprid. Οι συγκεκριμένες δραστικές ουσίες έχουν αποδειχτεί τοξικές για τις μέλισσες, αλλά τα υπολείμματα που ανιχνεύθηκαν στο μέλι κυμάνθηκαν σε συγκεντρώσεις (για το thiamethoxam σε $0.3\text{-}144 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$ και για το clothianidin σε $45 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) (Valverde S. et al., 2018). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Gawel M. et al., (2019) και αφορούσε σε μέλι, ανιχνεύτηκαν υπολείμματα του acetamiprid σε επίπεδο συγκέντρωσης από 0.001 mg kg^{-1} έως 0.13 mg kg^{-1} και του thiacloprid από 0.001 mg kg^{-1} έως 0.2 mg kg^{-1} , αλλά η συχνότητα ανίχνευσης τους ήταν 77% (Gawel M. et al., 2019). Τέλος, σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε ανιχνεύτηκαν νεονικοτινοειδή παρασιτοκτόνα και οι προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν από $0.00007 \text{ mg kg}^{-1}$ έως $0.0002 \text{ mg kg}^{-1}$ (Paradis D. et al., 2014).

1.2.1.2. Επιβάρυνση μελιού με τον άμεσο τρόπο

Η άμεση επιβάρυνση των προϊόντων της κυψέλης με υπολείμματα, γίνεται με τη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων εντός αυτής, προκειμένου να αντιμετωπισθούν οι διάφορες ασθένειες που προσβάλλουν τις μέλισσες. Η σημαντικότερη κατηγορία σκευασμάτων που χρησιμοποιείται είναι τα ακαρεοκτόνα, καθώς το *Varroa destructor* Anderson & Trueman είναι το κυρίαρχο πρόβλημα για την υγιεινή ενός μελισσιού. Για την καταπολέμηση της βαρρόα χρησιμοποιούνται τόσο χημικά σκευάσματα όσο και φυσικές ουσίες. Η χρήση όλων αυτών των προϊόντων είναι δυνατόν να προκαλέσει τη συγκέντρωση υπολειμμάτων στο τελικό προϊόν.

1.3. Τοξικότητα γεωργικών φαρμάκων

Η τοξικότητα ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος εξαρτάται από ποικίλους παράγοντες, μεταξύ των οποίων αναφέρονται η χημική δομή, οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας, η δόση, η διάρκεια έκθεσης, ο τρόπος χρήσης, η φυσική του κατάσταση και τελικά το είδος έκθεσης (κατάποση, εισπνοή, επιδερμική κ.α.). στα αποτελέσματα μιας οξείας τοξικότητας μπορούν να αναφερθούν δηλητηριάσεις, δυσφορία, ερεθισμοί ματιών, δέρματος και αναπνευστικού συστήματος. Επίσης, οι διάφορες ομάδες φυτοπροστατευτικών ουσιών και τα κτηνιατρικά φάρμακα είναι πιθανό να ευθύνονται για την πρόκληση ορισμένων μορφών καρκίνου, τερατογενέσεων και γενικότερα χρωμοσωμικών ανωμαλιών, καθώς και για την εξασθένηση του ανοσοποιητικού συστήματος του ανθρώπου (Banerjee B.D., 1999). Το γεγονός ότι ένας ιδιαίτερα επικίνδυνος τρόπος έκθεσης σε μια δραστική ουσία είναι η κατάποση, καταδεικνύει τη σημασία που έχουν για τον καταναλωτή τα υπολείμματα των χημικώς συντιθέμενων ουσιών στα τρόφιμα.

Η τοξικότητα μιας ουσίας εκφράζεται σε τιμές θανατηφόρας δόσης των 50% (Lethal dose values-LD₅₀). Ο όρος αυτός δίνει την ποσότητα της ουσίας, η οποία προκαλεί το θάνατο του 50% ενός πληθυσμού πειραματόζων, αν χορηγηθεί σε μια δόση. Η τιμή LD₅₀ σε ppm ή σε mg ανά Kg βάρους του πειραματόζου. Ευνόητο είναι, ότι όσο πιο μικρή η LD₅₀, τόσο πιο τοξική είναι η ένωση.

Εκτός από την LD₅₀, χρησιμοποιείται και ο όρος ανώτατη μη δραστική συγκέντρωση (no effect level) και είναι η συγκέντρωση εκείνη, με την οποία δεν εμφανίζεται καμία βλάβη στο πειραματόζωο.

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

Στον **Πίνακα 1.6.** δίνονται οι κατηγορίες τοξικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων με βάση την LD₅₀ οξείας τοξικότητας σε επίμυες σύμφωνα με τους Κανονισμούς της Ευρωπαϊκή Ένωσης.

Πίνακας 1.6. Κατηγορίες τοξικότητας φυτοπροστατευτικών προϊόντων με βάση την LD₅₀ οξείας τοξικότητας σε επίμυες σύμφωνα με τους Κανονισμούς της Ευρωπαϊκή Ένωσης.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ	ΣΤΟΜΑΤΟΣ (mg/kg Z.B.*)	ΔΕΡΜΑΤΟΣ (mg/kg Z.B.)	ΑΝΑΠΝΟΗΣ (mg/L αέρα)
Στερεά εκτός από δολώματα και δισκία			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	0-5	0-10	-
II (ΤΟΞΙΚΑ)	5-50	10-100	-
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	50-500	100-1000	-
Υγρα, δολώματα και δισκία			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	0-25	0-50	-
II (ΤΟΞΙΚΑ)	25-200	50-400	-
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	200-2000	400-4000	-
Αεροκαλύματα, καπνογόνα και πολύ λεπτές σκόνες επιπάσεως (διαμ<50μ)			
I (ΔΗΛΗΤΗΡΙΑ)	-	-	0.0-0.5
II (ΤΟΞΙΚΑ)	-	-	0.5-2.0
III (ΕΠΙΒΛΑΒΗ)	-	-	2.0-20.2

* Ζων Βάρος πειραματόζωου.

Πηγή: Μαυρομανωλάκης Κ., 2007.

Στα πλαίσια της προστασίας του καταναλωτή η Ευρωπαϊκή Ένωση δημιούργησε ένα σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης με την ονομασία RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed), το οποίο αφορά σε επικίνδυνα τρόφιμα και ζωοτροφές, που αντιμετωπίζονται στην αγορά-μελών. Στα αρχεία του RASFF γίνεται

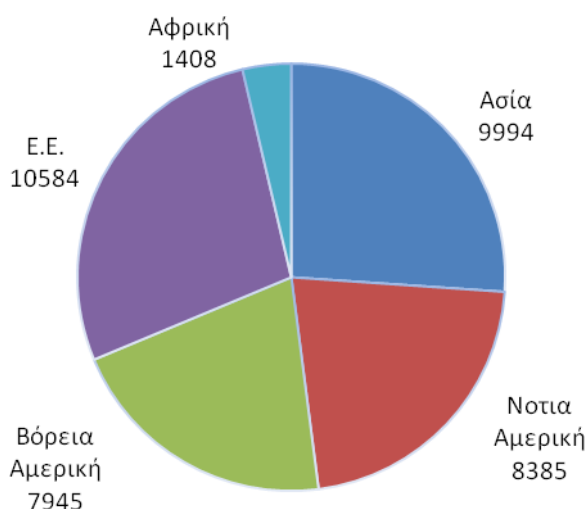
αναφορά και σε προϊόντα μέλισσας, που αποτελούν εν δυνάμει κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Τα δύο προϊόντα που έχουν αναφερθεί κατά καιρούς είναι το μέλι και ο βασιλικός πολτός, ενώ η κυρία αιτία που τα καθιστά επικίνδυνα είναι τα υπολείμματα αντιβιοτικών, που χρησιμοποιούνται από τους μελισσοκόμους για την καταπολέμηση της Αμερικανικής και της Ευρωπαϊκής σηψιγονίας. Ειδικότερα, όπως προκύπτει από τις δημοσιευμένες ετήσιες αναφορές της τετραετίας 2003-2006, η έγκαιρη προειδοποίηση για προϊόντα κυψέλης αφορά σε υπολείμματα τετρακυκλινών, στρεπτομυκινών, σουλφαδιαζόλης, χλωραμφαινικόλης και τυλοσίνης (RASFF, 2003)(RASFF, 2004)(RASFF, 2005)(RASFF, 2006). Τα επιβαρημένα προϊόντα προήλθαν από τρίτες χώρες (εκτός Ε.Ε.) και σε καμία περίπτωση δεν αναφέρθηκαν υπολείμματα των συγκεκριμένων αντιβιοτικών σε προϊόντα ελληνικής προέλευσης. Εκτός όμως από τα αντιβιοτικά -για τα οποία διενεργούνται έλεγχοι από τους αντίστοιχους Ελληνικούς φορείς- στα προϊόντα κυψέλης είναι πιθανό να ανιχνευτούν ακαρεοκτόνα και πτητικά εντομοκτόνα, που προέρχονται από επεμβάσεις του μελισσοκόμου στην κυψέλη και στην αποθήκη αντίστοιχα. Επιπλέον, πιθανή είναι η παρουσία βαρέων μετάλλων και φυτοπροστατευτικών ουσιών που ανευρίσκονται στο περιβάλλον ή χρησιμοποιούνται στη γεωργία (Bogdanov S., 2006)(Fredes C., Montenegro G., 2006).

Διαχωρισμοί των δραστικών ουσιών -σχετικός με το θέμα της παρούσας έρευνας- μπορεί να πραγματοποιηθεί και με βάση την μελισσοτοξικότητα τους. Στο σύνολο τους, οι δραστικές ουσίες διακρίνονται ως πολύ τοξικές, μετρίως τοξικές και μη τοξικές για τις μέλισσες. Οι σημαντικότερες επιδράσεις στις κοινωνίες των μελισσών παρατηρούνται μετά από επεμβάσεις με φυτοπροστατευτικές ουσίες σε περιόδους που τα φυτά είναι στο στάδιο της ανθοφορίας. Οι περισσότεροι θάνατοι παρατηρούνται στις εργάτριες μέλισσες που συλλέγουν το νέκταρ και τη γύρη. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται θάνατος των προνυμφών και των «οικιακών μελισσών» εξαιτίας των φυτοπροστατευτικών ουσιών που εντοπίζονται στη γύρη. Στις περιπτώσεις που δεν προκαλείται θάνατος, είναι πιθανόν να προκληθεί παράλυση των μελισσών, εκνευρισμός, θανάτωση και αντικατάσταση της βασίλισσας και γενικότερα μη φυσιολογική συμπεριφορά. Η συμπεριφορά αυτή μπορεί να οφείλεται σε δραστικές ουσίες, που δε σκοτώνουν τις

μέλισσες άμεσα (π.χ. το carbaryl που αποτελεί δραστική ουσία του σκευάσματος Sevin), αλλά μεταφέρονται μέσα στην κυψέλη από τις συλλέκτριες και έχουν επιπτώσεις στο σύνολο του πληθυσμού. Επιπλέον, ιδιαίτερα σημαντικός αποδείχτηκε ο τρόπος τυποποίησης και εφαρμογής του σκευάσματος, σε σχέση με την τοξικότητα στις μέλισσες. Η τυποποίηση της δραστικής ουσίας methyl parathion σε μικροκάψουλες σκοτώνει 13 φορές περισσότερες μέλισσες συγκριτικά με την τυποποίηση της ίδιας ουσίας ως γαλακτωματοποιήσιμο διάλυμα, καθώς μεταφέρεται στην κυψέλη από τις συλλέκτριες μέλισσες και δηλητηριάζει το γόνο και τα ακμαία άτομα. Επιπλέον, οι βρέξιμες σκόνες είναι λιγότερο επικίνδυνες συγκριτικά με τις μικροκάψουλες, αλλά προκαλούν περισσότερους θανάτους σε σχέση με τα υδατικά ή γαλακτωματοποιήσιμα διαλύματα (Sanford T.M., 1993).

1.4. Γεωργικά φάρμακα στην αγορά

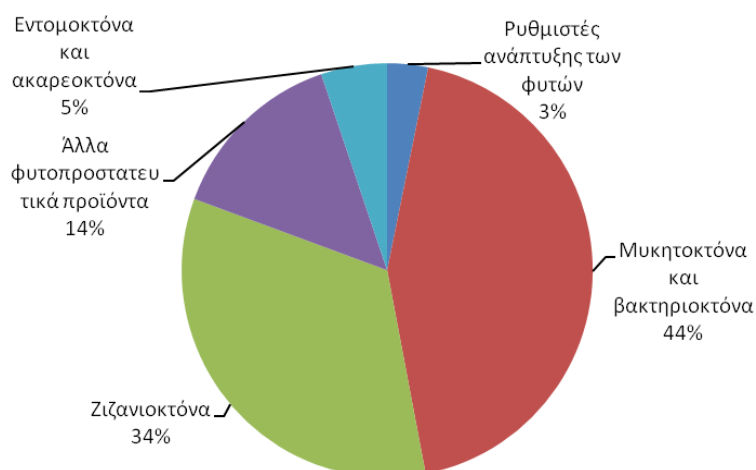
Τα τελευταία χρόνια η αξία της παγκόσμιας αγοράς γεωργικών φαρμάκων ανήλθε σε 38 δισεκατομμύρια Δολάρια ΗΠΑ με τα ζιζανιοκτόνα να είναι η σημαντικότερη ομάδα γεωργικών φαρμάκων που ακολουθείται από τα μυκητοκτόνα (Erbach G., 2012). Η Ευρώπη σήμερα αποτελεί τον μεγαλύτερο καταναλωτή γεωργικών φαρμάκων στον κόσμο ακολουθούμενη από την Ασία (Σχήμα 1.1.).



Σχήμα 1.1. Πωλήσεις γεωργικών φαρμάκων ανά ήπειρο (2010) σε εκατομμύρια δολάρια.
Πηγή: Erbach G., 2012.

Το 2014, η συνολική ποσότητα των πωλήσεων γεωργικών φαρμάκων στην ΕΕ ανήλθε σε περίπου 400.000 τόνους. Η Ισπανία (19.9%), η Γαλλία (19.0%), η Ιταλία (16.2%), η Γερμανία (11.6%) και η Πολωνία (5.9%) ήταν τα κράτη μέλη στα οποία πωλήθηκαν οι μεγαλύτερες ποσότητες γεωργικών φαρμάκων και όλες μαζί συνιστούσαν συνολικά το 72.7% των πωλήσεων γεωργικών φαρμάκων στην ΕΕ (Eurostat, 2016).

Τα μυκητοκτόνα και βακτηριοκτόνα ήταν οι πλέον πωλούμενες ομάδες γεωργικών φαρμάκων με μερίδιο αγοράς 44%, ακολουθούμενες από τα ζιζανιοκτόνα με 33% μερίδιο στην αγορά. Μαζί με την ομάδα "άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα" (14%), αυτές οι τρεις ομάδες προστίθενται στο 91% των γεωργικών φαρμάκων που πωλήθηκαν στην Ε.Ε. το 2014. Από τις άλλες τρεις ομάδες γεωργικών φαρμάκων, τα "εντομοκτόνα και ακαρεοκτόνα" με μερίδιο 5%, οι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών 3% και τα μαλακιοκτόνα που κατέλαβαν το μικρότερο ποσοστό με λιγότερο από 1% (**Σχήμα 1.2.**). Οι ποσότητες γεωργικών φαρμάκων που διατίθενται στην αγορά ετησίως μπορούν να συνδεθούν με άλλες στατιστικές που σχετίζονται άμεσα με τη χρήση τους (Eurostat, 2016).



Σχήμα 1.2. (%) πωλήσεις των κύριων ομάδων γεωργικών φαρμάκων στην ΕΕ, 2014. Πηγή: Eurostat, 2016.

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 2

Γενικά στοιχεία για την παραγωγή του μελιού. Τεχνολογίες παραλαβής, κατηγορίες και σύσταση του μελιού.

2.1. Γενικά στοιχεία για το μέλι

Το μέλι είναι μια τροφή με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και ξεχωριστές οργανοληπτικές ιδιότητες. Παράγεται από τις μέλισσες, οι οποίες συλλέγουν νέκταρ και μελιτώματα από τα φυτά, ουσίες τις οποίες μετατρέπουν σε μέλι. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία μελιών, αφενός επειδή κάθε φυτό συνεισφέρει τα δικά του χαρακτηριστικά συστατικά, αφετέρου επειδή υπάρχουν μεγάλες κλιματολογικές διαφοροποιήσεις μεταξύ των διαφόρων περιοχών.

Ο ορισμός του τι είναι μέλι είναι δύσκολος. Σύμφωνα με την οδηγία 2001/110 του Συμβουλίου της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το μέλι ορίζεται ως εξής: «Μέλι είναι η φυσική γλυκιά ουσία που παράγουν οι μέλισσες του είδους *Apis mellifera* από το νέκταρ των φυτών ή από εκκρίσεις ζώντων μερών φυτών ή εκκρίματα εντόμων απομιζούντων φυτά ευρισκόμενα πάνω σε ζώντα μέρη των φυτών, τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν, μετατρέπουν αναμειγνύοντας με ειδικές ύλες του σώματος τους, αποθέτουν, αφυδατώνουν, εναποθηκεύουν και φυλάσσουν στις κηρήθρες της κυψέλης, προκειμένου να ωριμάσουν».

Η παγκόσμια παραγωγή μελιού έχει σταθεροποιηθεί τα τελευταία χρόνια λίγο πάνω από τους 1.200.000 τόνους ετησίως (**Πίνακας 2.1.**). Κυρίαρχη στην παγκόσμια παραγωγή είναι η Ασία, κυρίως λόγω της παραγωγής της Κίνας και των χωρών της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ..

Πίνακας 2.1. Παγκόσμια παραγωγή μελιού.

Χώρες	Παραγωγή μελιού (τόνοι)
Κίνα	398.000
Ε.Ε.	204.000
Τουρκία	81.000
ΗΠΑ	80.000
Ουκρανία	71.000

Αργεντινή	59.000
Μεξικό	56.000
Λοιπές χώρες	592.000
Σύνολο	1.541.000

Πηγή: EU Commission DG AGRI C4-2012.

Οι μεγαλύτερες μελιτοπαραγωγές χώρες βρίσκονται στην Ασία, με την Κίνα να κυριαρχεί στην παγκόσμια αγορά (**Πίνακας 2.1.**), έχοντας τριπλάσια παραγωγή από τις χώρες της πρώην Ε.Σ.Σ.Δ. Στην δεύτερη θέση βρίσκεται η Ε.Ε. και ακολουθούν η Τουρκία και οι Η.Π.Α..

Στην Ε.Ε. υπάρχουν περίπου 9.000.000 μελίσσια και 500.000 παραγωγοί μελιού. Οι πιο παραγωγικές χώρες βρίσκονται στη λεκάνη της Μεσογείου, στις οποίες μάλιστα, με εξαίρεση τη Γαλλία, παρατηρείται αύξηση του αριθμού των μελισσιών (www.beekeeping.com).

Πίνακας 2.2. Στατιστικά στοιχεία και στοιχεία παραγωγής μελιού στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Χώρα	Παραγωγή μελιού (t)	Παραγωγοί-Μελισσοκόμοι (%)	Αρ. Κυψελών	% Ποσοστό Κυψελών
Ισπανία	33.000	15.0	2.459.373	17.586
Ιταλία	22.800	1.5	1.127.836	8.065
Ελλάδα	15.600	20.1	1.502.239	10.742
Γαλλία	20.000	3.0	1.338.650	9.572
Γερμανία	17.900	0.3	711.913	5.091

Πηγή: EU Commission DG AGRI C4-2012.

Η ελληνική παραγωγή μελιού είναι σταθεροποιημένη τα τελευταία χρόνια γύρω στους 15.000 τόνους περίπου. Το 65% περίπου είναι πευκόμελο, μέλι το οποίο θεωρητικά δεν κρυσταλλώνει. Όταν, όμως, περιέχει προσμίξεις από νέκταρ ανθέων κρυσταλλώνει αργά, κάτι που συμβαίνει συχνά. Το μέλι ελάτης φτάνει το 5-10%, δίνοντας ένα μέλι που δεν κρυσταλλώνει, έχει ωραία όψη και ελαφριά γεύση. Μαζί με το πευκόμελο, αποτελούν τα σημαντικότερα μέλια από μελιτώματα στη χώρα μας, τα οποία χαρακτηρίζονται από υψηλής περιεκτικότητας σε μέταλλα και ιχνοστοιχεία. Το θυμαρίσιο μέλι αποτελεί το 10% της ετήσιας παραγωγής, με το μέλι να έχει ευχάριστο άρωμα και γεύση, χαρακτηριστικά στα οποία οφείλεται η προτίμηση και η υψηλή τιμή που έχει. Κρυσταλλώνει σε 6-18 μήνες. Άλλο ένα 10% περίπου είναι και η παραγωγή του μελιού πορτοκαλιάς, το μέλι της οποίας

κρυσταλλώνει το πολύ σε 2 μήνες. Είναι χρώματος ανοιχτοκίτρινου, με καλά οργανοληπτικά χαρακτηριστικά και ιδιαίτερα αρωματικό χαρακτήρα. Οι ετήσιες ποσότητες βαμβακίσου μελιού ποικίλουν, φτάνοντας μέχρι και 20% ανάλογα τη χρονιά. Οι ψεκασμοί που γίνονται στις καλλιέργειες βαμβακιού συχνά αποτρέπουν τους μελισσοκόμους να πάνε τα μελίσσια τους στο βαμβάκι. Το μέλι είναι ανοιχτόχρωμο, πολύ γλυκό, με γεύση βουτυρώδη. Έχει την υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση από όλα τα μέλια, λόγω της αυξημένης περιεκτικότητας σε H_2O_2 (Θρασυβούλου Α. και συνεργάτες, 2002)(Γούναρη Σ., 2004). Κρυσταλλώνει και αυτό πολύ γρήγορα, κάτι που το κάνει αντιεμπορικό στη χώρα μας. Σημαντικές ποσότητες μελιού φθινοπωρινής ερείκης παράγονται σε κάποιες περιοχές, με το μέλι να έχει ωραία οσμή και γεύση, αλλά κυρίως υψηλή θρεπτική αξία, που του δίνει ικανοποιητικά υψηλή τιμή. Υψηλή είναι και η θρεπτική αξία του μελιού καστανιάς, το οποίο έχει υψηλή αντιοξειδωτική δράση (Αλυσσανδράκης Ε., 2007). Πρόκειται για μέλι σκούρου χρώματος, με δυνατό άρωμα και έντονη πικρή γεύση διάρκειας. Τα δύο αυτά μέλια κυκλοφορούν ευρέως σε καταστήματα με είδη υγιεινής διατροφής. Το μέλι ηλίανθου είναι πλούσιο σε πολυφαινόλες (Θρασυβούλου Α. και συνεργάτες, 2002), όμως η καλλιέργειες ηλίανθου αποφεύγεται συχνά από τους παραγωγούς, καθώς προκαλούνται προβλήματα στις μελισσες (Θρασυβούλου Α., 1997). Τέλος, σε μικρότερες ποσότητες παράγονται αμιγή μέλια από ευκάλυπτο, κουμαριά, ασφάκα, πολυκόμπι, γλυκάνισο, βελανιδιά (δέντρο), χαρουπιά, φασκόμηλο, θρούμπι κ.α.

Από πλευράς γεωγραφικής κατανομής, η μελισσοκομία είναι δεδομένη σε όλη τη χώρα. Υπάρχουν όμως περιοχές που έχουν περισσότερο μελισσοκομικό ενδιαφέρον. Τέτοιες είναι οι περιοχές των νομών Χαλκιδικής, Καβάλας, Φθιώτιδας, Εύβοιας, Αττικής, Αρκαδίας, Ηρακλείου, Χανίων και άλλες. Η Μακεδονία έχει τις περισσότερες μελισσοκομικές μονάδες, το μεγαλύτερο αριθμό μελισσιών, τη μεγαλύτερη παραγωγή μελιού και τους περισσότερους επαγγελματίες μελισσοκόμους, όπως αυτό φαίνεται από το μέσο όρο των μελισσιών για κάθε μελισσοκομική μονάδα. Η Πελοπόννησος, η Κρήτη, η Στερεά Ελλάδα και η Εύβοια είναι επίσης περιοχές με μεγάλο αριθμό μελισσιών και μελισσοκόμων (Πίνακας 2.3.).

Πίνακας 2.3. Στατιστικά στοιχεία για τη Μελισσοκομία στην Ελλάδα.

Γεωγραφικό διαμέρισμα	Μελισσοκομικές Μονάδες (Αριθμός)	%	Μελίσσια (Αριθμός)	%	Παραγωγή μελιού (κιλά)	%
Μακεδονία	4010	20.0	463.905	34.40	4.820.647	36.30
Πελοπόννησος	3521	18.0	158.833	12.50	1.521.042	11.70
Κρήτη	2880	14.0	109.070	8.60	868.694	6.50
Στερεά Ελλάδα και Εύβοια	2742	14.0	201.110	15.80	2.086.603	15.70
Ν. Αιγαίου	2407	12.0	112.006	8.80	1.388.687	10.40
Θράκη	1154	6.0	44.681	3.50	531.289	4.00
Ήπειρος	1119	6.0	38.928	3.0	499.120	3.70
Θεσσαλία	1102	5.0	82.247	6.40	699.507	5.20
Αττική	631	3.0	49.860	3.90	762.840	5.70
Ν. Ιονίου	349	2.0	13.496	1.00	107.000	0.80

Πηγή: Ομοσπονδία Μελισσοκομικών Συλλόγων Ελλάδος (ΟΜΣΕ).

2.2. Μελισσοκομία και παραλαβή μελιού

2.2.1. Παραλαβή μελιού με παραδοσιακά συστήματα πίεσης

Η μέθοδος εξαγωγής μελιού από τις κηρήθρες με πίεση εφαρμόζεται από την αρχαιότητα, καθώς ήταν ο μόνος τρόπος πριν την εφεύρεση μηχανών εξαγωγής με τη δύναμη της φυγόκεντρου. Οι κηρήθρες μελιού πιέζονται με τα χέρια ή με πιεστικά μηχανήματα για την εξαγωγή του μελιού. Βασικά μειονεκτήματα της μεθόδου είναι :

- ✓ η καταστροφή των κηρηθρών
- ✓ η ενσωμάτωση αποθηκευμένης γύρης στο μέλι με αποτέλεσμα την ταχύτερη κρυστάλλωση του προϊόντος και
- ✓ μεταφορά ακαθαρσιών στο μέλι από τη συνεχή επαφή του με τα εργαλεία πίεσης των κηρήθρων ή και από τα χέρια του μελισσοκόμου.

2.2.2. Παραλαβή μελιού με φυγοκέντρωση σε οριζόντιο φυγοκεντρικό σύστημα

Η χρήση μελιτοεξαγωγέα με τη φυγοκεντρική κίνηση επιτρέπει τη διατήρηση των κηρηθρών για επαναχρησιμοποίηση ενώ δεν έχει καμία αρνητική επίδραση στο προϊόν. Ακόμα και η χρήση θερμαινόμενων μαχαιριών για τον απολεπισμό, δε βρέθηκε να επηρεάζει το μέλι. Από άποψη λοιπόν ευκολίας, εξοικονόμησης κηρηθρών και καθαρότητας του προϊόντος, η χρήση φυγοκεντρικού μελιτοεξαγωγέα προτιμάται καθώς το μέλι που θα εξαχθεί θα είναι το ίδιο με αυτό που αποθήκευσαν οι μέλισσες στις κηρήθρες.



Σχήμα 2.1. Φυγοκεντρικά (χρήση μελιτοεξαγωγέα). Συνήθη σύστημα παραλαβής μελιού.
Πηγή: t-meli.blogspot.com/2010.

2.3. Μέλι

2.3.1. Κατηγορίες μελιού

Υπάρχουν διάφορες κατηγορίες μελιού όπως μέλι πορτοκαλιάς, μέντας, ακακίας, ευκαλύπτου, καστανιάς, βαμβακιού, ανθόμελα (καλοκαιριού, φθινοπώρου και άνοιξης), πευκόμελο και ελάτης. Οι κυριότερες όμως είναι το πευκόμελο και το μέλι ελάτου, το θυμαρίσιο μέλι και το ανθόμελο. Η συνολική παραγωγή της Ελλάδας σε μέλι είναι 15.600 τόνοι (EU Commission DG AGRI C4-2012, Κ.Μ.ΠΑΣΕΓΕΣ, 2012). Από αυτά το 65-70% είναι πευκόμελο, μέλι το οποίο θεωρητικά δεν κρυσταλλώνει ενώ το υπόλοιπο 30-35% είναι ανθόμελα. Πιο αναλυτικά:

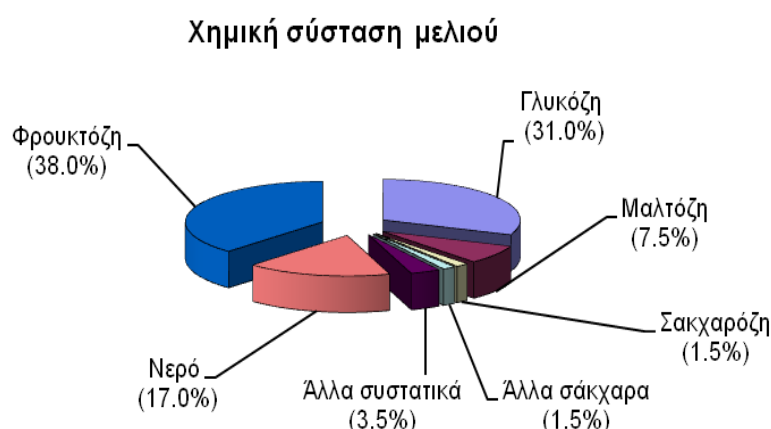
Πίνακας 2.4. Συνοπτικός πίνακας χαρακτηριστικών ελληνικών μελιών.

ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΜΕΛΙΟΥ	ΧΡΩΜΑ	ΓΕΥΣΗ	ΑΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΩΣΗΣ	ΠΕΡΙΟΧΕΣ	ΘΡΕΠΤΙΚΗ ΑΞΙΑ
Πεύκο	Σχετικά σκούρο (αυτό που παράγεται την άνοιξη είναι πιο ανοιχτόχρωμο από το φθινόπωρο)	Ιδιαίτερη, αλλά όχι πολύ γλυκιά, λόγω του χαμηλού ποσοστού σακχάρων	Ιδιαίτερο	1-1.5 χρόνο	Χαλκιδική, Β.Εύβοια, Θάσος, Σποράδες	Υψηλή, λόγω των μετάλλων και των ιχνοστοιχείων που περιέχει
Ελάτης	Τυπικό χρώμα μελιού, ποικίλει ανάλογα με τη περιοχή	Ιδιαίτερα καλή	Ουδέτερο	Δεν κρυσταλλώνει	Όλυμπος, Πίνδος, Μαίναλο, Χελμός, Πάρνηθα	Υψηλή λόγω μεγάλης ποσότητας ιχνοστοιχείων
Καστανιά	Σκούρο καφέ έως μαύρο	Δυνατή, ελαφρώς πικρή και μεταλλική	Έντονο	1-2 χρόνια	Μακεδονία, Άγιο Όρος	Πλούσιο σε ιχνοστοιχεία
Εσπεριδοειδή	Πολύ ανοιχτό κίτρινο	Χαρακτηριστική και συνήθως γλυκιά	Ιδιαίτερο του φυτού από το οποίο προέρχεται	1-3 μήνες	Πελοπόννησος	Μέση θρεπτική αξία, πλούσιο σε σάκχαρα
Θυμαρί	Ιδιαίτερο κεχριμπαρένιο	Ευχάριστη, σε μερικές περιπτώσεις αίσθηση καψίματος λόγω υψηλού ποσοστού φρουκτόζης	Έντονο χαρακτηριστικό	6-18 μήνες	Κυρίως στα Ελληνικά νησιά	Ιδιαίτερες τονωτικές και αντισηπτικές ιδιότητες
Ερείκη	Κοκκινωπό	Χαρακτηριστική και έντονη	Ιδιαίτερο	1-3 μήνες	Σε όλη την Ελλάδα	Υψηλή θρεπτική αξία, απαντάται σε καταστήματα με είδη υγιεινής

						διατροφής
Βαμβάκι	Ανοιχτό κίτρινο έως γλυκιά λευκό		Ουδέτερο	1-3 μήνες	Θεσσαλία	Μέση θρεπτική αξία, πλούσιο σε σάκχαρα
Ηλίανθος	Ανοιχτό κίτρινο	γλυκιά	Όχι έντονο	1-3 μήνες	Μακεδονία	Μέση θρεπτική αξία, πλούσιο σε σάκχαρα

2.3.2. Χημική σύσταση του μελιού

Το μέλι, από χημική άποψη, αποτελεί ένα κορεσμένο διάλυμα σακχάρων συνοδευμένο από ένα πλήθος άλλων χημικών ενώσεων, όπως μέταλλα, ένζυμα, πρωτεΐνες, βιταμίνες, καθώς και συστατικών που συνδέονται με τα οργανοληπτικά του χαρακτηριστικά. Η συμμετοχή των βασικότερων συστατικών στη σύσταση του μελιού περιγράφεται στο **Σχήμα 2.2**.

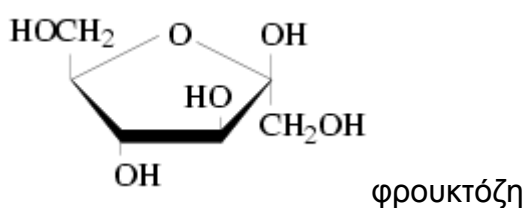


Σχήμα 2.2. Ποσοστιαία συμμετοχή των κυριότερων συστατικών του μελιού.
Πηγή: Τανανάκη Χ.Ι., 2006.

Κάποια από τα συστατικά του μελιού προέρχονται από αέραια μεταφορά από το νέκταρ ή το μελίτωμα, ενώ κάποια άλλα αποτελούν προϊόντα διασπάσεων και συνθέσεων. Το είδος και η ποσότητα των συστατικών αυτών ποικίλει ανάλογα με τη βοτανική προέλευση, τη δύναμη του μελισσιού, τις κλιματολογικές συνθήκες, καθώς και το στάδιο ωρίμανσης του. Η σύσταση του μελιού επηρεάζεται επίσης, από ένα πλήθος άλλων παραμέτρων που σχετίζονται με την επεξεργασία (θέρμανση, διήθηση κλπ.), το δοχείο και τις συνθήκες αποθήκευσης, την παλαιότητα και την έκθεση του στο οξυγόνο. Ειδικότερα το μέλι αποτελείται από:

Υδατάνθρακες – Σάκχαρα. Έχουν ταυτοποιηθεί 15 διαφορετικά σάκχαρα, τα οποία όμως δε συνυπάρχουν όλα σε ένα είδος μελιού. Οι υδατάνθρακες με κυρίαρχους τη φρουκτόζη και τη γλυκόζη αποτελούν περίπου το 70% της μάζας του μελιού. Ακολουθούν οι δισακχαρίτες μαλτόζη και σακχαρόζη σε ποσοστά της τάξης του 7.5% και 1.5% αντίστοιχα (Dong H. et al., 2018). Κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης η

σακχαρόζη διασπάται στις δομικές της μονάδες με τη βοήθεια του ενζύμου ινβερτάση. Τα σάκχαρα αποτελούν κριτήριο ελέγχου της φυσικότητας του μελιού καθώς σύμφωνα με την οδηγία 110/2001/Ε.Ε. τα μέλια νέκταρος θα πρέπει να έχουν περιεκτικότητα σε άθροισμα γλυκόζης και φρουκτόζης μεγαλύτερη από 60% ενώ τα μέλια μελιτώματος μεγαλύτερη από 45%. Μοναδική εξαίρεση για το ελληνικό μέλι, αποτελεί το μέλι τύπου έλατου Βυτίνας, στο οποίο το άθροισμα των απλών σακχάρων μπορεί να είναι κάτω από 40% (Απόφαση 313049 ΦΕΚ Β' 16/14-1-1994). Στο μέλι έχουν ταυτοποιηθεί και άλλοι δισακχαρίτες, όπως η μαλτόζη, ισομαλτόζη, τρεχαλόζη, τυρανόζη, όπως επίσης και τρισακχαρίτες (μελεζιτόζη, ραφινόζη και ερλόζη)(Ruoff K. et al., 2005). Σε ορισμένες περιπτώσεις τα ανώτερα σάκχαρα, όπως η ερλόζη χρησιμοποιήθηκαν για την διαπίστωση της μελιτώδους προέλευσης του μελιού (Astwood K. et al., 1998).



Η συγκέντρωση των σακχάρων συνδέεται άμεσα με το φαινόμενο της κρυστάλλωσης, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την στερεοποίηση του μελιού. Υψηλό ποσοστό σακχάρων σε συνδυασμό με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό αυξάνουν την ταχύτητα κρυστάλλωσης. Η κρυστάλλωση εκτός από το ότι είναι γενικά ανεπιθύμητη από τους καταναλωτές, καθώς καθιστά δυσκολόχρηστο το μέλι, δημιουργεί και πρόβλημα στην περίπτωση ανομοιόμορφης εμφάνισης της. Το ρευστό τμήμα του μελιού που απομένει, με μικρή συγκέντρωση σε σάκχαρα και υψηλό ποσοστό υγρασίας, ευνοεί την ανάπτυξη ζυμώσεων με αποτέλεσμα το ξίνισμα του μελιού.

Νερό. Η περιεκτικότητα του μελιού σε νερό εκφράζεται με τον όρο υγρασία και το ποσοστό της στο μέλι εξαρτάται πρωτίστως από το βαθμό ωρίμανσης του και δευτερευόντως από το είδος του μελιού και τις κλιματολογικές συνθήκες. Σύμφωνα με την ισχύουσα νομοθεσία το μέλι θα πρέπει να έχει υγρασία μικρότερη του 20%

με μοναδική εξαίρεση το ερεικόμελο για το οποίο επιτρέπεται υγρασία μέχρι και 23%. Η ύπαρξη υψηλού ποσοστού υγρασίας συνδέεται με τις ζυμώσεις και επομένως με το χρόνο και τη θερμοκρασία διατήρησης του. Μέλια με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό, είναι παχύρρευστα και απαιτούν επιπρόσθετους χειρισμούς κατά το στάδιο της εξαγωγής και τυποποίησης τους.

Οργανικά οξέα. Το μέλι αποτελεί ένα όξινο διάλυμα με pH από 3.5 έως 4.5. Η μη όξινη γεύση του οφείλεται στη μεγάλη συγκέντρωση των σακχάρων, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την επισκίαση της ξινής γεύσης από τη γλυκιά. Το όξινο περιβάλλον έχει ως αποτέλεσμα την οξείδωση της γλυκόζης σε γλυκονικό οξύ. Έχουν επίσης εντοπιστεί στο μέλι και άλλα οξέα όπως το μηλικό, κιτρικό, ηλεκτρικό, γαλακτικό, οξαλικό και φουμαρικό σε συγκεντρώσεις από 0.26 mg Kg⁻¹ έως και 298.48 mg Kg⁻¹ (Bouhlali E.T. et al., 2019). Σε δείγματα μελιού έχουν προσδιοριστεί και 7 φαινολικά οξέα, μεταξύ των οποίων το βενζοϊκό και σαλικυλικό (Zhihong S. et al., 2019). Η κατηγορία αυτών των χημικών ενώσεων σχετίζεται με τη γεύση και την αντιβακτηριδιακή δράση του μελιού.

Πρωτεΐνες και ελεύθερα αμινοξέα. Τόσο οι πρωτεΐνες όσο και οι ελεύθερες δομικές τους μονάδες, μπορεί να προέρχονται από τα φυτά αλλά και την ίδια τη μέλισσα. Το ποσοστό των πρωτεϊνών στο μέλι είναι μικρό και η ύπαρξη τους συνδέεται με το ιζώδες του μελιού. Μεταξύ των 23 αμινοξέων που ανιχνεύτηκαν, σε υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν η προλίνη και η φαινυλαλανίνη (Truzzi C. et al., 2014). Σε ανάλογη έρευνα ανιχνεύτηκαν 18 ελεύθερων αμινοξέων σε δείγματα γύρης από πέντε φυτικές πηγές στην Σαουδική Αραβία (El-Kazafy A.T. et al., 2019). Κατά το παρελθόν, αμινοξέα όπως η προλίνη, χρησιμοποιήθηκαν για τον εντοπισμό της νοθείας (Czipa N. et al., 2012).

5-υδροξυμεθυλο-2-φουρφουράλη (HMF). Η χημική αυτή ένωση υπάρχει σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0-15 mg Kg⁻¹) στο φρέσκο μέλι. Παράγεται όμως από τα σάκχαρα, παρουσία αμινοξέων, κατά τη διάρκεια της θέρμανσης ή της παλαίωσης και χρησιμοποιείται ως κριτήριο ποιοτικού ελέγχου του μελιού (Shalpa U.M. et al., 2018). Αποδεκτά είναι τα μέλια με συγκέντρωση σε HMF μικρότερη από 51.7 mg Kg⁻¹ (Tomasini D. et al., 2012).

Ένζυμα. Στο μέλι περιέχονται ένζυμα, τόσο από το φυτό, όσο και από την ίδια τη μέλισσα. Στην ινβερτάση οφείλεται η ύπαρξη στο μέλι περισσότερων απλών σακχάρων, συγκριτικά με τον αρχικό φυτικό χυμό. Η ινβερτάση καταλύει τη διάσπαση του δισακχαρίτη σακχαρόζη στις δομικές του μονάδες γλυκόζη και φρουκτόζη. Το ένζυμο αυτό παράγεται στους υποφαρυγγικούς αδένες της μέλισσας και προστίθεται στο μέλι κατά το στάδιο της συλλογής και της ωρίμανσης. Λόγω του ότι πηγή προέλευσης του είναι το ίδιο το έντομο, οι συγκεντρώσεις του αυξάνονται με τη μείωση της ταχύτητας συλλογής του φυτικού χυμού, καθώς τότε οι μέλισσες έχουν την ευκαιρία να προσθέσουν μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμου. Στο μέλι υπάρχει επίσης το ένζυμο διασάση, το οποίο διασπά τον πολυσακχαρίτη άμυλο. Αν και ο λόγος ύπαρξης του στο μέλι δεν έχει διευκρινιστεί, εντούτοις το ένζυμο αυτό χρησιμοποιείται ως ποιοτικό κριτήριο. Όπως έχει αναφερθεί, στο όξινο περιβάλλον η γλυκόζη οξειδώνεται προς γλυκονικό οξύ με σύγχρονη παραγωγή υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η οξείδωση αυτή καταλύεται από το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης. Σε αυτή ακριβώς την αντίδραση οφείλεται η αντιβακτηριδιακή δράση του μελιού, η οποία σε μεγάλο βαθμό αποδίδεται στο υπεροξειδίου του υδρογόνου. Αρνητικά προς την κατεύθυνση αυτή επιδρά η περιεχόμενη στο μέλι καταλάση, η οποία διασπά το υπεροξειδίου του υδρογόνου σε νερό και οξυγόνο.

Ανόργανα συστατικά. Η περιεκτικότητα του μελιού σε ανόργανα συστατικά εξαρτάται από τη βοτανική του προέλευση, τη σύσταση του εδάφους ανάπτυξης του φυτού, αλλά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες. Είκοσι τέσσερα συνολικά μεταλλικά στοιχεία (Al, As, Bo, Co, Cr, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Pb, S, Se, Si, Sr, Zn, Ca, Cd, Ni, Mo, V) ανιχνεύτηκαν σε ισπανικό θυμαρόμελο, έντεκα από τα οποία σε όλα τα δείγματα (Terrab A. et al., 2004a). Δεκατρία από τα παραπάνω στοιχεία εντοπίστηκαν επίσης, από άλλους ερευνητές, σε 71 δείγματα μελιού στην Τουρκία, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από $<1 \mu\text{g Kg}^{-1}$ έως 268 mg Kg^{-1} (η συγκέντρωση αυτή ανήκει στο K) (Altun S.K. et al., 2017).

Συστατικά που σχετίζονται με το χρώμα. Το χρώμα του μελιού ποικίλλει από σχεδόν άσπρο (π.χ. ακακίας) έως σκούρο καφέ (π.χ. βελανιδιάς). Κυρίαρχος παράγοντας για τον καθορισμό του χρώματος είναι η βοτανική προέλευση, καθώς διάφορες χρωστικές μεταφέρονται από το φυτό στο μέλι. Επίσης, σημαντικά

επιδρούν οι μελισσοκομικοί χειρισμοί και ιδιαίτερα η παλαιότητα των κηρηθρών. Προς σκούρες αποχρώσεις οδηγείται επίσης το μέλι κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και κυρίως όταν αυτό εκτίθεται στο φως και στο οξυγόνο.

Συστατικά που σχετίζονται με το άρωμα. Είναι χαρακτηριστικό ότι το κάθε είδος μελιού έχει και το δικό του άρωμα. Το οργανοληπτικό αυτό χαρακτηριστικό συνδέεται με πτητικά και ημιπτητικά συστατικά, των οποίων η χημική δομή ποικίλλει από απλή έως πολύ πολύπλοκη. Τα συστατικά αυτά μπορεί να είναι αλκοόλες, αλδεΐδες, κετόνες, εστέρες, υδρογονάνθρακες και ετεροκυκλικές ενώσεις. Υπάρχουν μέλια με έντονο, αλλά με βαρύ και άλλα με απλώς αισθητό άρωμα. Τα συσχετιζόμενα με το άρωμα συστατικά, προέρχονται είτε απευθείας από το φυτό, είτε είναι προϊόντα διασπάσεων και συνθέσεων κατά τη διάρκεια συλλογής και ωρίμανσης. Λόγω της άμεσης συσχέτισης τους με τη φυτική πηγή, αυτά χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό της βοτανικής προέλευσης του μελιού.

Λιπίδια. Στο μέλι έχουν βρεθεί ελεύθερα λιπαρά οξέα, όπως το στεατικό και παλμιτικό οξύ, τριγλυκερίδια καθώς επίσης και στεροειδείς αλκοόλες με τη μορφή της ελεύθερης χοληστερόλης και των εστέρων της. Έχουν επίσης εντοπιστεί αμφίφιλα λιπίδια όπως φωσφολιπίδια.

Βιταμίνες. Το μέλι χαρακτηρίζεται γενικά ως φτωχό σε βιταμίνες. Σε αυτό έχουν εντοπιστεί κυρίως υδατοδιαλυτές βιταμίνες τους συμπλέγματος Β, όπως θειαμίνη (B₁), ριβοφλαβίνη (B₂), πυριδοξίνη (B₆), βιοτίνη, παντοθενικό, νικοτινικό και φολικό οξύ. Η ύπαρξη τους αποδίδεται στο φυτικό χυμό από τον οποίο έχει παραχθεί το μέλι.

Μικροσκοπικά χαρακτηριστικά. Στο μέλι περιέχονται επίσης γυρεόκοκκοι μύκητες, καπνιές, ζύμες και βακτήρια. Οι γυρεόκοκκοι προέρχονται από τη γύρη που συλλέγουν οι μέλισσες ως τροφή, ή από κόκκους που επικάθονται στα τριχίδια τους κατά τη συλλογή του νέκταρος και στη συνέχεια διά επαφής μεταφέρονται στο μέλι. Τα υπόλοιπα μικροσκοπικά χαρακτηριστικά μπορεί να οφείλονται στο φυτό, στη μέλισσα, αλλά και στον μελισσοκόμο. Η παρουσία των μικροοργανισμών στο μέλι δεν επηρεάζει γενικά την ποιότητα του, εκτός και αν κάποια από τα χαρακτηριστικά

του μελιού (υγρασία, οξυγόνο και pH) μεταβληθούν, οπότε και ενεργοποιείται η δράση τους με αποτέλεσμα την υποβάθμιση του τροφίμου.

Α.ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 3

Χρήση των γεωργικών φαρμάκων στην παραγωγή του μελιού

3.1. Οι ασθένειες των μελισσών

Οι μέλισσες ως ζωντανοί οργανισμοί ασθενούν. Καθώς λοιπόν η μελισσοκομία αποτελεί έναν ολοένα αναπτυσσόμενο κλάδο της αγροτικής παραγωγής παρουσιάζεται επιτακτική η ανάγκη της γνώσης, πρόληψης και αντιμετώπισης των ασθενειών που ταλαιπωρούν τα μελίσσια. Οι ασθένειες αυτές οι οποίες αναφέρονται στη συνέχεια προκαλούνται από βακτήρια, μύκητες, ιούς και ακάρεα.

3.1.1. Βαρροϊκή Ακαρίαση (*Varroa destructor*)

Το άκαρι βαρρόα (*Varroa destructor* Anderson & Trueman) μεταπήδησε στην κοινή μέλισσα από την ασιατική μέλισσα *Apis cerana* Fabr. Στην Ελλάδα πρωτοεμφανίστηκε το 1978. Η Βαρρόα πολλαπλασιάζεται αποκλειστικά στα κελιά του γόνου. Προσβάλλει τις μέλισσες όλες τις εποχές. Η βαρρόα μεταφέρεται από μελίσι σε μελίσι με τη λεηλασία και την παραπλάνηση. Μεταφορά γόνου ή μελισσών από μελίσι σε μελίσι, αγοραπωλησίες μελισσιών, συνάθροιση κυψελών σε περιορισμένο χώρο, συμβάλλουν σημαντικά στη διάδοση της αρρώστιας. Παράγοντες που ευνοούν την ασθένεια είναι όλοι εκείνοι που επηρεάζουν την έκταση του γόνου, καθώς και ο αριθμός των κηφηνοκελιών. Το άκαρι είναι ορατό με γυμνό μάτι. Άλλα συμπτώματα εκτός της οπτικής παρατήρησης του ακάρεος μπορεί να είναι: α) μέλισσες παραμορφωμένες που φαίνονται μικρές στο μέγεθος, με τσαλακωμένα ή χωρίς φτερά και με ασύμμετρα πόδια, β) γόνος διάσπαρτος, γ) σάπιος γόνος λόγω ιώσεων που μεταδίδει η βαρρόα. Για την αντιμετώπιση της βαρρόα χρησιμοποιούνται τόσο χημικά ή φυτικά σκευάσματα αλλά και βιοτεχνικές μέθοδοι, όπως, η αφαίρεση του κηφηνόγονου, ο περιορισμός της ωοτοκίας της βασίλισσας και οι υψηλές θερμοκρασίες (Θρασυβούλου Α., 1998).

Πίνακας 3.1. Γεωργικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση της Βαρροϊκής ακαρίωσης.

Σκευάσματα και δραστικές ουσίες που συνίστανται από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων^{1,2}

Οργανοφωσφορικές : Coumaphos (Perizin, Check-Mite)

Πυρεθροειδείς : Tau-Fluvalinate (Apistan)

Σκευάσματα και δραστικές ουσίες που συνίστανται σύμφωνα με διάφορες γεωπονικές πρακτικές^{1,2}

Φορμαμιδίνες : Amitraz (Apivar³, Apiwarol⁴, Biowar⁴, Varataz⁵, Varachet forte⁵, Varietol fum⁶, Varidol AEP⁶)

Οργανοαλογονωμένοι : Bromopropylate (Folbex VA⁷)

Οργανοφωσφορικές : Coumaphos (Asuntol⁸)

Πυρεθροειδείς : Tau-Fluvalinate (Gabon PF 90⁹, Mavrirol¹⁰, Varachet-forte¹¹)

Τρόπος εφαρμογής :

- ✓ Amitraz : Σπρέι (Spray), αερολύματα (aerosol), ταινίες
 - ✓ Bromopropylate : Υποκαπνιστικές ταινίες
 - ✓ Coumaphos : Σιρόπι, ψεκασμός, ταινίες
 - ✓ Tau-Fluvalinate : Ταινίες, εναιώρημα, λάδι σε υδατικό διάλυμα, σιρόπι.
-

¹ <http://www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/animal-production/bees-honey/2346-asthenies-melisson>

² <http://www.ellinikomeli.gr/melissokomos/enemies-diseases/257-full-list-of-medicines>

³ Εγκεκριμένο σκεύασμα στη Γαλλία, την Ιταλία, την Πορτογαλία και την Ισπανία.

⁴ Εγκεκριμένα σκευάσματα στην Πολωνία.

⁵ Εγκεκριμένα σκευάσματα στη Ρουμανία. Το Varachet forte εκτός από amitraz περιέχει και tau-fluvalinate.

⁶ Εγκεκριμένα σκευάσματα στη Σλοβακία.

⁷ Εγκεκριμένα σκευάσματα στην Ελβετία.

⁸ Δεν αποτελεί εγκεκριμένο σκεύασμα σε κάποια χώρα της Ε.Ε.. Συγκεκριμένα στην Πορτογαλία υπάρχουν αναφορές για εκτεταμένη παράνομη χρήση.

⁹ Εγκεκριμένο σκεύασμα στην Τσεχία και τη Σλοβακία.

¹⁰ Εγκεκριμένο σκεύασμα στη Ρουμανία.

¹¹ Εγκεκριμένο σκεύασμα στη Ρουμανία. Εκτός από το tau-fluvalinate περιέχει και amitraz.

3.1.2. Αμερικάνικη σηψιγονία (Α.Σ.Γ.)

Η Αμερικάνικη σηψιγονία ή Α.Σ.Γ. είναι με διαφορά η πιο παθογόνος γνωστή ασθένεια στις μέλισσες. Η ασθένεια προκαλείται από το βακτήριο, *Raenibacillus larvae*. Προσβάλλει τις γηραιότερες προνύμφες και τις νεαρές νύμφες, που κυριολεκτικά υφίσταται πέψη από ένζυμα που εκκρίνονται από βακτήρια (von der

Ohe W., 2003). Προσβάλλει με φθίνουσα ένταση τις προνύμφες των βασιλισσών, των εργατριών και των κηφήνων.

Τα συμπτώματα της ασθένειας είναι: α) αλλοίωση του χρώματος της κηρήθρας σε βαθύ καφέ, διάσπαρτος γόνος, βύθιση των καλυμμάτων του σφραγισμένου γόνου και δημιουργία μικρής οπής σε ορισμένα απ' αυτά, β) σάπισμα της προνύμφης στα σφραγισμένα κελιά και σχηματισμός κολλώδους ελαστικής ίνας κατά το τράβηγμα, με χαρακτηριστική δυσάρεστη οσμή, μεταβολή της στη συνέχεια σε λέπι που δεν απομακρύνεται εύκολα από τις μέλισσες και γ) νεκρές προνύμφες με σχηματισμένα τα στοματικά τους μόρια και την προβοσκίδα χαρακτηριστικά προσκολλημένη στην πάνω εσωτερική επιφάνεια του κελιού.

Επειδή τα σπόρια είναι ιδιαίτερα ανθεκτικά και μπορούν να επιβιώσουν για πολλά χρόνια, σε πολλές χώρες μεταξύ αυτών και στην Ελλάδα, επιβάλλεται να καίγονται προσβεβλημένες με Α.Σ.Γ. κηρήθρες αμέσως μετά τη διάγνωση. Σε άλλες χώρες (Η.Π.Α., Καναδά), επιτρέπεται η χρήση αντιβιοτικών έτσι ώστε η ασθένεια να είναι ελεγχόμενη (von der Ohe W., 2003). Το γεγονός ότι οι προνύμφες είναι ευάλωτες από το βακτήριο μόνο για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα της ζωής τους, περιορίζει τη συχνότητα μόλυνσης νέων ατόμων. Ο περισσότερο συντελεστικός παράγοντας για την εξάπλωση της Α.Σ.Γ. μέσα στο μελισσοκομείο είναι ο ίδιος ο μελισσοκόμος. Τα σπόρια μεταφέρονται με μολυσμένα εφόδια, με κηρήθρες άρρωστου γόνου, με πρόκληση λεηλασίας και με ανεπαρκή μέτρα για περιορισμό της παραπλάνησης. Η Α.Σ.Γ. μπορεί να εμφανιστεί σε οποιαδήποτε εποχή του έτους, αρκεί να υπάρχει γόνος στο μελίσσι. Φαίνεται ωστόσο ότι η πάθηση εκδηλώνεται πιο συχνά προς το τέλος του θέρους (Otten C., 1991). Η πλήρης διατροφή του περιορισμένου τότε γόνου βοηθά τις μολυσμένες προνύμφες να αντέξουν περισσότερο, έτσι το βακτήριο προλαβαίνει να σπορογονήσει και να τις εξοντώσει αργότερα, όταν θα έχουν πλέον σφραγιστεί τα κελιά (Υφαντίδης Μ., 1995).

Τα αντιβιοτικά μπορούν να περιορίσουν και όχι να εξαλείψουν την ασθένεια και γι' αυτό το λόγο στις μολυσμένες κυψέλες πρέπει να χορηγούνται συστηματικά, έτσι ώστε να αποφευχθεί ένα ξέσπασμα της Αμερικάνικης σηψιγονίας. Αν δεν αντιμετωπιστεί έγκαιρα, η ασθένεια μπορεί να αφανίσει τον πληθυσμό της κυψέλης ή ακόμη και να αποδεκατίσει ένα μελισσοκομείο. Αν η μόλυνση είναι μέτρια, χωρίς κλινικά συμπτώματα, η θεραπεία που συστήνεται είναι το τίναγμα του σμήνους και

η αλλαγή των προσβεβλημένων κηρηθρών προκειμένου να διασωθεί τουλάχιστον ο ενήλικος πληθυσμός (von der Ohe W., 2003).

3.1.3. Ευρωπαϊκή σηψιγονία (Ε.Σ.Γ.)

Η Ευρωπαϊκή σηψιγονία ή Ε.Σ.Γ., είναι στενά συνδεδεμένη με την Α.Σ.Γ., συμπτωματολογικά, με τη διαφορά ότι για την πρώτη ο υπαίτιος οργανισμός, το βακτήριο *Melissococcus plutonius*, δε σχηματίζει σπόρια και έτσι η ασθένεια θεωρείται λιγότερο προβληματική από την Α.Σ.Γ. Γενικά, το βακτήριο προσβάλλει μόνο τις νεαρότερες προνύμφες (Reybroeck W., 2010). Ευάλωτες είναι οι προνύμφες ηλικίας έως 24 ή το πολύ 48 ωρών.

Η αντιμετώπιση της Ε.Σ.Γ. είναι λιγότερο δραστική σε σχέση με αυτή της Α.Σ.Γ.. Μόνο σε οξείες περιπτώσεις, χρειάζονται δραστικά μέτρα όπως το κάψιμο των μελισσιών (Reybroeck W., 2010). Χημικά μέσα που έχουν εφαρμοστεί για την αντιμετώπισή της είναι το σκεύασμα Arimycin με δραστική ουσία την ερυθρομυκίνη, καθώς και η τεραμυκίνη και το Oxynet 5% με δραστική ουσία την oxytetracycline. Άλλα αντιβιοτικά που δοκιμάστηκαν εναντίον της Ευρωπαϊκής σηψιγονίας και είχαν περιορισμένη αποτελεσματικότητα είναι η penicillin, η streptomycin, η septilline, η chloramphenicol, η neomycin και η karpomycin (Θρασυβούλου Α., 1998 και 2009).

3.1.4. Νοσεμίαση

Η ασθένεια αυτή οφείλεται στους δύο μύκητες *Nosema apis* και *Nosema ceranae*. Ο μύκητας *N. ceranae* απομονώθηκε αρχικά από την *Apis ceranae* κοντά στο Πεκίνο. Ο φυσικός του ξενιστής είναι μάλλον η ανατολική μέλισσα και η φυσική του κατανομή είναι η Ασία (Paxton R.J., 2010). Οι Invernizzi C. et al., (2009) αναφέρουν την απομόνωσή του πριν το 1990 στην Ουρουγουάη από τη μέλισσα *Apis mellifera*.

Η πρώτη φυλογενετική ανάλυση της *Nosema ceranae* που βασίστηκε στην ανάλυση της μικρής υποομάδας του ριβοσωμικού RNA 16S, έδειξε ότι η *Nosema apis* δεν ήταν κοντά φυλογενετικά με τη *N. ceranae* όπως θα περίμενε κανείς (Fries

I. et al., 1996). Κατοπινές αναλύσεις βασισμένες στο ίδιο γονιδίωμα είχαν αντικρουόμενα αποτελέσματα. Αναλύσεις έδειξαν ότι ο μύκητας *N. ceranae* ήταν κοντινότερος συγγενικά με το *N. bombi* από ότι με το *N. apis* (Fries I. et al., 2001)(Chen Y.P. et al., 2009), αν και η ανάλυση των Slamovits C.H. et al., (2004) τον κατέταξε πιο κοντά στο *N. apis* (Fries I., 2010).

3.1.5. Χρόνια παράλυση

Οφείλεται στον ιό της χρόνιας παράλυσης. Οι μέλισσες μολύνονται κυρίως με την τροφή τους. Παρατηρείται σε οποιαδήποτε εποχή, περισσότερο όμως την άνοιξη. Η ασθένεια ευνοείται από τη μεγάλη προσβολή από τη βαρρόα, τη στενότητα του χώρου και γενικά την εξασθένηση των μελισσιών. Εκδηλώνεται με δύο μορφές. Στην πρώτη, οι μέλισσες αδυνατούν να πετάξουν και σέρνονται μπροστά στην κυψέλη, κουβαριάζονται στα χόρτα, στο εσωτερικό καπάκι ή κάτω από τα πλαίσια. Παρατηρείται τρεμούλιασμα των φτερών τους και παράλυση των πίσω φτερών. Η κοιλιά τους είναι διογκωμένη και παρατηρείται δυσεντερία. Στη δεύτερη, οι μέλισσες χάνουν το τρίχωμά τους και γίνονται μαύρες και γυαλιστερές. Οι προσβεβλημένες φαίνονται μικρότερες και δέχονται επιθέσεις από τις υγιείς, μπορούν, όμως, να πετάνε. Ο μελισσοκόμος, βοηθά το μελίσι να αντιμετωπίσει την ασθένεια, με τα εξής μέτρα: α) τροφοδότηση με σιρόπι, β) επιλογή ανθεκτικών μελισσιών, γ) τροφοδότηση με θειικό χαλκό 2% σε σιρόπι (Θρασυβούλου Α., 1998 και 2009).

3.2. Υπολείμματα στο μέλι από σκευάσματα που χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση εχθρών και ασθενειών

Η χρήση συντιθέμενων ουσιών για την προστασία της παραγωγής και του ζωικού κεφαλαίου αποτελεί την απλούστερη και αποτελεσματικότερη επιλογή για τον μελισσοκόμο στην προσπάθειά του να καταπολεμήσει το ακάρι *Varroa*. Στην Ελλάδα έχουν χρησιμοποιηθεί τα ακαρεοκτόνα amitraz, cymiazole, bromopropylate, tau-fluvalinate, flumethrin, coumaphos και malathion. Εγκεκριμένα σκευάσματα για τη μελισσοκομία στην Ελλάδα είναι το Apistan με δραστική ουσία το tau-

fluvalinate, το Perizin και το CheckMite+ με δραστική ουσία το coumaphos και το Bayvarol με δραστική ουσία το flumethrin. Επίσης, στα εγκεκριμένα σκευάσματα ανήκουν το Ariguard και το Thymovar με δραστική ουσία το τερπενοειδές θυμόλη. Στον **Πίνακα 3.2.** παρατίθενται τα ονόματα των εμπορικών σκευασμάτων που κυκλοφόρησαν στην Ελλάδα, καθώς επίσης και η εταιρεία παραγωγής και η ύπαρξη ή μη έγκρισης για τη μελισσοκομία. Στον **Πίνακα 3.3.** παρατίθενται οι μοριακοί τύποι και η ονοματολογία, σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC), των δραστικών ουσιών που περιέχονται στα σκευάσματα του **Πίνακα 3.2.**

Πίνακας 3.2. Δραστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο εχθρών και ασθενειών των μελισσών και η ύπαρξη έγκρισης για μελισσοκομική χρήση στην Ελλάδα.

Εχθρός ή ασθένεια	Δραστική ουσία	Σκεύασμα	Έγκριση στη Μελισσοκομία*
Βαρρόα	Amitraz	Tactic	Όχι
	Bromopropylate	Folbex-VA	Όχι
	Coumaphos	Perizin, Check mite	Ναι
	Flumethrin	Bayvarol	Ναι
	Malathion	Malathion	Όχι
	Tau-fluvalinate	Apistan	Ναι
Αμερικανική Σηψιγονία	Oxytetracycline	Terramycin, Oxyvet	Όχι
Νοσεμίαση	Fumagillin	Fumidil B	Όχι

* Σύμφωνα με τις εγκρίσεις του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.

Πίνακας 3.3. Μοριακός Τύπος και ονοματολογία κατά IUPAC των δραστικών ουσιών που χρησιμοποιούνται στη μελισσοκομία.

Δραστική ουσία	Μοριακός Τύπος	Ονομασία κατά IUPAC
Amitraz	$C_{19}H_{23}N_3$	N-methylbis(2,4-xylyliminomethyl)amine
Bromopropylate	$C_{17}H_{16}Br_2O_3$	isopropyl 4,4'-dibromobenzilate
Coumaphos	$C_{14}H_{16}ClO_5PS$	3-chloro-4-methyl-2-oxo-2H-chromen-7-yl O,O-diethyl phosphorothioate ή 3-chloro-7-diethoxyphosphinithioxyloxy-4-methylcoumarin
Flumethrin	$C_{28}H_{22}Cl_2FNO_3$	α-cyano-4-fluoro-3-phenoxybenzyl 3-[β,4-dichlorostyryl]-2,2-dimethylcyclopropanecarboxylate
Malathion	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	Diethyl (dimethoxyphosphinothioylthio)succinate ή S-1,2-bis(ethoxycarbonyl)ethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate
Tau-fluvalinate	$C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$	(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl N-(2-chloro-α,α,α-trifluoro-p-tolyl)-D-valinate

3.3. Ισχύουσα νομοθεσία για τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στο μέλι

Όταν ξέσπασε Ευρωπαϊκός συναγερμός σχετικά με την παρουσία αντιβιοτικών στο Κινέζικο μέλι, ήταν φανερό ότι δε θα ήταν εύκολο να καθησυχαστούν οι καταναλωτές. Έγινε λοιπόν απαραίτητη η δυνατότητα πιστοποίησης από την Ευρωπαϊκή αγορά μελιού. Να είναι δηλαδή απαλλαγμένο, όσον αφορά την παρουσία υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και αντιβιοτικών.

Σύμφωνα με τους Piro R., Mutinelli F., (2003), η Ευρωπαϊκή Ένωση για να λύσει το πρόβλημα, ήταν απαραίτητο να έρθει αντιμέτωπη με κάποιες αποφάσεις για επιτρεπτά όρια, ερχόμενη όμως σε αντιπαράθεση με διάφορες οπτικές αντικρουόμενων συμφερόντων. Τέτοιες είναι: η κοινή γνώμη, οι σύνδεσμοι καταναλωτών, οι παραγωγοί και οι συσκευαστές. Δυστυχώς όμως εφαρμόζονται

ακόμη φυτοπροστατευτικά προϊόντα και αντιβιοτικά, τα οποία είναι επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον της μέλισσας.

Όπως είναι φυσικό η χρήση αντιβιοτικών στη μελισσοκομία είναι παράνομη και στην Ελλάδα. Η νομοθεσία δεν επιτρέπει υπολείμματα αντιβιοτικών στο μέλι, σε αντίθεση με πολλά ξένα κράτη. Η Ευρωπαϊκή ένωση (Ε.Ε.) με τους κανονισμούς 2377/90 και 37/2010 σχετικά με φαρμακολογικές δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, απαγόρευσε τη χρησιμοποίηση θεραπευτικών σκευασμάτων σε παραγωγικά ζώα όταν δεν έχουν καθοριστεί ανεκτές ποσότητες υπολειμμάτων (MRLs) στα προϊόντα που παράγονται, εκτός αν οι συγκεκριμένες ουσίες αναφέρονται στον κανονισμό ως ακίνδυνες. Για να προστατεύεται η δημόσια υγεία, οι φαρμακολογικές δραστικές ουσίες με βάση την επιστημονική αξιολόγηση της ασφάλειας των εν λόγω ουσιών ταξινομήθηκαν σε τέσσερα παραρτήματα του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90, για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανωτάτων ορίων υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Στο παράρτημα I περιλαμβάνονται ουσίες για τις οποίες έχουν καθοριστεί ανώτατα όρια υπολειμμάτων, στο παράρτημα II περιλαμβάνονται ουσίες για τις οποίες δεν είναι αναγκαίο να καθοριστεί κανένα ανώτατο όριο υπολειμμάτων, στο παράρτημα III περιλαμβάνονται ουσίες για τις οποίες έχουν καθοριστεί προσωρινά όρια υπολειμμάτων και στο παράρτημα IV περιλαμβάνονται ουσίες για τις οποίες δεν καθορίζεται κανένα ανώτατο όριο λόγω του ότι τα υπολείμματα των εν λόγω ουσιών, συνιστούν κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (κανονισμός Ε.Ε. αριθ. 37/2010, Επίσημη Εφημερίδα της Ε.Ε.).

Τα φυτοφάρμακα και αντιβιοτικά amitraz και coumaphos έχουν έγκριση στην Ελλάδα με ανώτατα επιτρεπτά όρια $0.2, 0.1\text{mg kg}^{-1}$, ενώ για το bromopropylate και tau-fluvalinate δεν απαιτούνται ανώτατα επιτρεπτά όρια (σύμφωνα με το Council regulation No 37/2010/EEC). Το tau-fluvalinate δεν αναφέρετε στον κανονισμό της Ε.Ε. 37/2010. Δεν έχει ορισθεί MRLs διότι ο σοβαρότερος λόγος ήταν το γεγονός ότι δεν μπορούσε να καθιερωθεί ανεκτή ημερήσια πρόσληψη, εφόσον δεν υπήρχαν αρκετά στοιχεία για τοξικότητα επαναλαμβανόμενης δόσης, αναπαραγωγικής τοξικότητας ή τερατογένεσης/εμβρυοτοξικότητας και δεν μπορούσαν να εξαχθούν

συμπεράσματα πιθανής γενοτοξικότητας ή καρκινογόνου δράσης των δραστικών αυτών ουσιών. Στις Η.Π.Α. το 2003 εγκρίθηκαν ανώτατα επιτρεπτά όρια για τα amitraz, coumaphos και tau-fluvalinate 1, 0.1, 0.05 mg kg⁻¹(σύμφωνα με το Food and Drug Administration of the United States. Pesticides tolerances (<http://www.cfsan.fda.gov> 2003).

Πίνακας 3.4. Κατηγορίες τοξικότητας και τα μέγιστα όρια υπολειμμάτων σε συχνά χρησιμοποιούμενες ουσίες για τον έλεγχο των ασθενειών των μελισσών σύμφωνα με τον κανονισμό 37/2010 της Ε.Ε. (σε αντικατάσταση του Κ. 2377/1990 της Ε.Ε.) και την εσωτερική νομοθεσία διαφόρων χωρών.

Δραστική ουσία	Κατηγορία Τοξικότητας	MRLs στο μέλι (mg kg ⁻¹)						
		Ελλάδα ^a	Ε.Ε. ^a	Η.Π.Α. ^b	Γερμανία ^c	Ελβετία ^c	Ιταλία ^c	Ολλανδία ^c
Amitraz	III	0.2	0.2	1	0.01	0.01	0.01	0.02
Bromopropylate	II	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	1	1	0.01	Δ.Α.
Coumaphos	II	0.1	0.1	0.1	Δ.Α.	0.01	Δ.Α.	0.05
Cymiazole		Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	0.01	Δ.Α.	0.01	Δ.Α.
Fipronil	II	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.
Flumethrin		Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	0.01	0.05	0.01	Δ.Κ.
Malathion	I	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	Δ.Κ.
Tau-fluvalinate	II	Δ.Κ.	Δ.Κ.	0.05	0.01	Δ.Κ.	0.01	0.05
Θυμόλη		Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	0.8	Δ.Κ.	Δ.Κ.
Γαλακτικό οξύ		Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Α.	40*	Δ.Α.	Δ.Α.
Μυρμηγκικό οξύ		Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	40*	Δ.Κ.	Δ.Κ.

Οξαλικό οξύ	Δ.Α.	Δ.Α.	Δ.Κ.	Δ.Κ.	40*	Δ.Κ.	Δ.Κ.
-------------	------	------	------	------	-----	------	------

^a :Σύμφωνα με το Council regulation No 37/2010/EEC και τις μετέπειτα τροποποιήσεις τους.

^b : Σύμφωνα με το Food and Drug Administration of the United States. Pesticides tolerances (<http://www.cfsan.fda.gov> 2003).

^c : A review of treatment options for control of varroa mite in New Zealand. Report to the Ministry of Agriculture and Forestry (<http://www.biosecurity.govt.nz>, 2005).

Δ.Α. : Δεν απαιτείται MRLs

Δ.Κ. : Δεν έχει καθοριστεί (MRL=LOQ=0.01 mg kg⁻¹)

* : meq kg⁻¹

I : Υψηλής τοξικότητας

II : Μέτριας τοξικότητας

III : Σχετικώς μη τοξικά

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 4

Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών στο μέλι.

4.1. Μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών

Η ανάγκη για παρακολούθηση των υπολειμμάτων των δραστικών ουσιών μετά από επεμβάσεις του μελισσοκόμου σε συνδυασμό με την ανάγκη για την παρακολούθηση της ρύπανσης των προϊόντων της μέλισσας από άλλες αιτίες, όπως η χρήση φυτοπροστατευτικών ουσιών στις καλλιέργειες και οι περιβαλλοντικοί ρύποι, καθιστούν απαραίτητη την ανάπτυξη κατάλληλων μεθόδων ανάλυσης. Επιπλέον, τα προϊόντα κυψέλης, όπως άλλωστε και τα υπόλοιπα τρόφιμα, είναι απαραίτητο να υποβάλλονται σε δειγματοληπτικούς ελέγχους για τον προσδιορισμό κτηνιατρικών φαρμάκων, προκειμένου να διαπιστωθούν τυχόν παραβάσεις της υφιστάμενης νομοθεσίας από την πλευρά των παραγωγών και των διακινητών. Η καταλληλότητα της κάθε μεθόδου έγκειται στη δυνατότητα της να επιτρέπει τον αξιόπιστο προσδιορισμό των δραστικών ουσιών και να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον έλεγχο της ποιότητας και την ταυτοποίηση των πιθανών ρυπαντών. Μία πλήρης μέθοδος ανάλυσης περιλαμβάνει τα τέσσερα επιμέρους στάδια που περιγράφονται ως:

- ✓ Δειγματοληψία
- ✓ Συντήρηση δείγματος
- ✓ Προκατεργασία δείγματος
- ✓ Εκχύλιση
- ✓ Ανάλυση

Οι ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες των προϊόντων (ποσοστό υγρασίας, περιεκτικότητα σε λιπαρές ουσίες και πρωτεΐνες, υδατοδιαλυτότητα κ.α.), σε συνδυασμό με τις ιδιαίτερες φυσικοχημικές ιδιότητες της κάθε ουσίας (πολικότητα, πτητικότητα κ.α.), δεν επιτρέπουν τη χρήση μιας μόνο μεθοδολογίας για τον

προσδιορισμό όλων των δραστικών ουσιών σε όλα τα προϊόντα. Στο πλαίσιο των ελέγχων, έχουν αναπτυχθεί ποικίλες μέθοδοι, οι οποίες βασίζονται σε διάφορες τεχνικές καθαρισμού του δείγματος και απομόνωσης των αναλυτών (**Πίνακας 4.1.**). Παρακάτω, πραγματοποιείται μια αναλυτικότερη περιγραφή του κάθε σταδίου που περιλαμβάνει μία μέθοδο ανάλυσης.

4.1.1. Δειγματοληψία

Το πρώτο στάδιο μιας ανάλυσης είναι η δειγματοληψία. Ειδικότερα, ως δειγματοληψία ονομάζεται η λήψη ενός κλάσματος του προϊόντος, το οποίο θα πρέπει να είναι όσο το δυνατόν αντιπροσωπευτικότερο του συνολικού προϊόντος. Ο τρόπος που πραγματοποιείται η δειγματοληψία διαφέρει ανάλογα με το είδος του δείγματος. Σε ομοιογενή δείγματα όπως το νερό, η λήψη δείγματος είναι πιο απλή και δεν απαιτεί ιδιαίτερα πολύπλοκες διαδικασίες. Αντίθετα, κάποια ανομοιογενή δείγματα όπως φρούτα, λαχανικά και ζωικά προϊόντα, απαιτούν τη λήψη πρόσθετων μέτρων δειγματοληψία, προκειμένου να περιοριστεί η αβεβαιότητα που οφείλεται σε αυτή. Η συνεισφορά της δειγματοληψίας στην αβεβαιότητα θεωρείται τόσο σημαντική, που σε κάποιες περιπτώσεις πλησιάζει το ποσοστό του 40% και υπερβαίνει κάθε άλλο παράγοντα. Η Ε.Ε. εξέδωσε ιδιαίτερη οδηγία σχετικά με τον τρόπο δειγματοληψίας σε τρόφιμα (2002/63/ΕΚ) και απαιτεί την πιστή εφαρμογή της από τα επίσημα εργαστήρια ελέγχου (Οδηγία 2002/63/ΕΚ). Επιπλέον, το Εθνικό Συμβούλιο Διαπίστευσης (Ε.ΣΥ.Δ.) παρέχει διαπίστευση δειγματολήπτη σε φυσικά πρόσωπα, που είναι επιφορτισμένα με το καθήκον να λαμβάνουν δείγματα για λογαριασμό των αναλυτικών εργαστηρίων. Τα παραπάνω καταδεικνύουν την ιδιαίτερη σημασία που έχει το στάδιο της δειγματοληψίας στην έκδοση αξιόπιστων αποτελεσμάτων.

4.1.2. Διατήρηση δείγματος

Το δεύτερο στάδιο μιας ανάλυσης είναι η διατήρηση του δείγματος. Συνηθισμένη τακτική των εργαστηρίων αποτελεί η αποθήκευση των συλλεχθέντων

δειγμάτων για ένα χρονικό διάστημα που ποικίλει από μερικές ώρες έως και χρόνια. Οι συνθήκες αποθήκευσης οφείλουν να εξασφαλίζουν τη διατήρηση του δείγματος στην αρχική κατάσταση για το χρονικό διάστημα που απαιτείται μέχρι την ανάλυση. Τα τρόφιμα διατηρούνται συνήθως σε συνθήκες κατάψυξης, μέχρι την ημέρα της ανάλυσης τους για υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών και κτηνιατρικών φαρμάκων, προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η εξάτμιση ή η χημική δραστηριότητα των παραπάνω ενώσεων και να αποφευχθεί η εξαγωγή εσφαλμένων τελικών αποτελεσμάτων. Σε κάθε περίπτωση, το αρμόδιο εργαστήριο οφείλει να αποδεικνύει την καταλληλότητα της μεθόδου διατήρησης, προκειμένου να διασφαλίσει την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων της ανάλυσης.

4.1.3. Προκατεργασία-Ανάλυση δείγματος

Το επόμενο στάδιο αποτελεί η ανάλυση του δείγματος. Η ανάλυση πραγματοποιείται άμεσα, χωρίς δηλαδή προκατεργασία του δείγματος, σε περιπτώσεις που είναι εφικτή η απευθείας μέτρηση π.χ. μέτρηση υγρασίας στο μέλι. Στις περισσότερες όμως περιπτώσεις, θα πρέπει να προηγηθεί ένα στάδιο που ονομάζεται προκατεργασία του δείγματος και περιλαμβάνει την απομάκρυνση των ουσιών που παρεμποδίζουν και την απομόνωση των ενώσεων που μας ενδιαφέρουν. Το στάδιο αυτό κρίνεται απαραίτητο στις περιπτώσεις αναλύσεων για υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών και κτηνιατρικών φαρμάκων. Ειδικότερα για τις αναλύσεις υπολειμμάτων, το στάδιο αυτό διαχωρίζεται σε επιμέρους στάδια, που ποικίλουν σε ότι αφορά στον αριθμό και το είδος τους. Συνήθως, τα στάδια αυτά είναι πέντε και αποτελούνται από:

- ✓ Την ομογενοποίηση, που δύναται να περιλαμβάνει ένα στάδιο υποδείγματοληψίας. Τη λήψη, δηλαδή, ενός ποσοστού του αρχικού δείγματος. Το καινούργιο υπόδειγμα ονομάζεται εργαστηριακό δείγμα.
- ✓ Την εκχύλιση, που περιλαμβάνει την απομόνωση των αναλυόμενων ουσιών σε έναν κατάλληλο διαλύτη.

- ✓ Την απομάκρυνση σημαντικού μέρους του διαλύτη, προκειμένου να πραγματοποιηθεί ευκολότερα και ταχύτερα το στάδιο του καθαρισμού του δείγματος που ακολουθεί (προαιρετικό στάδιο).
- ✓ Τον καθαρισμό του δείγματος, με σκοπό την απομάκρυνση πιθανών ουσιών που παρεμποδίζουν την ορθή αξιολόγηση των χρωματογραφημάτων.
- ✓ Τη συμπύκνωση του τελικού διαλύτη, που επιτρέπει την ελαχιστοποίηση των ορίων ποσοτικού και ποιοτικού προσδιορισμού των υπό ανάλυση ουσιών.

Για τον καθαρισμό του δείγματος, που αποτελεί το πιο πολύπλοκο στάδιο, έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς διάφορες τεχνικές. Η εκχύλιση με διαλύτη, που αποτελεί την παλιότερη χρονικά τεχνική, είναι απλούστερη και δεν απαιτεί ιδιαίτερη εξειδίκευση του αναλυτή ή ειδικό εξοπλισμό. Έχει όμως σημαντικά μειονεκτήματα, που εστιάζονται στη μη φιλικότητα της προς το περιβάλλον και τη μη δυνατότητα αυτοματοποίησης της. Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχουν δοκιμαστεί και αναπτυχθεί πολλές τεχνικές, που θεωρούνται ταχύτερες, πιο φιλικές προς το περιβάλλον και οικονομικότερες. Οι σημαντικότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό των δειγμάτων μελιού συνοψίζονται σε εργασία των Rial-Otero R. et al., (2007). Παρακάτω πραγματοποιείται μια σύνοψη των τεχνικών, οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες που αφορούσαν στον προσδιορισμό υπολειμμάτων ακαρεοκτόνων και φυτοπροστατευτικών ουσιών σε προϊόντα κυψέλης: (i) εκχύλιση με διαλύτη, (SE) (ii) εκχύλιση υπερκρίσιμου ρευστού, (SFE) (iii) εκχύλιση στερεάς φάσης, (SPE) (iv) QuEChERS, (v) εκχύλιση με μικροκύμματα, (MAE) (vi) εκχύλιση με μπάρα ανάδευσης-προσρόφησης, (SBSE) (vii) εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης, (matrix solid-phase dispersion (MSPD)) (viii) μικροεκχύλιση στερεάς φάσης, (SPME), και (ix) μικροεκχύλιση διασποράς υγρού-υγρού, (DLLM).

4.1.3.1. Εκχύλιση με διαλύτη (Solvent Extraction-SE).

Η πρώτη τεχνική που αναπτύχθηκε ήταν η εκχύλιση με διαλύτη. Στη συγκεκριμένη τεχνική, το δείγμα διαλύεται σε νερό –ή μίγματα αυτού με αλκοόλες- και στη συνέχεια ακολουθεί εκχύλιση με κατάλληλους οργανικούς διαλύτες, που παραλαμβάνουν την προς ανάλυση ουσία και επιτρέπουν την απομάκρυνση μεγάλου μέρους των συνεκχυλίζόμενων συστατικών. Σε αρκετές μεθόδους η SE χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με οξίνιση του δείγματος (Kubik M. et al., 1999)(Waliszewski S.M. et al., 1998)(Bernal J.L. et al., 1997) ή με χρήση υπερήχων (Jimenez J.J. et al., 2000)(Rezic I. et al., 2005), καθώς έτσι βελτιώνεται η αποτελεσματικότητα. Εξαιτίας της χρήσης μεγάλων ποσοτήτων οργανικών διαλυτών, η SE είναι ιδιαίτερα επιβαρυντική για το περιβάλλον και την υγεία του προσωπικού του εργαστηρίου. Επιπλέον, το κόστος είναι αρκετά υψηλό, εξαιτίας της μεγάλης ποσότητας των αναλώσιμων. Τέλος, το χρονικό διάστημα που απαιτείται για την ανάλυση ενός δείγματος είναι σημαντικό και η αυτοματοποίηση της μεθόδου ιδιαίτερα δύσκολη. Παρόλα τα παραπάνω μειονεκτήματα, η SE έχει χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα σε διάφορες μεθόδους ανάλυσης μελιού (Θρασυβούλου Α. και συνεργάτες, 1985)(Jimenez J.J. et al., 2002)(Taccheo M.B. et al., 1988), βασιλικού πολτού (Balayiannis P.G., 2001), γύρης και μελισσών (Bernal J.L. et al., 1997) για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων ακαρεοκτόνων και φυτοπροστατευτικών ουσιών.

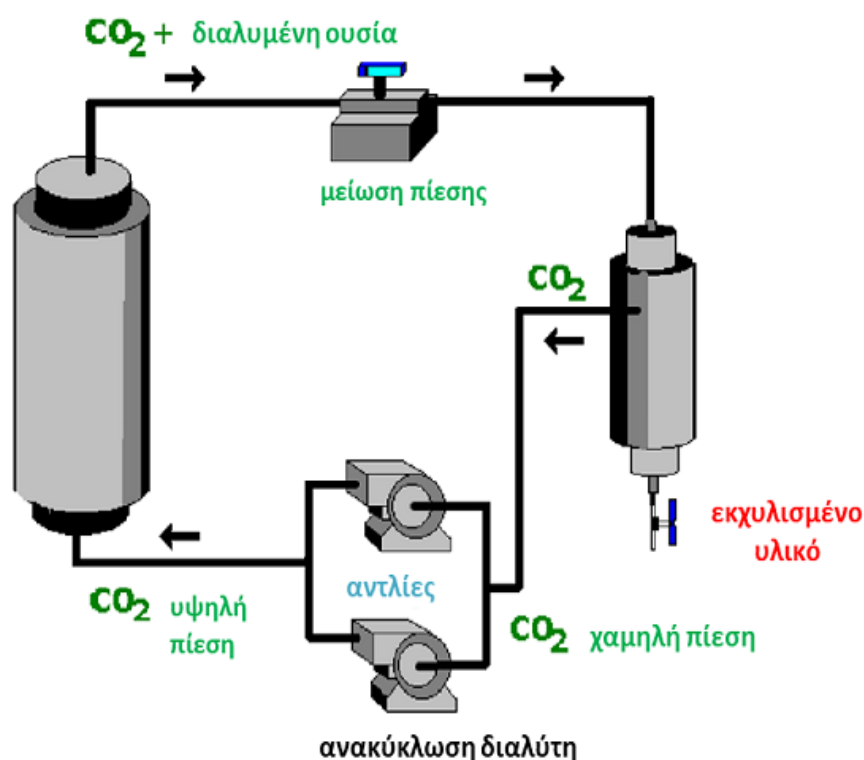
4.1.3.2. Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Ρευστού (Supercritical Fluid Extraction-SFE).

Η SFE αποτελεί μια αποδοτική και γρήγορη μέθοδος για την απομόνωση των φυτοπροστατευτικών ουσιών και των ακαρεοκτόνων από το μέλι (Fernandez M. et al., 2002)(Rissato S.R. et al., 2004).

Αυτή η τεχνική χρησιμοποιεί τις μοναδικές ιδιότητες των υπερκρίσιμων ρευστών για να διευκολύνει την τεχνική των φυτοπροστατευτικών ουσιών από τα στερεά δείγματα. Ένα υπερκρίσιμο ρευστό είναι μια ουσία της οποίας οι τιμές της θερμοκρασίας και της πίεσης του είναι πάνω από την κρίσιμες. Το διοξείδιο του άνθρακα (CO₂) έχει γίνει ο διαλύτης της επιλογής για τις περισσότερες εφαρμογές SFE, και αυτό διότι το CO₂ έχει μια εξαιρετικά χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία (31°C)

και πίεση (72.8 ATM), και είναι διαθέσιμο σε υψηλή καθαρότητα. Το εξαιρετικά κρίσιμο CO₂ είναι ένας καλός διαλύτης για την εξαγωγή των μη πολικών ή μετρίως πολικών ενώσεων. Η αποδοτικότητα της εκχύλισης των πολικών ενώσεων από το CO₂ μπορεί να βελτιωθεί με την προσθήκη των μικρών ποσοτήτων πολικών οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται ως τροποποιητές (Mitra S., 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 (5-10 mL), (iii) το CO₂ είναι μη τοξικό, άφλεκτο και περιβαλλοντικά φιλικό, (iv) η εκλεκτική εκχύλιση γίνεται χωρίς πρόσθετο καθαρισμό (Atienza J. et al., 1993), και απαιτείται ελάχιστος όγκος (<10 g) δείγματος. Εντούτοις, ένας από τους κύριους περιορισμούς της SFE είναι ότι δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να εκχυλιστούν οι φυτοπροστατευτικές ουσίες άμεσα από το νερό λόγω της χαμηλής διαλυτότητας του CO₂ στο νερό (Rissato S.R. et al., 2004).



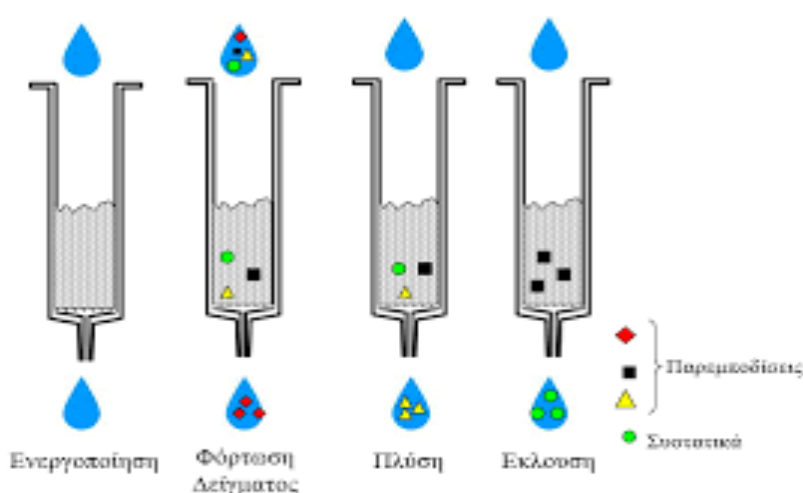
Σχήμα 4.1. Σχηματική απεικόνιση εκχύλισης υπερκρίσιμου ρευστού (SFE).
Πηγή: http://www.waters.com/waters/nav.html?locale=fr_CH&cid=10146521.

Τέλος, υπάρχουν αρκετές δημοσιεύσεις σχετικά με την ανάλυση υπολειμμάτων στο μέλι με χρήση της SFE. Οι Rissatto S.R. et al., (2004) ανέπτυξαν μια μέθοδο ανάλυσης δειγμάτων μελιού σε συνδυασμό SFE και Σύστημα Αέριου Χρωματογραφίας με Ανιχνευτές Δέσμευσης Ηλεκτρονίων (ECD) και Φασματομέτρου Μάζας (MS), με όριο ποσοτικού προσδιορισμού 0.01 mg kg^{-1} και ποσοστά ανάκτησης που κυμάνθηκαν από 75% έως 94% (Rissatto S.R. et al., 2004). Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Atienza J. et al., (1993) οι μέσες τιμές ανάκτησης κυμάνθηκαν από 53%-94%, ενώ το RSD της μεθόδου κυμάνθηκε από 1.3% έως 1.6% (Atienza J. et al., 1993).

4.1.3.3. Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction)

Αποτελεί την ευρύτερα χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης των τελευταίων δεκαετιών, στην περίπτωση των αναλύσεων για προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών και κτηνιατρικών φαρμάκων σε προϊόντα κυψέλης. Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι η τεχνική που επέλεξαν οι περισσότεροι ερευνητές, καθώς απαιτεί μικρή ποσότητα οργανικών διαλυτών (άρα είναι φιλική προς το περιβάλλον και τον αναλυτή), αυτοματοποιείται εύκολα, δεν απαιτεί εξοπλισμό υψηλού κόστους, είναι σύντομη σε χρονική διάρκεια και αποτελεσματική. Τα μειονεκτήματα εντοπίζονται στα ακριβότερα αναλώσιμα (μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης), στις περισσότερες απαιτήσεις σχετικά με την επιστημονική επάρκεια του αναλύτη, στις διαφορές μεταξύ των παρτίδων των υλικών πλήρωσης μικροστηλών και στην πιθανή προσρόφηση κάποιων ουσιών στο πολυπροπυλένιο που χρησιμοποιείται ως υλικό πλήρωσης των μικροστηλών. Αναλυτικότερα, το δείγμα διαλύεται σε νερό (Jimenez J.J. et al., 2000)(Bernal J.L. et al., 1996), αλκοόλη (Bernal J.L. et al., 2000) ή μίγμα αυτών (Baltussen E. et al., 1999)(Jimenez J.J. et al., 1998)(Tsigouri A.D. et al., 2001) και ακολουθεί ενεργοποίηση των μικροστηλών με τους ίδιους διαλύτες. Ακολούθως, το δείγμα διέρχεται διαμέσου μιας μικροστήλης που περιέχει κατάλληλο στερεό υλικό, το οποίο κατακρατά τις προς ανάλυση ουσίες. Οι δεσμευμένες ουσίες εκλούνται με τη διέλευση των κατάλληλων κατά περίπτωση οργανικών διαλυτών (για το μέλι έχουν κατά καιρούς χρησιμοποιηθεί ακετόνη (Bernal J.L. et al., 1996), διχλωρομεθάνιο (Jimenez J.J. et al.,

1998)(Amendola G. et al., 2011), οξικός αιθυλεστέρας (Korta E. et al., 2001) (Valverde S. et al., 2018), εξάνιο (Gomis D.B. et al., 1996), μεθανόλη (Bernal J.L. et al., 2000), μίγμα εξανίου-οξικού αιθυλεστέρα (Tsigouri A.D. et al., 2001), τολουόλιο (Notardonato I. et al., 2016) κ.α.). Σε ότι αφορά στα είδη υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν κατά καιρούς, τα αντίστροφης φάσης C18 αποδείχθηκαν τα πλέον κατάλληλα και επελέγησαν από τους περισσότερους ερευνητές για την εκχύλιση εντομοκτόνων, ακαρεοκτόνων, μυκητοκτόνων και ζιζανιοκτόνων φυτοπροστατευτικών ουσιών (Calatayud-Vernich P. et al., 2016)(Amendola G. et al., 2011)(Jimenez J.J. et al., 2000)(Bernal J.L. et al., 2000)(Korta E. et al., 2001). Επίσης, οι μικροστήλες με υλικό πλήρωσης Florisil έδωσαν καλά αποτελέσματα στις αναλύσεις για προσδιορισμό υπολειμμάτων πυρεθροειδών, OCPs και OPPs (ιδιαίτερα σε αναλύσεις κεριού) (Jimenez J.J. et al., 1998) και το C8 στον προσδιορισμό του tau-fluvalinate (Tsigouri A.D. et al., 2001). Σε δύο δημοσιεύσεις από τους Bernal J.L. et al., (1996 και 2000) πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αποτελεσματικότητας των SPE και SE στην ανάλυση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών (Bernal J.L. et al., 1996)(Bernal J.L. et al., 2000). Σε ότι αφορά στα αποτελέσματα της σύγκρισης, θα πρέπει να τονιστεί ότι το ποσοστό ανάκτησης με τις δύο τεχνικές ήταν παρόμοιο, αλλά η SPE υπερέφερε σε πιστότητα και καθαρότητα των χρωματογραφημάτων.



Σχήμα 4.2. 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.
Πηγή: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>.

4.1.3.4. QUECHERS (Quick-Easy-Cheap-Effective-Rugged-Safe)

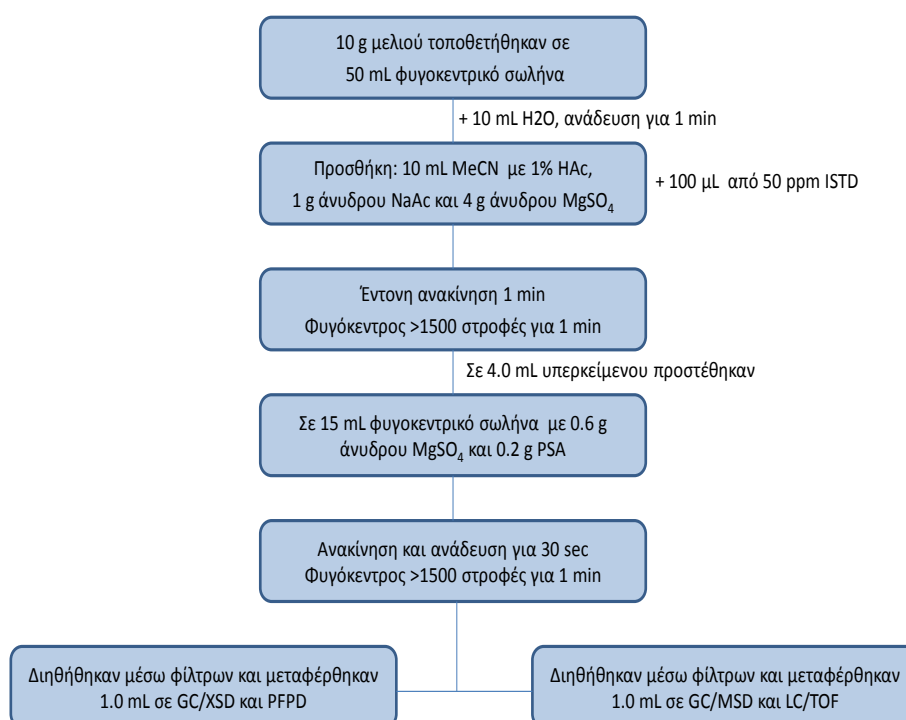
Το όνομα της προέρχεται από τα χαρακτηριστικά που της αποδίδονται από τους ερευνητές και χαρακτηρίζεται ως γρήγορη (**Quick**), εύκολη (**Easy**), φθηνή (**Cheap**), αποτελεσματική (**Effective**), ανθεκτική (**Rugged**) και ασφαλής (**Safe**). Η QuEChERS αποτελεί την πλέον σύγχρονη τεχνική για προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων. Η τεχνική αναπτύχθηκε καταρχήν για ανάλυση προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό, αλλά στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε και για τα υπόλοιπα (π.χ. μέλι), με την προϋπόθεση ότι θα προστίθεται μια ποσότητα νερού στο αρχικό δείγμα.

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 (Wilkowska A. et al., 2011). Η βασική ιδέα της μεθόδου, είναι ότι το δείγμα έρχεται σε επαφή αρχικά με έναν αναμίξιμο με νερό διαλύτη όπως ακετονιτρίλιο/ακετόνη (Anastassiades M. et al., 2003), ή οξικό αιθυλεστέρα (ethyl acetate) (Banerjee K. et al., 2007) παρουσία υψηλού ποσοστού αλάτων κυρίως χλωριούχου νατρίου/θειικού άλατος του μαγνησίου και των ρυθμιστικών διαλυμάτων. Μετά την ανάδευση και τη φυγοκέντρηση, 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 φυγοκέντρηση και το προκύπτον υπερκείμενο υγρό μπορεί να αναλυθεί άμεσα ή μπορεί να υποβληθεί σε μια συγκέντρωση και ένα βήμα αλλαγής διαλύτη εάν είναι απαραίτητο.

Σχετικά με το μέλι, η QuEChERS έχει δοκιμαστεί για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων 6 διαφορετικών φυτοπροστατευτικών ουσιών με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένο με φασματομετρία μάζας. Τα δείγματα μελιού εκχυλίστηκαν με ακετονιτρίλιο και ακολούθησε η προσθήκη χλωριούχου νατρίου με ταυτόχρονη παρουσία θειικού μαγνησίου και κιτρικού νατρίου (τριβασικού διένυδρου κιτρικού νατρίου και διβασικού σεσκυένυδρου κιτρικού νατρίου). Ένα δεύτερο στάδιο καθαρισμού πραγματοποιήθηκε με προσθήκη ενός μίγματος πρωτοταγούς/δευτεροταγούς αμίνης (Primary Secondary Amine, PSA), C18 και

θεικού μαγνησίου. Ο ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση φασματομετρίας μάζας. Τα πειράματα ανάκτησης πραγματοποιήθηκαν σε τρία επίπεδα (από 0.005 mg kg^{-1} έως 0.02 mg kg^{-1}) και τα αποτελέσματα κυμάνθηκαν από 70% έως 99%. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων επαναληψιμότητας ήταν ικανοποιητικά, καθώς το RSD κυμάνθηκε από 1.35% έως 4.6% (Zheng W. et al., 2018).

Πειραματική πορεία εκχύλισης δειγμάτων μελιού με τη μέθοδο QuEChERS



Σχήμα 4.3. Πρωτόκολλο για εκχύλιση υπολειμματικών φυτοφαρμάκων σε μέλι με τη μέθοδο QUECHERS.

Πηγή: Lehotay S.J., 2004.

4.1.3.5. Εκχύλιση με Μικροκύματα (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 C.S.,

Bjorklund E., 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.

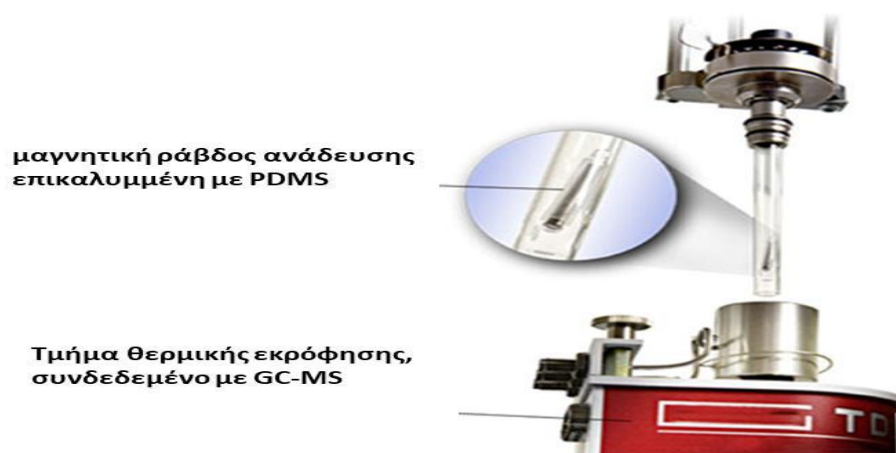
Ανάλογα με τη φύση του δείγματος, τα στάδια προκατεργασίας περιλαμβάνουν συνήθως λειοτρίβιση του στερεού δείγματος, προσθήκη διαλύτη, συνήθως μίγματος νερού/ακετονιτριλίου, εκχύλιση στη συσκευή, και στη συνέχεια προσθήκη άλατος στον όγκο του υπερκείμενου υγρού σε άλλο δοχείο όπου αν χρειαστεί, ακολουθεί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

Η υποβοηθούμενη από μικροκύματα 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 φυτοπροστατευτικών ουσιών στους ιστούς ζώων και φυτών, οι αναλυτικές μέθοδοι έχουν αναφερθεί για οργανοφωσφορικά (Diagne R.G., Foster G.D., 2002), οργανοχλωριωμένα (Vetter W., Weichbrodt M., 1998)(Prados-Rosales R.C., Luque Garcia J.L., 2003) και άλλα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Falqui-Cao C., Wang Z., 2001).

4.1.3.6. Εκχύλιση με ράβδο ανάδευσης-προσρόφησης (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. Ένας μαγνήτης ανάδευσης (stir bar), εμπεριέχεται σε γυάλινο περίβλημα και είναι επικαλυμμένος με το υλικό PDMS (polydimethylsiloxane). Ο μαγνήτης ανάδευσης εισάγεται στο υδατικό διάλυμα και η προσροφητική εκχύλιση επιτυγχάνεται κατά την διάρκεια της ανάδευσης. Ο μαγνήτης αφαιρείται από το δείγμα, στεγνώνεται και εισάγεται σε έναν γυάλινο σωλήνα εκρόφησης. Ο γυάλινος σωλήνας ο οποίος περιέχει το μαγνήτη ανάδευσης, τοποθετείται μέσα στη μονάδα θερμικής εκρόφησης (TDU), ώστε να πραγματοποιηθεί η θερμική εκρόφηση των

ενώσεων που εκχυλίστηκαν από το μαγνήτη. Στη συνέχεια οι ενώσεις εκροφώνται θερμικά και μεταφέρονται σε (αέριο) χρωματογράφο (Σχήμα 4.4.).



Σχήμα 4.4. Πειραματική πορεία SBSE συζευγμένης με GC-MS. Πηγή: Nannou C.I. et al., 2018.

Στο μέλι η SBSE έχει χρησιμοποιηθεί με ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τη μέθοδο της SPME. Με βάση τα δεδομένα που παρατίθενται από τους Blasco C. et al., (2004) η SBSE είναι καταλληλότερη ως τεχνική από την SPME, καθώς η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της είναι πολύ καλύτερες, ενώ επιπλέον μπορεί να δεσμεύσει πολύ μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναλυτών. Πιο συγκεκριμένα, το όριο ποσοτικού προσδιορισμού ήταν 0.04 mg kg^{-1} για την SBSE, ενώ τα αντίστοιχα όρια για την SPME κυμάνθηκαν από 0.8 mg kg^{-1} έως 3.0 mg kg^{-1} . Επιπλέον, η ανάκτηση της SBSE κυμάνθηκε από 40% έως 64%. Τέλος, η σχετική τυπική απόκλιση της επαναληψιμότητας δεν ξεπέρασε το 10% και στις δύο περιπτώσεις (Blasco C. et al., 2004)

4.1.3.7. Εκχύλιση Διασποράς Στερεάς Φάσης (Matrix Solid Phase Dispersion)

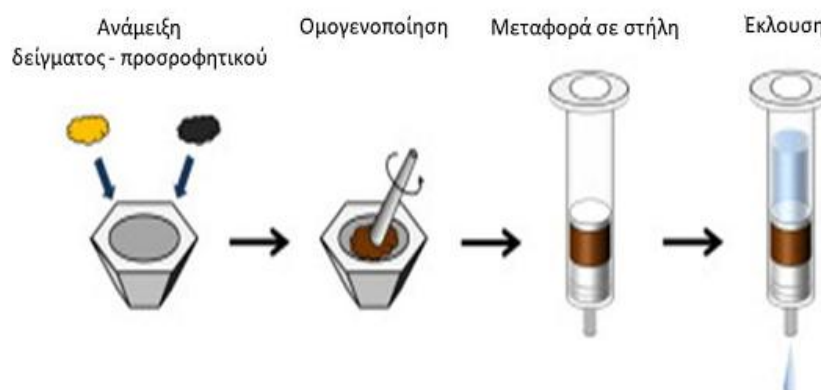
Η MSPD είναι μια τεχνική εκχύλισης και καθαρισμού που αναπτύχθηκε αρχικά το 1989 για να αποφύγει τα γενικά μειονεκτήματα της SPE για την εξαγωγή των αναλυτών από τα στερεά ή ημιστερεά δείγματα (Barker S.A., 2007). Αυτή η τεχνική απαιτήσε λιγότερο χρόνο και διαλύτη από τη SPE και παρέχει παρόμοια αποτελέσματα. Επιπλέον, αποφεύγει τα προηγούμενα βήματα αραίωσης για τα

στερεά ή ημιστερεά δείγματα προκειμένου αυτά να εξαχθούν από την SPE. Στην MSPD το δείγμα ομογενοποιείται κι αναμιγνύεται με ένα προσροφητικό μέσο, γενικά florisil ή C18, και μεταφέρεται έπειτα σε μια στήλη. Το υλικό προσρόφησης έχει διάφορες λειτουργίες:

- (1) δρα ως ένωση που σπάει 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 και εκλούεται τελικά με έναν κατάλληλο διαλύτη και έπειτα το εκχύλισμα μπορεί να αναλυθεί άμεσα. Τυχούσες παρεμβάλλουσες ουσίες, όπως οι χρωστικές ή άλλες πολικές ενώσεις, διατηρούνται στο προσροφητικό μέσο. Η MSPD χρησιμοποιήθηκε ελάχιστα στην ανάλυση υπολειμμάτων ακαρεοκτόνων και φυτοπροστατευτικών ουσιών σε προϊόντα κυψέλης. Παρόλα αυτά, αναφέρεται μελέτη σχετική με την ανίχνευση φυτοπροστατευτικών ουσιών σε μέλι, με τη χρήση συστημάτων αέριας χρωματογραφίας με ανιχνευτές ECD και NPD (Barker S.A., 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 mg kg^{-1} .

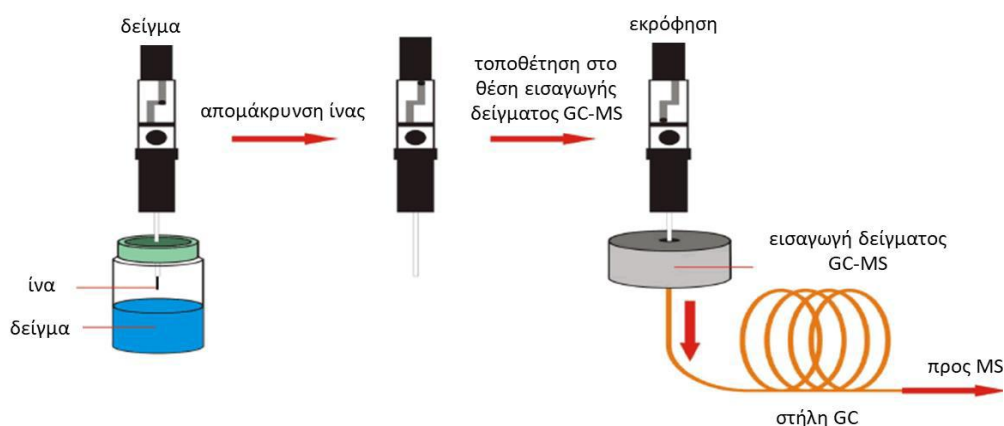


Σχήμα 4.5. Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής MSPD.
Πηγή: http://www.jasco.hu/konyvtar/TN111_Matrix_solid_phase_dispersion_MSPD.pdf.

4.1.3.8. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (Solid Phase Micro Extraction)

Η τεχνική μικρο-εκχύλισης στερεάς φάσης είναι μια σύγχρονη τεχνική εκχύλισης που χρησιμοποιείται για την απομόνωση και την προσυγκέντρωση οργανικών ενώσεων κυρίως από υγρά, αλλά επίσης από αέρια ή στερεά δείγματα. Είναι αποτελεσματική τόσο για πολικές όσο και για μη πολικές ενώσεις και για διαφορετικούς τύπους υποστρωμάτων.

Η τεχνική αυτή προκατεργασίας στηρίζεται στην εκλεκτική προσρόφηση των επιθυμητών συστατικών σε μια οπτική ίνα λίγων cm και μικρής διαμέτρου από τηγμένο πυρίτιο επιστρωμένο σε πολυμερές υλικό, η οποία είναι προσαρμοσμένη σε μικροσύριγγα. Η μικροσύριγγα αυτή εισάγεται στο εξεταζόμενο δείγμα, οπότε η οπτική ίνα εκτείνεται μέσα στο δείγμα και τα προσδιοριζόμενα συστατικά προσροφώνται σ' αυτήν. Η προσρόφηση όμως δε γίνεται ποσοτικά, αλλά αποκαθίσταται μια ισορροπία κατανομής των συστατικών ανάμεσα στη φάση του δείγματος και στη στατική φάση της ίνας. Στη συνέχεια η ίνα απομακρύνεται από το δείγμα κι επαναφέρεται στο εσωτερικό της μικροσύριγγας. Η εκρόφηση των προσροφημένων στην ίνα συστατικών πραγματοποιείται στην περίπτωση αναλύσεων με αέριο χρωματογράφο ή με αέριο χρωματογράφο σε συνδυασμό με φασματοόμετρο μάζας, με απευθείας εισαγωγή της ίνας στο σύστημα και θερμική εκρόφηση των συστατικών. Στην περίπτωση διαχωρισμού των συστατικών με υγρή χρωματογραφία (LC), αυτή συνδέεται με κατάλληλη βαλβίδα δύο θέσεων, στην οποία όταν εισαχθεί η ίνα, τα συστατικά παραλαμβάνονται με τη βοήθεια της κινητής φάσης. Η τεχνική παριστάνεται σχηματικά στο **Σχήμα 4.6.**



Σχήμα 4.6. Πειραματική πορεία SPME συζευγμένης με GC-MS.
Πηγή: Nannou C.I. et al., 2018.

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 J., Arthur C.L., 1990)(Fernandez M. et al., 2002), και έχει αξιολογηθεί 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 C. et al., 2002), καθώς αυτό παρουσιάζει ορισμένα πλεονεκτήματα έναντι άλλων ινών όπως (i) ενισχυμένη αναπαραγωγικότητα, (ii) χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, (iii) μεγαλύτερη γραμμικότητα, (iv) βελτιωμένους συντελεστές συσχέτισης, (v) χαμηλός χρόνος εξαγωγής, και (vi) καλύτερα χρωματογραφήματα (Jimenez J.J. et al., 1998).

Κατά την ανάλυση μελιού για υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών και ακαρεοκτόνων, η ίνα βυθίζεται σε υδατικό διάλυμα του δείγματος. Στη συνέχεια, στο χρόνο που υπολογίστηκε ότι επέρχεται ισορροπία της προσδιοριζόμενης ουσίας μεταξύ ίνας και περιβάλλοντος, η ίνα απομακρύνεται και τοποθετείται στον εισαγωγέα του συστήματος αέριας χρωματογραφίας, προκειμένου να εκροφηθούν τα συστατικά και να γίνει ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών και ακαρεοκτόνων. Η διάρκεια εμβάπτισης της ίνας, καθώς επίσης και η θερμοκρασία είναι αυστηρά καθορισμένες και προσδιορίζονται με δοκιμές κατά την ανάπτυξη της μεθόδου. Η τεχνική της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης εφαρμόστηκε επιτυχώς για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων OCPs, OPPs, πυρεθροειδών και ακαρεοκτόνων στο μέλι (Blasco C. et al., 2004)(Volante M. et al., 2001)(Yu J. et al., 2004).

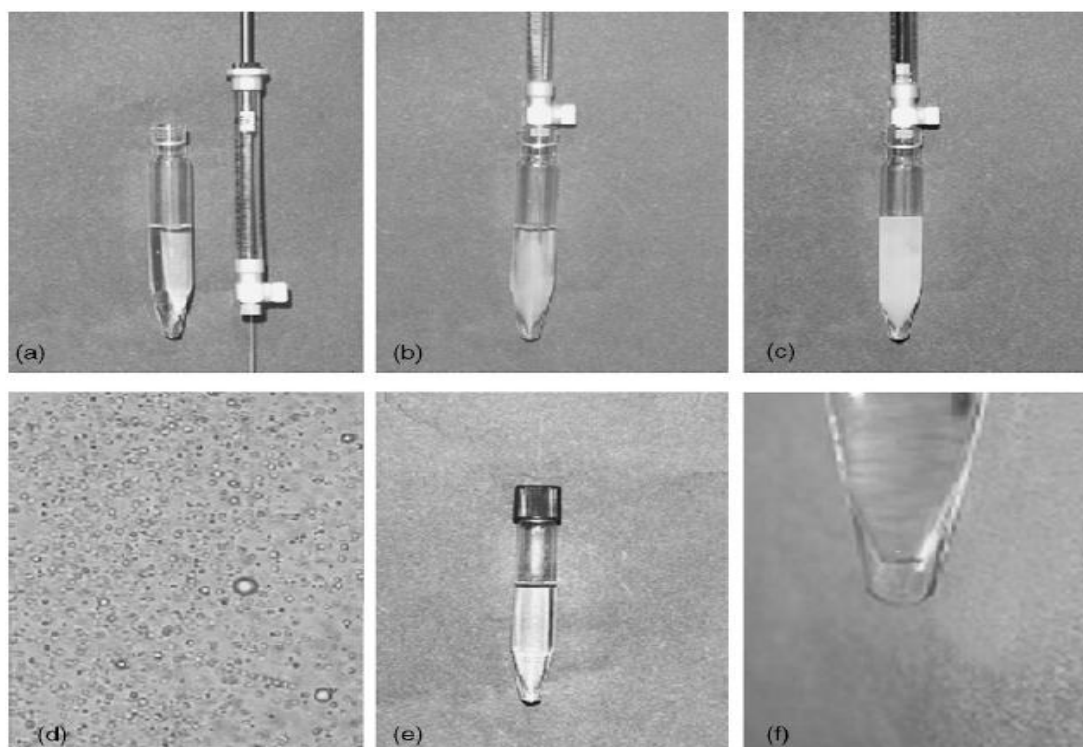
4.1.3.9. Μικροεκχύλιση Διασποράς Υγρού-Υγρού (Dispersive Liquid Liquid Microextraction)

Προκειμένου να υπερνικηθούν τα μειονεκτήματα των τεχνικών SPME και SPE, αναπτύχθηκε η μικροεκχύλιση διασποράς υγρού-υγρού (DLLME) (Campillo N. et al., 2013)(Fu L.Y. et al., 2009)(Zang X.H. et al., 2009)(Chen H. et al., 2010) που είναι βασισμένη σε ένα τριαδικό διαλυτικό σύστημα, όπως η ομοιογενής εκχύλιση υγρού-υγρού. Σε αυτήν την τεχνική, το κατάλληλο μίγμα διαλύτη εκχύλισης και διασποράς εγχύονται σε ένα υδατικό δείγμα βίαια μέσω σύριγγας, και 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 4.7.** (Zang X.H. et al., 2009).

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



Σχήμα 4.7. Φωτογραφίες των διάφορων σταδίων της DLLME α) 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 (x 1000) όπου διακρίνονται τα σταγονίδια των διαλυτών σε μορφή νέφους, e) Μετά τη φυγοκέντρηση, f) Μεγεθυμένη όψη της οργανικής φάσης μετά τη φυγοκέντρηση. Πηγή: Zang X.H. et al., 2009.

4.1.4. Υγρή και αέρια χρωματογραφία

Μετά την απομόνωση των αναλυόμενων ουσιών από το υπόστρωμα ακολουθεί ο απαραίτητος διαχωρισμός. Οι πρακτικές που χρησιμοποιούνται κατά βάση στις αναλύσεις υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών και κτηνιατρικών φαρμάκων σε προϊόντα κυψέλης είναι χρωματογραφικές. Η επιλογή της αερίου ή υγρής χρωματογραφίας γίνεται κυρίως με βάση τις χημικές ιδιότητες των προς ανάλυση ουσιών. Η τεχνική της αερίου χρωματογραφίας έχει αποδειχτεί καταλληλότερη για τον προσδιορισμό πτητικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, σε αντίθεση με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιείται σε λιγότερο πτητικές ενώσεις μεγάλου μοριακού βάρους. Παρακάτω γίνεται αναφορά στις κύριες τεχνικές προσδιορισμού κτηνιατρικών φαρμάκων και φυτοπροστατευτικών ουσιών.

4.1.4.1. Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Σε αντίθεση με την αέρια χρωματογραφία, που περιορίζεται στον προσδιορισμό των πιο πτητικών ενώσεων, η υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιείται για την απομόνωση μιας ευρύτατης ομάδας ενώσεων. Οι ενώσεις αυτές μπορεί να μην είναι αρκούντως πτητικές ή θερμοανθεκτικές, ώστε να αναλυθούν με αέρια χρωματογραφία. Σε αντίστοιχα με την αέρια χρωματογραφία, διάφοροι τύποι ανιχνευτών χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ανιχνευτών είναι παράταξης φωτοδιόδων (DAD) (Adamczyk S. et al., 2007)(Aloglu A.K. et al., 2017)(Korta E. et al., 2001)(Martel A.C., Zeggane S., 2002), ορατού/υπεριώδους (UVD) (Xu J.-Z. et al., 2009)(Granja R.H.M.M. et al., 2008)(Martel A.C., Zeggane S., 2002) και φθορισμομετρίας (FLD) (Bernal J.L. et al., 2009)(Sajid M. et al., 2013).

Η τεχνική ανίχνευσης όμως που κερδίζει έδαφος και σε αυτή την περίπτωση είναι η φασματομετρία μάζας (MS). Ειδικότερα, το φασματόμετρο μάζας με τριπλό τετράπολο αποτελεί μονόδρομο πλέον για τα σύγχρονα εργαστήρια ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων και κτηνιατρικών φαρμάκων (Zheng W. et al., 2018)(Gawel M. et al., 2019)(Ohba Y. et al., 2018)(Lozano A. et al., 2019). Η παραπάνω τεχνική προσφέρει τη δυνατότητα προσδιορισμού της πλειοψηφίας των δραστικών ουσιών που κυκλοφορούν στην αγορά, σε συνδυασμό με εξαιρετική ευαισθησία (LOQ της τάξης του 0.001 mg kg^{-1} για τις περισσότερες υπό ανάλυση ουσίες) και λιγότερες απαιτήσεις σε ότι αφορά στον καθαρισμό του δείγματος (ο προσδιορισμός γίνεται με βάση τα ιόντα της διάσπασης της μητρικής ένωσης και συνεπώς δεν απαιτείται να προηγηθεί ιδιαίτερος καθορισμός του δείγματος, καθώς και πλήρης χρωματογραφικός διαχωρισμός). Η φασματομετρία μάζας αποτελεί τον ιδανικό τρόπο ανίχνευσης σε συνδυασμό με τη μέθοδο QuEChERS που αναφέρεται στην **Παράγραφο 4.1.3.4.** σε κάθε περίπτωση βέβαια θα πρέπει να τονιστεί το πολύ υψηλό κόστος κτήσης και συντήρησης του συγκεκριμένου εξοπλισμού, καθώς και η παρουσία εξειδικευμένου επιστημονικού προσωπικού, που αποτελεί τροχοπέδη στην χρήση του από μικρότερα εργαστήρια ανάλυσης τροφίμων. Το υλικό πλήρωσης και η διαστάσεις των στηλών παίζουν σημαντικό ρόλο και στην περίπτωση της HPLC. Η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη στήλη είναι η C18

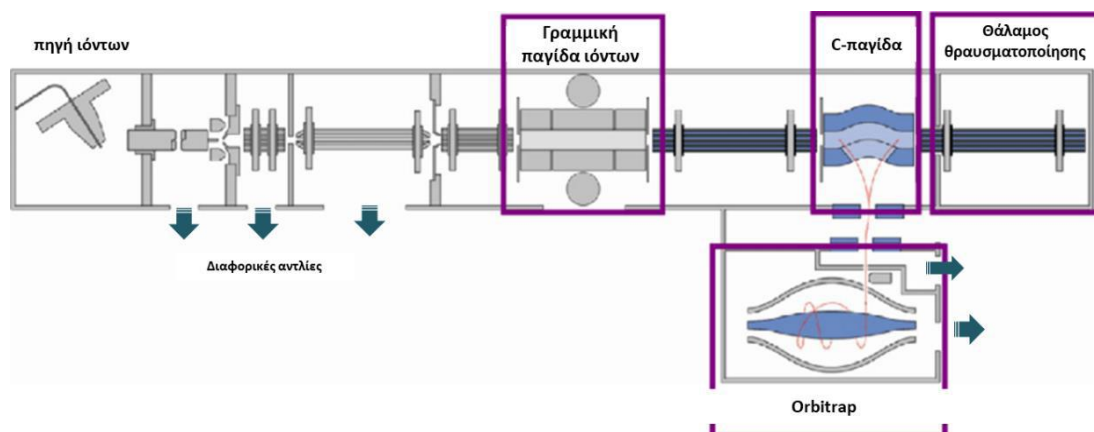
αντίστροφης φάσης με εσωτερική διάμετρο 4.6 mm i.d.. Υπάρχουν όμως στήλες με υλικό πλήρωσης C8, ODS κ.α., καθώς επίσης και στήλες με πολύ μικρή εσωτερική διάμετρο όπως 2.1 mm i.d. και 0.32 mm i.d., που συμβάλουν στην αύξηση της ευαισθησίας και τη μείωση των ποσοτήτων των χρησιμοποιούμενων διαλυτών και δειγμάτων (Gomis D.B. et al., 1996). Η κινητή φάση χρησιμοποιείται στην υγρή χρωματογραφία είναι διαλύτες όπως το νερό, η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο ή μίγματα αυτών (σε αντίθεση με την κινητή φάση της αέριας χρωματογραφίας, που αποτελείται από αέρια υψηλής καθαρότητας). Επίσης, η ρύθμιση του pH της κινητής φάσης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην αποτελεσματικότητα της μεθόδου. Στις περισσότερες περιπτώσεις μία τιμή του pH=9 είναι ιδανική για τις αναλύσεις υπολειμμάτων ακαρεοκτόνων.

4.1.4.2. Υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS.

Ο καινοτόμος υβριδικός αναλυτής μαζών Orbitrap είναι ο πρώτος υψηλής απόδοσης αναλυτής μαζών που χρησιμοποιεί συνδυασμό της γραμμικής και ηλεκτροστατικής παγίδας ιόντων και κατασκευάστηκε από τη Thermo Electron, εισάγοντας στην αγορά το σύστημα LTQ Orbitrap (linear ion trap quadrupole). Εφευρέθηκε από τον Makarov και η βάση για την κατασκευή του προήλθε από την παγίδα ιόντων Kingdon, που είχε συλληφθεί ως ιδέα αλλά δεν είχε κατασκευαστεί πρακτικά (European Commission, 2009)(European Commission, 2008).

Ο αναλυτής μαζών Orbitrap αποτελείται από δύο ειδικά διαμορφωμένα κεντρικά και εξωτερικά ηλεκτρόδια. Ο τροχιακός αναλυτής μαζών είναι ένα υβριδικό σύστημα που συνδυάζει τη γραμμική παγίδα ιόντων LTQ με τον αναλυτή μαζών Orbitrap. Τα παραγόμενα ιόντα στην πηγή ιοντισμού παγιδεύονται στον αναλυτή μαζών LTQ και μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση μεθόδων σαρώσεως MS και MSn.

Η γενική συνδεσμολογία του αναλυτή Orbitrap, ο οποίος είναι τροχιακής παγίδας ιόντων (orbitrap analyzer) ακολουθεί τις βασικές αρχές της οργανολογίας αναλυτών μαζών και απεικονίζεται στο **Σχήμα 4.8.**



Σχήμα 4.8. Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή LTQ Orbitrap. Πηγή: MASS SPECTROMETRY. Θωμαΐδης Ν.Σ., Εργ. Αναλυτικής Χημείας, ΕΚΠΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.

Συγκεκριμένα, τα τμήματα του αναλυτή αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων περιλαμβάνουν διαφορικό σύστημα με τελικό κενό $<8 \times 10^{-10}$ Torr, πολυπολικούς φακούς μεταφοράς ιόντων υπό υψηλό κενό, κελί θραυσματοποίησης με άζωτο (C-Trap), ευθύγραμμο πολυπολικό κελί θραυσματοποιήσεων, τροχιακή παγίδα, σύστημα για τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας, ενισχυτές χαμηλού θορύβου και μετατροπείς σήματος σε συχνότητα σε συνδυασμό με μετασχηματισμούς Fourier (Fourier Transformation, FT) για την απόκτηση φασμάτων μάζας (Κακλαμάνος Γ., 2009)(Thermo Fisher Scientific, 2010).

Η τεχνική ανίχνευσης UHPLC/LTQ-ORBITRAP έχει αξιολογηθεί επιτυχώς για την εξαγωγή φυτοπροστατευτικών ουσιών και ακαρεοκτόνων από το μέλι (Souza Tette P.A. et al., 2016)(Valverde S. et al., 2018).

4.1.4.3. Αέρια χρωματογραφία με φασματομετρία μάζας.

Η αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιήθηκε περισσότερο από κάθε άλλη μέθοδος στον προσδιορισμό υπολειμμάτων ακαρεοκτόνων και φυτοπροστατευτικών ουσιών σε προϊόντα κυψέλης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η συγκεκριμένη τεχνική χρησιμοποιείται κυρίως για προσδιορισμό πτητικών ενώσεων μικρού μοριακού βάρους, αλλά υπάρχουν και περιπτώσεις ενώσεων μεγαλύτερου μοριακού βάρους (π.χ. amitraz), που αναλύθηκαν με αέρια

χρωματογραφία μετά από μια επίπονη και χρονοβόρο διαδικασία, ώστε να παρασκευασθεί παράγωγο της μητρικής ένωσης (Rial-Otero R. et al., 2007)(Jiménez J.J. et al., 2005). Με την συγκεκριμένη διαδικασία, οι προς ανάλυση ουσίες μετατράπηκαν σε πτητικότερες ενώσεις και στη συνέχεια αναλύθηκαν με σύστημα αέριας χρωματογραφίας που περιλαμβάνει ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (MS).

4.1.5. Επίδραση υποστρώματος

Γεγονός που χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς είναι ότι οι διαφορές στη σύσταση των προϊόντων κυψέλης δύναται να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (Blasco C. et al., 2004)(Yu J. et al., 2004) και την απόκριση των χρωματογραφικών συστημάτων στις προς ανάλυση ουσίες (Volante M. et al., 2001)(Jimenez J.J. et al., 1998)(Karazafiris E. et al., 2008). Για το λόγο αυτό οι βαθμονομήσεις και οι ανακτήσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε εκχύλισμα του προς ανάλυση δείγματος. Ειδικότερα, ο αναλυτής εφαρμόζει την επιλεχθείσα τεχνική σε μέλι ή άλλο προϊόν κυψέλης που δεν περιέχει ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις υπολειμμάτων των προς ανάλυση ουσιών. Το τελικό εκχύλισμα που προκύπτει από τη συνολική διαδικασία χρησιμοποιείται στην κατασκευή των προτύπων καμπυλών βαθμονόμησης. Στην περίπτωση που δεν είναι εφικτή η εύρεση δειγμάτων ελεύθερων από τα συγκεκριμένα υπολείμματα είναι δυνατή η χρήση εκχυλίσματος που να δίνει απόκριση μέχρι το 30% του ορίου αναφοράς (Commission of the European Union, 2009). Η απόκριση αυτή μπορεί να οφείλεται στην παρουσία της προς ανάλυση ουσίας ή μιας παρεμβολής με τον ίδιο χρόνο κατακράτησης.

4.1.6. Επικύρωση Αναλυτικής Μεθόδου

Ως επικύρωση αναλυτικής μεθόδου ορίζεται η συνολική διαδικασία επιβεβαίωσης της καταλληλότητας μιας μεθόδου για το συγκεκριμένο είδος αναλύσεων και η πλήρης συμμόρφωση της με τις απαιτήσεις της κείμενης νομοθεσίας. Επιπλέον, με την επικύρωση θεσπίζονται το εύρος τιμών, στο οποίο αναμένεται να κινηθούν τα χαρακτηριστικά των διαφόρων παραμέτρων της

μεθόδου (γραμμικότητα, επαναληψιμότητα, ακρίβεια, ορθότητα, αναπαραγωγιμότητα, συστηματικό σφάλμα κ.α.). Τα δύο έγγραφα της Ευρωπαϊκής Ένωσης, που σχετίζονται με την επικύρωση μεθόδων και χρησιμοποιούνται από την πλειοψηφία των εργαστηρίων είναι το υπ' αριθ. 11813/2017 της SANTE και η Απόφαση 657/2002, τα οποία αφορούν σε αναλύσεις υπολειμμάτων σε φυτικά και ζωικά προϊόντα όπως μέλι, αυγά, κρέας κ.α. (European Commission, 2017)(Οδηγία 2002/657/ΕΚ).

Τα προϊόντα κυψέλης και ιδιαίτερα το μέλι εντάσσονται επισήμως στα ζωικά προϊόντα, αλλά τις περισσότερες φορές ελέγχονται με βάση το υπ' αριθ. 10684/2009 έγγραφο της SANCO. Η διαφοροποίηση αυτή οφείλεται στην φυτική προέλευση του νέκταρος και της γύρης, καθώς και στην χαμηλή περιεκτικότητα του μελιού σε λιπαρές ουσίες, που αποτελεί κύριο χαρακτηριστικό των περισσότερων φυτικών προϊόντων.

4.1.6.1. Γενικές Απαιτήσεις Επικύρωσης

Η επικύρωση των μεθόδων της συγκεκριμένης έρευνας πραγματοποιήθηκε με βάση τις ισχύουσες οδηγίες 2002/657/ΕΚ, SANTE 11813/2017 και 96/23/ΕΚ και αφορούν σε οκτώ βασικές παραμέτρους που επιβάλλεται να προσδιορίζονται σε κάθε επικύρωση μεθόδου. Αυτές αναφέρονται παρακάτω και είναι:

- ✓ Η ορθότητα-ανάκτηση (Accuracy),
- ✓ Η πιστότητα (Trueness),
- ✓ Η γραμμικότητα (Linearity),
- ✓ Το συστηματικό σφάλμα (Bias, Accuracy),
- ✓ Το όριο ανίχνευσης (Limit of Determination),
- ✓ Το όριο ποσοτικού προσδιορισμού (Limit of Quantitation),
- ✓ Το όριο αναφοράς, που συνήθως συμπίπτει με το όριο ποσοτικοποίησης (Reporting Limit) και
- ✓ Η αβεβαιότητα (Uncertainty).

Επίσης, κάποιες παράμετροι, που θεωρούνται σημαντικοί, συνεκτιμώνται κατά την επικύρωση μιας μεθόδου. Οι παράμετροι αυτές χαρακτηρίζονται ως:

- ✓ Εκλεκτικότητα (Selectivity),
- ✓ Διακριτικότητα (Specificity) και
- ✓ Ανθεκτικότητα (Robustness).

Παρακάτω παρατίθενται αναλυτικότερα οι ορισμοί των διαφόρων παραμέτρων, πιθανές εναλλακτικές ονομασίες και γενικότερα στοιχεία που αφορούν σε αυτές.

4.1.6.1.1. Ορθότητα-Ανάκτηση

Η ορθότητα ορίζεται ως η εγγύτητα μεταξύ της τιμής του μέσου όρου που λαμβάνεται από ένα μεγάλο πλήθος δοκιμών και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Μπορεί να προέρχεται από πρότυπα υλικά αναφοράς ή εμβολιασμένα από τον αναλυτή δείγματα. Σε πολλές περιπτώσεις αναφέρεται με τον όρο ανάκτηση (recovery). Εκτιμάται σε δύο τουλάχιστον επίπεδα συγκέντρωσης, που αντιστοιχούν στο όριο αναφοράς (συνήθως είναι το ίδιο με το όριο ποσοτικού προσδιορισμού) και σε ένα όριο δράσης (συνήθως στο MRL ή στο δεκαπλάσιο του ορίου αναφοράς). Η εκτίμηση πραγματοποιείται με υπολογισμό της μέσης τιμής και της σχετικής τυπικής απόκλισης έξι επαναλήψεων ανά επίπεδο. Με βάση την ισχύουσα οδηγία SANTE 11813/2017, η υπολογισθείσα μέση τιμή θα πρέπει να κυμαίνεται από το 70 έως το 120% της αληθούς και η σχετική τυπική απόκλιση των έξι επαναλήψεων θα πρέπει να είναι <20% (<30% για συγκέντρωση <0.01 mg kg⁻¹). Επίσης δύνανται να γίνουν δεκτές μέσες τιμές που κυμαίνονται εκτός ορίων, με δεδομένο ότι η σχετική τυπική απόκλιση είναι πολύ μικρή. Σε αυτές τις περιπτώσεις θα πρέπει να πραγματοποιείται διόρθωση του αποτελέσματος με βάση την επιτευχθείσα ανάκτηση, προκειμένου το αποτέλεσμα να προσεγγίζει περισσότερο στην πραγματική τιμή. Υπάρχει το ενδεχόμενο η ορθότητα να αφορά μόνο στο σφάλμα του αναλυτικού συστήματος προσδιορισμού των δραστικών ουσιών. Σε αυτήν την περίπτωση η ορθότητα συμπίπτει με το συστηματικό σφάλμα που περιγράφεται στην **Παράγραφο 4.1.6.1.4.**

4.1.6.1.2. Πιστότητα

Ορίζεται ως η εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών σε ρητά προκαθορισμένες συνθήκες. Η πιστότητα εκφράζεται ως αναπαραγωγικότητα (σε περιπτώσεις αναλύσεων διαφορετικών αναλυτών σε μεγάλο χρονικό διάστημα) ή ως επαναληψιμότητα (σε περιπτώσεις αναλύσεων του ίδιου αναλυτή σε σύντομο χρονικό διάστημα). Οι αναλύσεις για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας συνήθως ολοκληρώνονται εντός μίας ημέρας, ενώ η εκτίμηση της αναπαραγωγικότητας πραγματοποιείται σε χρονικό διάστημα που υπερβαίνει τις δύο εβδομάδες. Η ιδανική εκτίμηση της αναπαραγωγικότητας πραγματοποιείται σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, που μπορεί να είναι το αποτέλεσμα μετρήσεων πολλών ετών. Η αναπαραγωγικότητα, ανάλογα με τη συμμετοχή ενός ή περισσότερων εργαστηρίων, χαρακτηρίζεται ως ενδιάμεση ή διεργαστηριακή αντίστοιχα. Σε αντιστοιχία με την ορθότητα, η πιστότητα εκτιμάται σε δύο επίπεδα με ανάλυση δέκα τουλάχιστον δειγμάτων στο καθένα. Η πρώτη εκτίμηση πραγματοποιείται στο επίπεδο του MQL ή του ορίου αναφοράς και η δεύτερη σε ένα όριο δράσης (within run precision, εντός προσδιορισμού επαναληψιμότητας), όπως π.χ. το MRL.

4.1.6.1.3. Γραμμικότητα

Η Γραμμικότητα πρέπει να ελέγχεται σε όλο το εύρος της περιοχής μιας αναλυτικής μεθόδου. Αποτελεί σημαντική ιδιότητα μιας αναλυτικής μεθόδου αφού προσδιορίζεται η γραμμικότητα της απόκρισης σε καθαρές πρότυπες ουσίες και σε πραγματικά δείγματα. Συνήθως δεν ποσοτικοποιείται αλλά μπορεί να ελεγχθεί με χρήση ελέγχων σημαντικότητας (significance tests) για μη-γραμμικότητα. Οποιοσδήποτε αποκλίσεις μπορούν να αποδοθούν, ικανοποιητικά, από τη συνολική εκτίμηση πιστότητας για διάφορες συγκεντρώσεις ή να συνυπολογιστούν στις αβεβαιότητες που συνδέονται με τη βαθμονόμηση της μεθόδου.

4.1.6.1.4. Συστηματικό Σφάλμα

Προσδιορίζεται με μελέτες πιστοποιημένων υλικών αναφοράς ή υλικών που έχουν εμβολιαστεί με γνωστή ποσότητα των αναλυτέων ουσιών. Σε κάθε περίπτωση υπολογίζουμε και την τυπική απόκλιση του πλήθους των μετρήσεων. Το συστηματικό σφάλμα δύναται να εκτιμηθεί με συνεχόμενες αναλύσεις διαφορετικών δειγμάτων και συμπίπτει με την επαναληψιμότητα. Επιπλέον, μπορεί να πραγματοποιηθεί η ανάλυση του ίδιου γνωστού δείγματος σε ένα σύστημα προσδιορισμού (π.χ. χρωματογράφος, φασματοφωτόμετρο κ.α.). στη συγκεκριμένη περίπτωση εκτιμάται το συστηματικό σφάλμα του συστήματος προσδιορισμού.

4.1.6.1.5. Όριο Ανίχνευσης

Ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, που μπορεί να ανιχνευθεί με αποδεκτή βεβαιότητα 99%, χωρίς να απαιτείται ακρίβεια στον ποσοτικό προσδιορισμό. Ο υπολογισμός είναι εφικτός από την εξίσωση αναφοράς, σύμφωνα με τους τύπους: $MDL = 3.3SD_b/a$ και $MQL = 10SD_b/a$ όπου SD_b είναι η τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή και a η κλίση της αντίστοιχης ευθείας. Το MDL εκτιμάται χρωματογραφικά ως η συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας, που εμφανίζει απόκριση τριπλάσια του θορύβου στο συγκεκριμένο σημείο της γραμμής βάσης (Their H.P., Zeumer H., 1987).

Σύμφωνα με τα παραπάνω για να υπολογισθεί το MDL πραγματοποιούνται έξι εγχύσεις εκχυλίσματος μητρικού υλικού, που πιστοποιήθηκε ότι είναι ελεύθερο υπολειμμάτων της προς εξέταση ουσίας. Ακολούθως υπολογίζεται το εμβαδόν κορυφής ή ο θόρυβος, που καταγράφεται στον ίδιο χρόνο κατακράτησης με την προς ανάλυση ουσία.

4.1.6.1.6. Όριο Ποσοτικού Προσδιορισμού

Ως όριο ποσοτικού προσδιορισμού ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας, που δύναται να ποσοτικοποιηθεί αξιόπιστα, με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα. Το MQL εκτιμάται χρωματογραφικά ως η συγκέντρωση της ουσίας, που εμφανίζει απόκριση δεκαπλάσια του θορύβου στο συγκεκριμένο

σημείο της γραμμής βάσης. Η παράμετρος η οποία ελέγχθηκε είναι το σήμα/θόρυβος (S/N). Στο MQL πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10$. Σε αντίθεση με το MDL είναι απαραίτητη η απόδειξη ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για έκδοση αποτελεσμάτων στο συγκεκριμένο επίπεδο. Συνήθως συμπίπτει με το επίπεδο αναφοράς και είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση στην οποία επικυρώνεται η μέθοδος.

4.1.6.1.7. Όριο Αναφοράς

Το χαμηλότερο επίπεδο-συγκέντρωση για το οποίο μπορούν να εκδοθούν αξιόπιστα αποτελέσματα. Μπορεί να είναι μεγαλύτερο ή ίσο του MQL, αλλά σε καμιά περίπτωση μικρότερο. Απαιτείται επικύρωση της μεθόδου στο συγκεκριμένο επίπεδο αν δεν έχει πραγματοποιηθεί κατά τον υπολογισμό του MQL.

4.1.6.1.8. Αβεβαιότητα

Η “αβεβαιότητα” ορίζεται ως μια παράμετρος που συνδέεται με το αποτέλεσμα μιας μέτρησης, και χαρακτηρίζει τη διασπορά των τιμών που λογικά μπορούν να αποδοθούν στο προσδιοριζόμενο συστατικό (Θωμαΐδης Ν.Σ., 2012). Όταν η αβεβαιότητα εκφράζεται ως τυπική απόκλιση, τότε αναφέρεται ως τυπική αβεβαιότητα (standard uncertainty, u). Όταν η αβεβαιότητα που προκύπτει από τον μαθηματικό συνδυασμό τυπικών αβεβαιοτήτων κάθε συνιστώσας, σταθμισμένων ανάλογα με το πώς το αποτέλεσμα της μέτρησης μεταβάλλεται από αυτές τότε αναφερόμαστε στην συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (combined standard uncertainty, u_c) και ισούται με την τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των τυπικών αβεβαιοτήτων κάθε συνιστώσας, που συνεισφέρει στην αβεβαιότητα (Κωστάκης Μ. και συνεργάτες, 2012).

$$U_c = (U_1^2 + U_2^2 + \dots + U_n^2)^{1/2} \quad (\text{εξίσωση 4.1})$$

U_1, U_2, U_n οι διάφορες πηγές αβεβαιότητας

Η διευρυμένη αβεβαιότητα (expanded uncertainty, U) εκφράζει ένα μεγαλύτερο διάστημα από την u_c , στο οποίο η τιμή του μετρούμενου μεγέθους έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να υπάρξει. Υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας την U_c με ένα συντελεστή κάλυψης k (coverage factor), ο οποίος λαμβάνει την τιμή 2 στις χημικές μετρήσεις και σε 95% επίπεδο εμπιστοσύνης (Κωστάκης Μ. και συνεργάτες, 2012).

$$U = k \times U_c$$

(εξίσωση 4.2)

k = συντελεστής κάλυψης (≈ 2 για διάστημα εμπιστοσύνης 95%)

Η έννοια της αβεβαιότητας χρησιμοποιείται ευρέως τα τελευταία χρόνια, εξαιτίας της ανάγκης ύπαρξης συγκρίσιμων αποτελεσμάτων αναλυτικών εργαστηρίων, που λειτουργούν με διαφορετικό εξοπλισμό, διαφορετικούς αναλύτες και σε διαφορετικό περιβάλλον.

Οι αβεβαιότητες μπορούν να διακριθούν σε δύο τύπους, ανάλογα με τον τρόπο που έγινε η εκτίμηση της αβεβαιότητας, οι οποίοι και είναι (Κωστάκης Μ. και συνεργάτες, 2012):

1. ΤΥΠΟΥ Α: Όταν η μέθοδος για την εκτίμηση της αβεβαιότητας βασίσθηκε στη χρήση στατιστικής ανάλυσης μιας σειράς αποτελεσμάτων του μετρούμενου αναλυτικού μεγέθους. Οφείλεται σε τυχαία σφάλματα διασκορπισμένα γύρω από μια μέση τιμή (Κωστάκης Μ. και συνεργάτες, 2012).

- Αν το $n < 5$ χρησιμοποιούμε ως τυπική αβεβαιότητα την επαναληψιμότητα (S_L). Επίσης, αν αντί για επαναληψιμότητα έχουμε ενδιάμεση επαναληπτικότητα (S_R), τότε ισχύει ο τύπος

$$S_L = 1.6 \times S_R.$$

- Αν οι επαναλήψεις του δείγματος $n > 5$, τότε η τυπική απόκλιση των επαναλήψεων είναι $S_x = S_L / \sqrt{n}$, οπότε το τελικό αποτέλεσμα εκφράζεται ως $x \pm k \cdot S_L / \sqrt{n}$, όπου $k=2$ (για 95% βαθμό εμπιστοσύνης).

2. ΤΥΠΟΥ Β: Όταν η μέθοδος για την εκτίμηση της αβεβαιότητας βασίσθηκε στη χρήση οποιοδήποτε άλλου τρόπου (π.χ. πιστοποιητικά διακρίβωσης) εκτός της στατιστικής ανάλυσης. Οφείλεται σε συστηματικά σφάλματα,

που παραμένουν σταθερά όταν η μέτρηση επαναλαμβάνεται κάτω από τις ίδιες συνθήκες (Κωστάκης Μ. και συνεργάτες, 2012).

4.1.6.1.9. Εκλεκτικότητα-Διακριτικότητα

Εκλεκτικότητα ορίζεται η ικανότητα μιας μεθόδου (συμπεριλαμβανομένης της εκχύλισης, του σταδίου καθαρισμού, των διαφόρων χημικών αντιδράσεων, του συστήματος διαχωρισμού και ανίχνευσης), να διαχωρίσει ικανοποιητικά την αναλυόμενη ουσία από ξένες ουσίες με παρόμοια συμπεριφορά. Για παράδειγμα ένα σύστημα GC-ECD εκφράζεται ως εκλεκτικό, καθώς ανιχνεύει μια συγκεκριμένη ομάδα χημικών ενώσεων (π.χ. αλογονούχες ενώσεις).

4.1.6.1.10. Ανθεκτικότητα

Έτσι, νοείται η επιδεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου σε αλλαγές των πειραματικών συνθηκών. Τα αποτελέσματα δοκιμών ανθεκτικότητας προσφέρουν, λοιπόν, πληροφορίες σχετικά με την επίδραση διαφόρων σημαντικών παραμέτρων.

4.2. Ανασκόπηση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού παρασιτοκτόνων στο μέλι

Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων στο μέλι είναι περιορισμένες και περιλαμβάνουν την παραλαβή του κλάσματος των υπολειμμάτων με οργανικούς διαλύτες (ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, ισοοκτάνιο-τολουόλιο (9:1), εξανίου:οξικού αιθυλεστέρα (9:1), και ακετόνης) και στην συνέχεια την αφυδάτωση του οργανικού εκχυλίσματος. Φυσικά, η διήθηση του δείγματος είναι απαραίτητη για την προστασία του χρωματογραφικού συστήματος αφού τα υπολείμματα μελιού μπορούν να προκαλέσουν καταστροφή της χρωματογραφικής στήλης και σοβαρές επιμολύνσεις στο σύστημα εισαγωγής του χρωματογραφικού συστήματος.

Οι πλέον πρόσφατες τεχνικές ανάλυσης υπολειμμάτων στο μέλι (2011-2019), περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό δραστικών ουσιών διαφορετικών χημικών ομάδων με μεγαλύτερο εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων οι οποίες περιλαμβάνουν

την χρήση περισσότερων του ενός εκλεκτικών ανιχνευτές (Amendola G. et al., 2011)(Paoloni A. et al., 2016)(Gawel M. et al., 2019) και/ή περισσότερα πειραματικά στάδια στην απομόνωση ενώσεων και τον καθαρισμό του εκχυλίσματος ή/και την χρήση εξειδικευμένων τεχνολογιών εκχύλισης και προσδιορισμού τους αποδεικνύοντας ότι το μέλι αποτελεί ένα από τα πιο δύσκολα υποστρώματα για την επίτευξη καθαρών εκχυλισμάτων και επιθυμητών ορίων ανίχνευσης αναλυτών με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες. Η αρχική απομόνωση του κλάσματος των φυτοπροστατευτικών ουσιών και ακαρεοκτόνων με QuEChERS και διαλύτη εκχύλισης ακετονιτρίλιο φαίνεται να αποτελεί απαραίτητο στάδιο στην ανάλυση των υπολειμμάτων στο μέλι και να συμπεριλαμβάνεται και στις σύγχρονες τεχνικές προσδιορισμού υπολειμμάτων παρά την περιστασιακή εμφάνιση πιο άμεσων και σύγχρονων μεθόδων ανάλυσης. Στον **Πίνακα 4.1.**, παρουσιάζονται οι μέθοδοι εκχύλισης που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών και ακαρεοκτόνων στο μέλι.

Πίνακας 4.1.: Πρόσφατη βιβλιογραφία αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών και ακαρεοκτόνων στο μέλι.

Φυτοφάρμακα	Εκχύλιση	Καθαρισμός	Προσδιορισμός	Αναφορά
80 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού + 10 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g διένυδρου κιτρικού νατρίου και 500 mg κιτρικού δινατρίου).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA + C18) Σε 6 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 900 mg άνυδρ. MgSO₄ + 150 mg PSA + 150 mg C18.	LC-MS/MS GC-ToF	Wiest L. et al., 2011
9 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 10 g μελιού με 10 mL H₂O (που περιείχε 150 μL NH₄OH) και 10 mL ακετονιτρίλιο. Προσθήκη 4 g άνυδρου MgSO₄.	-	LC-MS/MS	Tomasini D. et al., 2012
53 φυτοφάρμακα	QuEChERS: 1 g μελιού στο οποίο έχουν προστεθεί 1.5 mL μεθανόλης και 1 mL κιτρικού διαλύματος (pH 5.6 και 0.17 g mL⁻¹). 1^η εκχύλιση: με 10 mL οξικού αιθυλεστέρα. 2^η εκχύλιση: με 1.5 mL μεθανόλης και 5 mL οξικού αιθυλεστέρα. Συνένωση των δύο οργανικών κλασμάτων και συμπύκνωση έως 5 mL στους 35°C.	SPE: Στήλη με 3 g άνυδρου θειικού νατρίου και florisil (silica απενεργοποιημένη 15.5%) σε αναλογία 1:1. Στη συνέχεια ξέπλυμα με 10 mL εξανίου. Μεταφορά των κλασμάτων και έκλουση με 13 mL οξικού αιθυλεστέρα και εξανίου (1:1.25, v/v).	GC-NPD GC-μECD	López D.R. et al., 2014
30 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 1 g μελιού με 10 mL ακετονιτρίλιο (ACN) και 10 mL H₂O. Προσθήκη αλάτων QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g κιτρικού νατρίου και 0.5 g οξικού κιτρικού νατρίου). Ανακίνηση με το χέρι για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 3 λεπτά στις 4400 rpm.	d-SPE: (MgSO₄ + PSA) Σε 1 mL υπερκείμενου προστέθηκε 150 mg MgSO₄ και 25 mg PSA.	LC-MS/MS	Barganska Z. et al., 2013

167 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 10 g ($\pm 1\%$) μελιού + 20 mL H ₂ O. Ανάδευση (10 λεπτά) και προσθήκη 100 mL οξικού αιθυλεστέρα και 50 g άνυδρου θειικού νατρίου. Το εκχύλισμα εξατμίζεται στους 30°C υπό κενό με τελικό όγκο 10 mL οξικού αιθυλεστέρα. Ανάλυση LC-MS/MS: 1 mL του εκχυλίσματος αραιώθηκε σε 5 mL μεθανόλης και διηθήθηκε μέσω 0.22 μ m PVDF. Ανάλυση GC-ECD: 5 mL του εκχυλίσματος αραιώθηκε σε 2 mL ισοοκτάνιο:τολουόλιο (9:1, v/v) και συμπυκνώθηκε στους 30°C υπό κενό σε περιστροφικό εξατμιστήρα.	-	LC-MS/MS GC-ECD	Christodoulou D.L. et al., 2015
53 φυτοφάρμακα	SPE: (στήλη EXTrelut®NT20) Εκχύλιση 10 g μελιού στο οποίο έχουν προστεθεί 10 mL H ₂ O και 10 mL ακετόνης. Έκλουση με 5×20 mL διχλωρομεθανίου.	-	GC-FPD GC-MSD LC-DD-FI	Amendola G. et al., 2011
50 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού με μίγμα ακετονιτριλίου:νερού, MgSO ₄ και NaCl.	Ο καθαρισμός διεξήχθη με PSA και GCB.	GC-MS/MS	Berrada H. et al., 2011
20 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 10 g μελιού με 10 mL ακετονιτριλίου που περιέχει 1% οξικού οξέος, 4 g MgSO ₄ και 1 g οξικού νατρίου.	d-SPE: (MgSO ₄ + PSA) Σε 1 mL υπερκείμενου προστέθηκε 150 mg MgSO ₄ και 25 mg PSA.	GC-MS/MS	Font G. et al., 2011

200 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 ± 0.02 g μελιού με 10 mL H₂O και 10 mL ακετονιτρίλιο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν τα άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g κιτρικού νατρίου και 0.5 g όξινου κιτρικού νατρίου). Ανακίνηση για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση στις 15.000 rpm για 5 λεπτά.	d-SPE: (MgSO₄ + PSA) Στα 2 mL υπερκείμενο προστέθηκαν 150 mg MgSO₄ και 25 mg PSA.	GC-MS/MS	Shendy A.H. et al., 2016
14 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 3 ± 0.5 g μελιού + 27 mL διαλύματος (55% ακετονιτρίλιο, 44% απιονισμένο νερό, 1% οξικό οξύ και 100 μL από 100 ppb προτύπου) + 1.5 g θειικό νάτριο + 6 g MgSO₄.	15 mL υπερκείμενου εξατμίστηκαν υπό ρεύμα αζώτου σε 4 mL. SPE: C18 cartridges Στήλη με 2 g θειικού μαγνησίου. Διέλευση δείγματος και έκλουση με 10 mL μεθανόλης με 1% οξικό οξύ. Στη συνέχεια, συμπύκνωση σε 2 mL υπό ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια d-SPE: (MgSO₄ + PSA) Προσθήκη 1 mL κλάσματος σε 0.15 g MgSO₄ και 0.05 g PSA.	LC-MS/MS	Naggar Y.A. et al., 2015
52 φυτοφάρμακα	1^{ος} τρόπος QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού + 7.5 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο + 6 g θειικού μαγνησίου + 1 g χλωριούχου νατρίου 2^{ος} τρόπος SPE: (στήλη Oasis HLB cartridge) Εκχύλιση 1.5 g μελιού στο οποίο έχουν προστεθεί 30 mL H₂O (<80°C). Ενεργοποίηση στήλης με 5 mL μεθανόλης και 5 mL H₂O Milli-Q. Έκλουση με 10 mL μεθανόλης:διχλωρομεθάνιου (3:7, v/v).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA + C18) Σε 2 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 150 mg άνυδρ. MgSO₄ + 50 mg PSA + 50 mg C18.	LC-MS/MS	Calatayud-Vernich P. et al., 2016

22 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού με 10 mL H₂O και 10 mL ακετονιτρίλιο. Στη συνέχεια, προστέθηκαν άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g διένυδρο κιτρικό νάτριο και 0.5 g κιτρικό δινάτριο).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA) Στο υπερκείμενο (8 mL) προστέθηκαν 1.2 g MgSO₄ και 0.2 g PSA.	GC-MS/MS LC-MS/MS	Paradis D. et al., 2014
13 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 ± 0.1 g μελιού + 10 mL NaCl (0.5 M) + 10 mL εξανίου. Το εκχύλισμα φυγοκεντρήθηκε για 10 λεπτά στις 4500 rpm.	SPE: Στήλη με 100 mg άνυδρου θειικού νατρίου. Ενεργοποίηση στήλης με 10 mL n-εξανίου. Στη συνέχεια, διέλευση 5 mL εκχυλίσματος. Έκλουση με 10 mL διαιθυλαιθέρα.	GC-μECD GC-MS/MS	Paoloni A. et al., 2016
67 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 10 g μελιού + 20 mL H₂O + 10 mL εξανίου:οξικού αιθυλεστέρα (9:1, v/v)) και άλατα QuEChERS (θειικό μαγνήσιο, χλωριούχο νάτριο).	-	GC-MS/MS	Saitta M. et al., 2017
6 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 2 g μελιού + 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος διβασικού φωσφορικού νατρίου 0.2 M (pH=9) + 12 mL ακετονιτρίλιο + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g τριβασικού διένυδρου κιτρικού νατρίου και 0.5 g διβασικού σεσκυένυδρου κιτρικού νατρίου).	d-SPE: (PSA + C18 + MgSO₄) Προσθήκη 150 mg πρωτοταγούς δευτεροταγούς αμίνη (PSA), 150 mg C18 και 900 mg MgSO₄.	LC-MS/MS	Zheng W. et al., 2018
207 φυτοφάρμακα και νεονικοτινοειδή	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού + 10 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο με 1% οξικό οξύ + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄ και 1 g οξικό νάτριο).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA + Z-Sep) Σε 7 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 1.05 g άνυδρ. MgSO₄ + 0.35 g PSA + 0.35 g Z-Sep.	LC-MS/MS GC-MS/MS	Gawel M. et al., 2019

35 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: Δείγματος μελιού με H₂O, ακετονιτρίλιο και 1.5 g (±0.15 g) χλωριούχο νάτριο.	SPE: Στήλη με άνυδρ. MgSO₄, florisil και ενεργό άνθρακα. Διέλευση εκχυλίσματος (0.5 mL) και έκλουση με n-εξάνιο:ακετόνη (9:1, v/v).	GC-MS	Rafique N. et al., 2018
5 φυτοφάρμακα	SPE: (Carbograph 1, 80-100 mesh size) Διάλυση 1 g μελιού σε 100 mL H₂O. Ενεργοποίηση στήλης με την χρήση 5 mL n-εξανίου, 5 mL τολουολίου, 5 mL ακετόνης και 5 mL H₂O (pH 9). Διέλευση εκχυλίσματος (100 mL) και έκλουση με 8 mL (4x2 mL) τολουόλιο.	-	GC/IT-MS	Notardonato I. et al., 2016
12 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού + 10 mL H₂O + 20 mL ακετονιτρίλιο + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1.5 g διένυδρου κιτρικού τρινατρίου και 1 g χλωριούχο νάτριο).	SPE: Oasis[®] HLB cartridge	LC-MS/MS	Ohba Y. et al., 2018
39 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 10 g από κάθε δείγμα (κερί, τροφή μελισσών και μέλι) + 10 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g χλωριούχο νάτριο, 1 g διένυδρου κιτρικού τρινατρίου και 0.5 g όξινο κιτρικό δινάτριο).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA + Bondesil-C18) Σε 5 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 750 mg άνυδρ. MgSO₄ + 125 mg PSA + 125 mg Bondesil-C18.	LC-MS/MS GC-MS/MS	Lozano A. et al., 2019
9 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 10 g μελιού + 10 mL υδροξείδιο του νατρίου + 40 mL οξικό αιθυλεστέρα + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 3 g οξικού νατρίου και 2 g χλωριούχου νατρίου).	SPE: InertSep[®] MA-1LB cartridge	LC-MS/MS	Nakajima T. et al., 2015

30 φυτοφάρμακα	1^{ος} τρόπος QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού + 10 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g χλωριούχου νατρίου, 1 g κιτρικού νατρίου και 0.5 g όξινο κιτρικό δινάτριο). 2^{ος} τρόπος SLE: Στην περιγραφείσα διαδικασία παρασκευάστηκε δείγμα υδατικού:ακετονιτρίλιου (1:1, v/v) και ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε διχλωρομεθύλιο, το έκλουσμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκε με μεθανόλη:νερό (70:30, v/v).	-	LC-MS/MS	Kujawski M.W. et al., 2014
13 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 2 g μελιού + 10 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g διένυδρου κιτρικού τρινατρίου, 0.5 g όξινο κιτρικό δινάτριο και 1 g χλωριούχο νάτριο).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA) Σε 6 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 900 mg άνυδρ. MgSO₄ + 150 mg PSA.	LC-MS/MS GC-MS/MS	Bommuraj V. et al., 2019
116 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού + 10 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο:οξικού αιθυλεστέρα με 1% οξικό οξύ (70:30 με 1% acetic acid) + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g οξικό νάτριο).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA + Florisil) Σε 1 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 150 mg άνυδρ. MgSO₄ + 50 mg PSA + 50 mg Florisil.	UHPLC-MS/MS	Souza Tette P.A. et al., 2016
28 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 10 g μελιού + 10 mL H₂O + 20 mL οξικού αιθυλεστέρα. Το υπερκείμενο επαναδιαλύθηκε με 20 mL οξικού αιθυλεστέρα και εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκε με 5 mL οξικού αιθυλεστέρα.	SPE: Dual layer Florisil/Na₂SO₄ SPE cartridges. Έκλουση με 10 mL εξάνιο/διαιθυλεστέρα (50:50, v/v).	GC-MS/MS	Panseri S. et al., 2014

115 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: μελιού με H₂O, εξάνιο, ακετονιτρίλιο και άλατα QuEChERS (MgSO₄, NaOAc, PSA).	d-SPE: (PSA + MgSO₄) Προσθήκη πρωτοταγούς δευτεροταγούς αμίνη (PSA) και MgSO₄.	LC-MS/MS	Kasiotis K.M. et al., 2014
24 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 2.5 g μελιού + 5 mL H₂O (με 0.1 mol L⁻¹ Na₂EDTA) + 5 mL ακετονιτρίλιο + άλατα QuEChERS (6 g MgSO₄, 1.5 g NaCl).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA) Σε 2 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 120 mg άνυδρ. MgSO₄ + 100 mg PSA.	GC-ECD	Orso D. et al., 2014
18 φυτοφάρμακα	QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού + 10 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο + άλατα QuEChERS (4 g MgSO₄, 1 g NaCl, 1 g κιτρικό νάτριο και 0.5 g σεσκυένυδρου κιτρικού νατρίου).	d-SPE: (MgSO₄ + PSA) Σε 1 mL υπερκείμενου προστέθηκαν 150 mg άνυδρ. MgSO₄ + 25 mg PSA.	GC-μECD	Malhat F.M. et al., 2015
7 νεονικοτινοειδή	1^{ος} τρόπος QuEChERS: Ανάμιξη: 5 g μελιού + 10 mL H₂O + 10 mL ακετονιτρίλιο:οξικό αιθυλεστέρα (70:30, v/v) + άλατα QuEChERS (2 g MgSO₄, 1 g οξικό νάτριο, 1.5 g κιτρικό νάτριο και 0.5 g σεσκυένυδρου κιτρικού νατρίου). 2^{ος} τρόπος SPE: (Strata® X cartridge) Διάλυση 5 g μελιού σε 10 mL H₂O. Ενεργοποίηση στήλης με την χρήση 5 mL μεθανόλης και 5 mL H₂O. Διέλευση εκχυλίσματος (10 mL) και έκλουση με 4 mL ακετονιτρίλιο:οξικό αιθυλεστέρα (80:20, v/v).	-	UHPLC-MS-MS	Valverde S. et al., 2018

ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΕΡΕΥΝΑΣ

Σύμφωνα με τα στοιχεία που παρατέθηκαν στο θεωρητικό μέρος της διατριβής, η επιβάρυνση των προϊόντων κυψέλης με υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών και λοιπών περιβαλλοντικών ρύπων οφείλεται σε δύο παράγοντες. Ο πρώτος παράγοντας είναι το περιβάλλον, διαμέσου του οποίου εισέρχονται στην κυψέλη υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ενώσεων, αντιβιοτικών, βαρέων μετάλλων, PCBs κ.α.. Η παρουσία των περιβαλλοντικών ρύπων στα προϊόντα κυψέλης δεν θεωρείται δεδομένη, καθώς τα αποτελέσματα των σχετικών ερευνών είναι σε πολλές περιπτώσεις αντικρουόμενα. Σε αρκετές περιπτώσεις, η ανάλυση των προϊόντων της μέλισσας είχε ως αποτέλεσμα τη διαπίστωση της παρουσίας πολύ χαμηλών έως οριακά ανιχνεύσιμων συγκεντρώσεων υπολειμμάτων περιβαλλοντικών ρύπων, ενώ σε άλλες περιπτώσεις διαπιστώθηκε η παρουσία επικίνδυνων ουσιών, όπως των πολυχλωροδιφαινυλίων (PCBs) και των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονάνθρακων (PAHs) σε συγκεντρώσεις που δεν ξεπερνούσαν τα MDLs και 7.7 ng g^{-1} αντίστοιχα, σε ποσοστό 46.8% των δειγμάτων (Saitta M. et al., 2017). Ο δεύτερος παράγοντας αφορά στον ίδιο το μελισσοκόμο (παραγωγική διαδικασία), που με τις επεμβάσεις του επιβαρύνει τα προϊόντα με υπολείμματα αντιβιοτικών, ακαρεοκτόνων και πτητικών εντομοκτόνων. Στην περίπτωση των υπολειμμάτων που οφείλονται στις επεμβάσεις που πραγματοποιεί ο μελισσοκόμος στην κυψέλη, τα αποτελέσματα των μελετών συγκλίνουν μεταξύ τους. Ερωτηματικό στη συγκεκριμένη περίπτωση αποτελεί η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση υπολειμμάτων, σε σχέση με τη δραστική ουσία και τον τρόπο εφαρμογής της. Έτσι, ο έλεγχος των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι και τα υπόλοιπα προϊόντα κυψέλης είναι απαραίτητος για την προστασία του καταναλωτή. Ωστόσο, η νομοθεσία για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στο μέλι είναι περιορισμένη και έρχεται σε αντιδιαστολή με το όλο και πιο αυστηρό νομοθετικό πλαίσιο που αναπτύσσεται γύρω από τον καθορισμό των ποιοτικών χαρακτηριστικών του. Έτσι, η επικύρωση των μεθόδων πραγματοποιήθηκε με βάση την ισχύουσα νομοθεσία της Ε.Ε., όπως αυτή ορίζεται στις οδηγίες 2002/657/EK και SANTE 11813/2017. Σε όλα τα ανωτέρω όπως έχει υποδειχτεί στο θεωρητικό μέρος εισέρχεται και η αναλυτική δυσκολία που παρουσιάζουν τα υποστρώματα και

ιδιαίτερα του μελιού στον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων ο οποίος κατά βάση πραγματοποιείται με υγρή και αέρια χρωματογραφία. Έτσι, οι αναλυτικές μεθοδολογίες προσδιορισμού υπολειμμάτων που συνήθως προτείνονται περιλαμβάνουν δραστικές ουσίες από την ίδια χημική κατηγορία φυτοφαρμάκων με επικρατέστερη κατηγορία αυτή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων ενώ οι πολύ-υπολειμματικές μέθοδοι προσδιορισμού δραστικών ουσιών από διαφορετικές χημικές κατηγορίες φυτοφαρμάκων είναι περιορισμένες και έχουν προταθεί στην πρόσφατη βιβλιογραφία.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα ανωτέρω στοιχεία, στην παρούσα διατριβή επιλέχθηκε να μελετηθεί η υπολειμματικότητα των amitraz, bromopropylate, coumaphos και tau-fluvalinate που έχουν χρησιμοποιηθεί εντατικά στην μελισσοκομία, στο μέλι. Οι δραστικές ουσίες που επιλέχθηκαν να μελετηθούν έχουν πολικότητα, log Kow από 4.13 έως 7.02, και περιλαμβάνουν ενώσεις ακαρεοκτόνου δράσης της κατηγορίας των φορμαμιδινών, οργανοαλογονωμένων, οργανοφωσφορικών και πυρεθροειδών. Για λόγους που προαναφέρθηκαν ανάμεσα στις ενώσεις που επιλέχθηκαν να μελετηθούν συμπεριλήφθηκαν και μη εγκεκριμένες πλέον στην μελισσοκομία. Έτσι, ο πρώτος και βασικότερος στόχος για την μελέτη των 4 δραστικών ουσιών στο μέλι ήταν η ανάπτυξη της αναλυτικής μεθοδολογίας προσδιορισμού τους χρησιμοποιώντας την τεχνική της εκχύλισης QuEChERS των αναλυτών, η οποία συνδυάζει τα πλεονεκτήματα αφ' ενός μειώνει τον όγκο των διαλυτών και αφ' ετέρου έχει χαμηλό κόστος και δεν απαιτεί την χρήση ειδικού εξοπλισμού. Ο καθαρισμός του εκχυλίσματος επιλέχθηκε να μελετηθεί με την τεχνική εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης (d-SPE) σε συνδυασμό με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-UV/DAD). Η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων στα δείγματα μελιού πραγματοποιήθηκε με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS) και με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

B. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Κεφάλαιο 5

Υλικά και Μέθοδοι

5.1. Χημικά, υλικά και όργανα

5.1.1. Δείγματα μελιού

Κατά την διεξαγωγή της διατριβής χρησιμοποιήθηκαν και αναλύθηκαν οκτώ κατηγορίες μελιού: πεύκου, ελάτης, θυμαρίσιου, ανθέων, κωνοφόρων, φασκόμηλου, από άνθη εσπεριδοειδών και πορτοκαλιάς. Όλα τα δείγματα μετά την παραλαβή τους στο εργαστήριο χειρίστηκαν κατά τις οδηγίες του Codex Alimentarius Commission, Guidelines on Good Laboratory Practice in Pesticide Residue Analysis, 1993. Στις επόμενες παραγράφους περιγράφονται τα επιμέρους δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν.

Για την ανάπτυξη της μεθόδου εκχύλισης και την μελέτη των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεγμένων δραστικών ουσιών φυτοπροστασίας του μελιού, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 19 δείγματα τυποποιημένου μελιού και 17 δείγματα μελιού από παραγωγούς. Από τα τυποποιημένα μέλια έξι (6) από τα 19 δείγματα ήταν θυμαρίσιο μέλι και αγοράστηκαν τον Φεβρουάριο του 2016 ενώ τα υπόλοιπα 13 δείγματα αγοράστηκαν από τον Φεβρουάριο του 2016 έως τον Φεβρουάριο του 2019. Από παραγωγούς τα δείγματα μελιού συλλέχτηκαν από τον Ιανουάριο του 2019 έως τον Νοέμβριο του 2019. Τα ακριβή στοιχεία των δειγμάτων μελιού παρουσιάζονται στο **Παράρτημα Ι** της διατριβής. Όλα τα δείγματα μετά την παραλαβή τους φυλάχτηκαν σε δροσερό και σκιερό μέρος, μέχρι την περαιτέρω ανάλυσή τους.

Για την ανάπτυξη και μελέτη της μεθόδου εκχύλισης των τεσσάρων δραστικών ουσιών από το μέλι χρησιμοποιήθηκαν τρία μέλια βιολογικής παραγωγής. Η διαφορετικότητα των δειγμάτων διασφαλίστηκε επιλέγοντας ένα μέλι από πεύκο βιολογικής παραγωγής, ένα μέλι από άνθη και άνθη φασκόμηλου βιολογικής παραγωγής και ένα μέλι από έλατο και βότανα βιολογικής παραγωγής, του νομού Ιωαννίνων.

5.1.2. Πρότυπες ενώσεις και διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν

Πρότυπες ουσίες

Όλες οι πρότυπες ενώσεις αγοράστηκαν από την Sigma Aldrich (Aldrich Chemical Co). Στον **Πίνακα 5.1.** παρουσιάζονται οι πρότυπες ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στις αναλύσεις της παρούσας διατριβής και η καθαρότητα τους.

Πίνακας 5.1. Καθαρότητα των προτύπων δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν.

Δραστική ουσία	% Καθαρότητα
Amitraz	98.8
Bromopropylate	99.2
Coumaphos	99
Tau-fluvalinate	93.4

Πρότυπα διαλύματα

Τα πυκνά πρότυπα διαλύματα (stock solutions) για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση παρασκευάστηκαν ξεχωριστά, σε συγκέντρωση 1600 mg L^{-1} . Γυάλινη ογκομετρική φιάλη των 10 mL τοποθετήθηκε σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων KERN ACS 80-4N (Balingen, Germany) και ζυγίστηκαν περίπου 16 mg από την κάθε ένωση (σε θερμοκρασία 20°C). Προστέθηκε μεθανόλη καθαρότητας LC-MS, η φιάλη πωματίστηκε με γυάλινο πώμα και ακολούθησε πρώτα διαλυτοποίηση με μηχανική ανάδευση σε συσκευή περιδίνησης Vortex IR της STARLAB, (Hamburg, Germany) και στη συνέχεια παραμονή για δέκα λεπτά σε συσκευή υπερήχων Elmasonic P του οίκου Elma Schmidbauer (Singen, Germany). Τα ομογενοποιημένα διαλύματα ελέγχθηκαν ως προς την ποιότητα τους με την καταγραφή ενός φάσματος μαζών τους και τελικά μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 8 mL αεροστεγώς κλεισμένα με πώμα και αποθηκεύτηκαν στους -20°C .

Τα αραιωμένα πρότυπα διαλύματα εργασίας (working solutions) των επιλεγμένων ενώσεων παρασκευάστηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις με κατάλληλες αραιώσεις σε μεθανόλη με τη χρήση γυάλινων μικροσυρίγγων χωρητικότητας 5 μL , 10 μL , 50 μL , 100 μL , 250 μL και 500 μL , της εταιρίας Innovative

Labor Systeme (Stützerbach, Germany). Τα διαλύματα εργασίας φυλάσσονταν στους 4°C.

5.1.3. Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα και στις αναλύσεις υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων ήταν υψηλής καθαρότητας, κατάλληλοι για ανάλυση σε συστήματα χρωματογραφίας. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν μεθανόλη (methanol, MeOH) και ακετονιτρίλιο (acetonitrile, ACN) ενώ το διχλωρομεθάνιο (methyl chloride, DCM) ήταν καθαρότητας >99.5% και προμηθεύτηκαν από τη Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Ο οξικός αιθυλεστέρας (ethyl acetate) καθαρότητας >99.8% ήταν του οίκου Lab Scan Analytical Sciences (Gliwice, Poland). Επίσης, χρησιμοποιήθηκε υπερ-καθαρό νερό (ultra-pure water) αγωγιμότητας <0.055 $\mu\text{S}/\text{cm}$, παρεχόμενο από τη συσκευή παραγωγής υπερ-καθαρού νερού Evoqua Ultrapure Water System Ultra Clear 20 TWF EDI (Evoqua Water Technologies, Pittsburgh, USA) σε όλα τα στάδια, πλην αυτού της παρασκευής του εκλουστικού συστήματος για τη χρωματογραφική διάταξη, όπου χρησιμοποιήθηκε νερό καθαρότητας LC-MS. Για τον τελικό καθαρισμό των γυάλινων σκευών χρησιμοποιήθηκε ακετόνη technical grade.

5.1.4. Αντιδραστήρια

Για την εφαρμογή της μεθόδου MSPD χρησιμοποιήθηκαν: silica gel (SiO_2) υψηλής καθαρότητας (pore size 60A, 70-230 mesh, 63-200 μm) του οίκου Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany), glass wool του οίκου Merck (Darmstadt, Germany), άνυδρο θειικό νάτριο (sodium sulfate, Na_2SO_4) του οίκου Merck (Darmstadt, Germany) και Florisil®P (magnesium silicate, MgSO_3Si) του οίκου Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germany).

Για τη βελτιστοποίηση και εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS χρησιμοποιήθηκαν: άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) καθαρότητας 99.5%, χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, NaCl) του οίκου Riedel de Haën (Hannover, Germany), κιτρικό νάτριο 99% (tri-sodium citrate dehydrate) του οίκου Merck (Darmstadt, Germany), σεσκιυδρίτης

διβασικού κιτρικού νατρίου 99% (sodium citrate dibasic sesquihydrate) του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα προσροφητικά: Πρωτοταγής Δευτεροταγής Αμίνη, (Primary Secondary Amine, PSA, 40 μm) και C18, LiChroprep RP-18, 40–64 μm , του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).

5.1.5. Υλικά και σκεύη

Για την εφαρμογή των μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν :

- ✓ Κατά την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων και τον καθαρισμό των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν πλαστικοί σωλήνες φυγοκέντρου τύπου falcon της Sarstedt (Nümbrecht, Germany) από πολυπροπυλένιο, χωρητικότητας 50 mL και 15 mL αντίστοιχα.
- ✓ Πορσελάνινο γουδί (ιγδίο) και γουδοχέρι που χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή του μελιού σε πολύ λεπτή σκόνη
- ✓ Σε όλες τις περιπτώσεις, πριν από την έγχυση στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας, τα δείγματα διηθήθηκαν σε φίλτρα σύριγγας με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), με διάμετρο πόρων 0.22 μm και 0.45 μm , του οίκου Millipore (Cork, Ireland).
- ✓ Τα δείγματα διηθήθηκαν με τη βοήθεια αποστειρωμένων συρίγγων μιας χρήσης όγκου 1 mL ή 2.5 mL.
- ✓ Για την έγχυση και ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα φιαλίδια δειγμάτων (2 mL) με βιδωτό πώμα και septa και micro-inserts (200 μL), κατάλληλα για χρωματογραφία.
- ✓ Στο πειραματικό μέρος χρησιμοποιήθηκαν φιαλίδια των 8 mL με βιδωτά πώματα
- ✓ Ποτήρια ζέσης των 100, 250, 500 και 1000 mL
- ✓ Ογκομετρικές φιάλες των 10 mL
- ✓ Βαθμονομημένα σιφώνια των 1, 2, 5 και 10 mL
- ✓ Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν μεταλλικές σπάτουλες διαφόρων μεγεθών, ταινία parafilm, διηθητικό χαρτί και αλουμινόχαρτο.

5.1.6. Όργανα-Συσκευές

Ο εξοπλισμός που αναφέρεται παρακάτω χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και επικύρωση των μεθόδων, καθώς επίσης και για την ανάλυση των δειγμάτων.

- ✓ Αναλυτικός ζυγός του οίκου Kern, μοντέλο ACS 80-4, τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (GOTTLE KERN & SOHN, Balingen-Frommern, Germany) χρησιμοποιήθηκε για το ζύγισμα των δειγμάτων.
- ✓ Ομογενοποιητής Vortex-2 genie, μοντέλο G560E του οίκου Scientific Industries INC. (Bohemia, N.Y., USA) χρησιμοποιήθηκε για την διάλυση και ομογενοποίηση των δειγμάτων και των πρότυπων διαλυμάτων.
- ✓ Φυγόκεντρος με μέγιστης ταχύτητας περιστροφής 4000 rpm του οίκου Jouan SA, μοντέλο B4i (Saint-Herblain, France) χρησιμοποιήθηκε για το διαχωρισμό του στερεού υπολείμματος και την παραλαβή της υπερκείμενης υγρής φάσης κατά την ανάλυση των δειγμάτων.
- ✓ Η συμπύκνωση των εκχυλισμάτων πραγματοποιήθηκε με θερμαινόμενη συσκευή συμπύκνωσης υπό ήπιο ρεύμα αζώτου Techne Dri-Block DB-3D (Staffordshire, UK).
- ✓ Για τη μέτρηση πολύ μικρών όγκων (4-1000 μ L) που απαιτούνταν στην παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν μικροσύριγγες μεταβλητού όγκου του οίκου ILS (Innovative Labor System GmbH, Germany).
- ✓ Η φύλαξη και συντήρηση των προτύπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν ψυγεία με θερμοκρασία λειτουργίας 4–8°C και καταψύκτες ελάχιστης θερμοκρασίας -30°C.

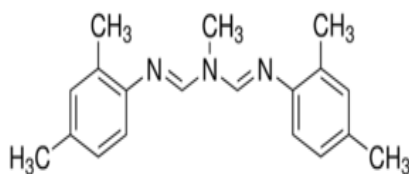
5.1.7. Επιλογή των δραστικών ουσιών και ταυτοποίηση των επιλεχθέντων ενώσεων με υγρή χρωματογραφία

Στον **Πίνακα 5.2.**, παρουσιάζονται οι χημικές δομές των 4 δραστικών ουσιών που επιλέχτηκαν να μελετηθούν ανά την χημική κατηγορία που αντιπροσωπεύουν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-UV/DAD), ενώ στον **Πίνακα 5.3.** παρουσιάζονται οι βασικές φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Πίνακας 5.2. Ενώσεις που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ανά χημική κατηγορία με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας.

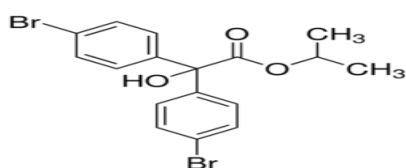
Δραστικές Ουσίες που προσδιορίστηκαν με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-UV/DAD)

1. Φορμαμιδίνη εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο



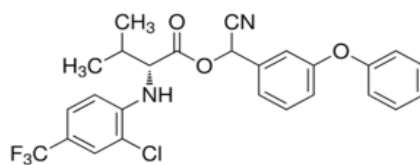
Amitraz

2. Οργανοαλογονωμένα εντομοκτόνα-ακαρεοκτόνα



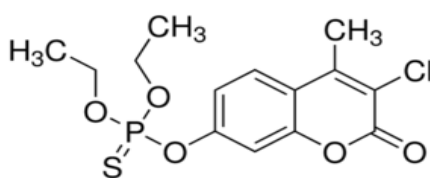
Bromopropylate

3. Πυρεθροειδή εντομοκτόνα-ακαρεοκτόνα



Tau- fluvalinate

4. Οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα-ακαρεοκτόνα



Coumaphos

Οι δραστικές ουσίες επιλέχθηκαν με κριτήρια την εκτεταμένη χρήση τους στην μελισσοκομία, την πιθανότητα αυξημένης υπολειμματικότητάς των προϊόντων κυψέλης από φυτοπροστατευτικές ουσίες τις οποίες χρησιμοποιούν οι μελισσοκόμοι για να αντιμετωπίσουν τις ασθένειες των μελισσών.

Πίνακας 5.3. Βασικές φυσικοχημικές ιδιότητες των επιλεχθέντων δραστικών ουσιών.

Δραστική ουσία	Σ.Τ. ^α (°C)	M.B.	Δ _{H2O} ^β (mg/l)	Log Kow	Vp ^γ (mmHg)	Henry's Law constant ^δ (atm m ³ /mol)
Amitraz	86-87	293.41	1.0	5.5	2.0 x 10 ⁻⁶	9.87 x 10 ⁻⁶
Bromopropylate	77	428.1	0.1	5.4	8.2 x 10 ⁻⁸	4.6 x 10 ⁻⁷
Coumaphos	90-92	362.77	1.5	4.13	10 ⁻⁷	3.1 x 10 ⁻⁸
Tau-Fluvalinate	25	502.91	0.012	7.02	<1 x 10 ⁻⁷	1.18 x 10 ⁻⁹

^α Σημείο Τήξεως, ^β Διαλυτότητα στο νερό, ^γ Τάση Ατμών, ^δ Σταθερά Henry.

Πηγή: The agrochemicals Handbook, second edition, Royal Society Chemistry.

Ένα από τα τέσσερα φυτοφάρμακα που επιλέχθηκαν να μελετηθούν ανήκει στα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα-ακαρεοκτόνα (coumaphos) τα οποία κατέχουν την κυρίαρχη θέση στην προστασία των μελισσών. Από τις άλλες κατηγορίες εντομοκτόνων-ακαρεοκτόνων επιλέχθηκαν να μελετηθούν μία πυρεθροειδή ένωση (tau-fluvalinate), μία φορμαμιδίνη το amitraz και το οργανοαλογονωμένο εντομοκτόνο-ακαρεοκτόνο bromopropylate. Ο υπολειμματικός προσδιορισμός των δραστικών ουσιών επιτεύχθηκε με την χρήση των μεθόδων της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-UV/DAD).

5.2. Ανάπτυξη αναλυτικών μεθοδολογιών και εφαρμογές τους

5.2.1. Εμβολιασμός δειγμάτων μελιού στις αναλυτικές διαδικασίες

Οι συγκεντρώσεις των εμβολισμένων δειγμάτων μελιού με το μίγμα των επιλεγμένων δραστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα των ανακτήσεων και της μελέτης της περιοχής γραμμικότητας της μεθόδου εκχύλισης και καθαρισμού, κυμάνθηκαν από 10-1000 μg kg⁻¹. Ο εμβολιασμός των δειγμάτων μελιού με το πρότυπο μίγμα φυτοφαρμάκων πραγματοποιήθηκε προσθέτοντας κατάλληλη ποσότητα από ένα πρότυπο διάλυμα εργασίας των επιλεχθέντων δραστικών ουσιών συγκέντρωσης 0.5-5 mg L⁻¹ σε ζυγισμένη ποσότητα 5 g (με ακρίβεια τρίτου δεκαδικού ψηφίου). Η προσθήκη του κατάλληλου όγκου μίγματος φυτοφαρμάκων πραγματοποιήθηκε κατά την μέθοδο της διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD) είτε απευθείας στην ζυγισμένη

ποσότητα μελιού είτε στο διαλύτη εκχύλισης (διχλωρομεθάνιο/οξικό αιθυλεστέρα, 9:1, v/v), ενώ κατά την μέθοδο QuEChERS είτε απευθείας στην ζυγισμένη ποσότητα μελιού είτε στην ποσότητα του υπερκάθαρου νερού, τα διαλύματα αναδεύτηκαν και παρέμειναν προς ισορροπία, για 5 min πριν την περαιτέρω επεξεργασίας τους.

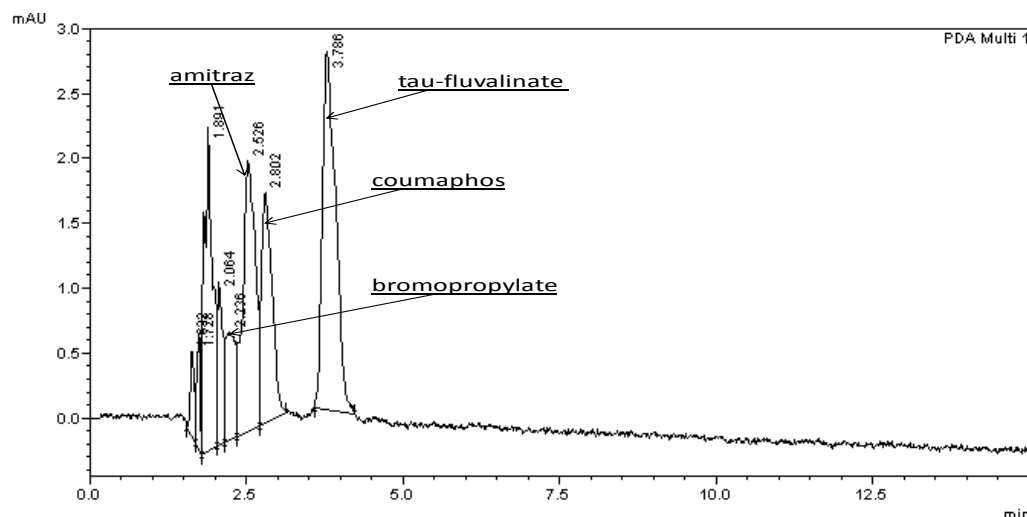
5.2.2. Συστήματα χρωματογραφίας

5.2.2.1. Ανάλυση των επιλεγμένων δραστικών ουσιών με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, σειριακό φωτοδιόδων (HPLC-UV/DAD).

Η ανάλυση των επιλεγμένων δραστικών ουσιών πραγματοποιήθηκε σε υγρό χρωματογράφο της Shimadzu (Kyoto, Japan) μοντέλου αντλίας LC-10ADVp σε σύνδεση με 6-θυρών βαλβίδα έγχυσης μοντέλου 7725i Rheodyne. Ο ανιχνευτής ήταν υπεριώδους ακτινοβολίας σε σύστημα συστοιχίας διόδων μοντέλου SPD-M10AVp. Η συσκευή της HPLC περιλάμβανε επιπλέον σύστημα απαέρωσης της κινητής φάσης DGU-14A και σύστημα μίξης των διαλυτών FCV-10AL. Οι δραστικές ουσίες διαχωρίστηκαν σε αναλυτική στήλη Discovery C18 (15 cm x 4.6 mm εσωτερική διάμετρος: 5 μm μέγεθος σωματιδίων) της Supelco (Bellefonte, PA, USA). Ο ανιχνευτής ρυθμίστηκε στα 249 nm για το amitraz, 233 nm για το bromopropylate, 313 nm για το coumaphos και 254 nm για το tau-fluvalinate. Για το διαχωρισμό των δραστικών ουσιών χρησιμοποιήθηκε ισοκρατικό σύστημα έκλουσης (Isocratic elution) με κινητή φάση η οποία αποτελείται από ακετονιτρίλιο/νερό με 0.05 % οξικό οξύ (ACN/H₂O + 0.05 % Acetic acid: 80/20, v/v + 0.05 % acetic acid) με ταχύτητα ροής 1.0 mL min⁻¹. Η θερμοκρασία του φούρνου είναι 27°C, ενώ ο όγκος έγχυσης 20 μL. Το σύστημα έγχυσης (loop) εκπλένεται πριν από κάθε έγχυση (injection). Στο **Σχήμα 5.1**, δίνετε το χρωματογράφημα επιλεγμένων προτύπων μειγμάτων σε συγκέντρωση 100 μg kg⁻¹.

Πίνακας 5.4. Χρόνοι κατακράτησης (t_R , min), μέγιστα μήκη κύματος και γραμμικότητα ανά φυτοφάρμακο.

Φυτοφάρμακα	Retention time (min)	R^2	Wavelength(nm)
Amitraz	2.5	0.9998	249
Coumaphos	2.8	0.9997	313
Bromoprorylate	2.23	0.9998	233
Tau-fluvalinate	3.78	0.9999	254



Σχήμα 5.1. Χρωματογράφημα των επιλεγμένων ενώσεων HPLC-UV/DAD πρότυπου μείγματος ($100 \mu\text{g kg}^{-1}$).

5.2.2.2. Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των επιλεγμένων δραστικών ουσιών στα δείγματα μελιού με την μέθοδο της υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS.

Η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με χρήση στήλης Fortis Diphenyl (50 mm x 2.1 mm, 2.6 μm) και βαθμωτού προγράμματος έκλουσης, όπου η κινητή φάση αποτελούνταν από (Α) νερό (0.1% φορμικό οξύ) και (Β) μεθανόλη (0.1% φορμικό οξύ). Για το διαχωρισμό των ενώσεων, χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης συνολικής διάρκειας 10 λεπτών. Η αρχική σύσταση διαλυτών ήταν 95% (Α) και 5% (Β). Η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή για 1 min και στη συνέχεια το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε έως ότου φτάσει το 70% στα 3 min. Το ποσοστό μεθανόλης αυξήθηκε εκ νέου σε 100% έως τα 6 min. Τελικά το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Η ταχύτητα ροής (flow rate) ήταν σταθερή στα 400 $\mu\text{L min}^{-1}$ και ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) ήταν 5 μL . Η

θερμοκρασία του φούρνου (oven temperature) ήταν σταθερή στους 27°C. Το βαθμωτό πρόγραμμα έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε φαίνεται **στον Πίνακα 5.5.**

Πίνακας 5.5. Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης.

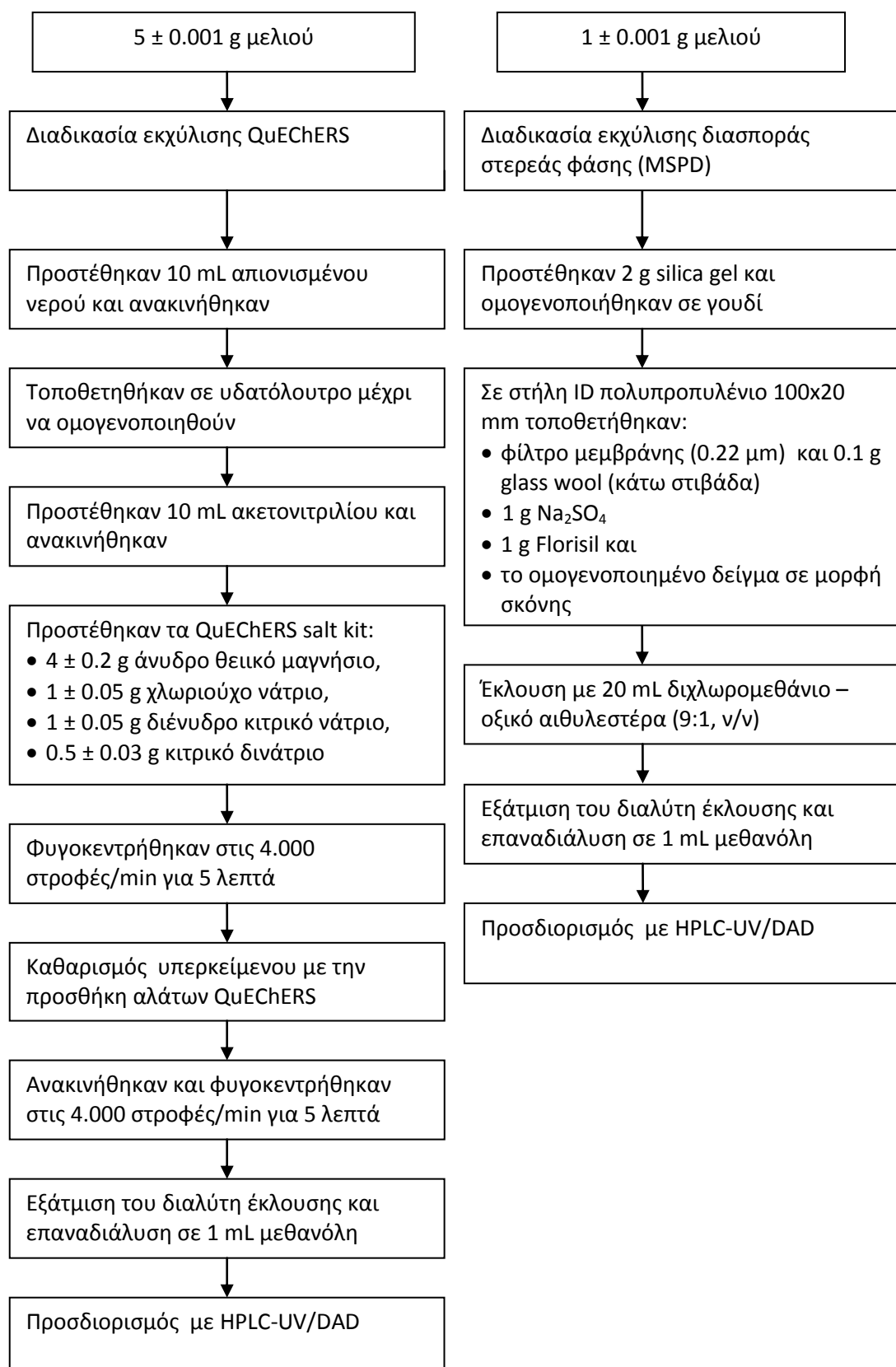
Χρόνος (min)	% A (H ₂ O, 0.1% FA)	% B (MeOH, 0.1% FA)	Ταχύτητα ροής (μL min ⁻¹)
0	95	5	400
1	95	5	400
3	30	70	400
6	0	100	400
9,10	95	5	400
10	95	5	400

5.2.2.3. Επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων των επιλεγμένων δραστικών ουσιών στα δείγματα μελιού με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Η αρχική θερμοκρασία στήλης ήταν 70°C και έφτασε στην τελική των 250°C σε δύο στάδια. Ξεκίνησε με ρυθμό ανόδου 8 °C min⁻¹ μέχρι τους 130°C, όπου παρέμεινε για δύο λεπτά και συνέχισε με ρυθμό ανόδου 6 °C min⁻¹ μέχρι τους 250°C, όπου παρέμεινε για 3 min. Η αρχική θερμοκρασία του εισαγωγέα ήταν 250°C και ακολούθησε τη θερμοκρασία της στήλης στη διάρκεια της ανάλυσης (θερμοκρασία στήλης +3°C). Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η MEGA-5MS της MEGA Capillary columns laboratory με διαστάσεις 30 m x 0.25 mm, 0.25μm. Το φερών αέριο ήταν He με σταθερή ροή 1 mL min⁻¹. Ο όγκος έγχυσης ήταν 1 μL και το λογισμικό που χρησιμοποιήθηκε για τον έλεγχο του GC και την επεξεργασία των δεδομένων ήταν της Shimadzu GC-MS to Realtime analysis και Postrun analysis.

5.2.3. Ανάπτυξη μεθόδου εκχύλισης και καθαρισμού των 4 δραστικών ουσιών από το μέλι

Οι πειραματικές πορείες που περιγράφονται στις **Παραγράφους 5.2.3.1.** και **5.2.3.2.** ακολουθήθηκαν κατά την ανάπτυξη της μεθόδου εκχύλισης και καθαρισμού των 4 δραστικών ουσιών από το μέλι. Η γενική πορεία ανάπτυξης της μεθόδου παρουσιάζεται στο **Σχήμα 5.2.**



Σχήμα 5.2. Πορεία που ακολουθήθηκε για την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου εκχύλισης και καθαρισμού στον προσδιορισμό των 4 δραστικών ουσιών στο μέλι.

5.2.3.1. Τεχνική εκχύλισης διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD) που δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά της στην ανάκτηση των επιλεγμένων δραστικών από το μέλι

Το πρώτο βήμα στην διαδικασία απαιτεί τη ζύγιση 1 ± 0.001 g μελιού σε ζυγό ακριβείας και τοποθετείται σε πορσελάνινο γουδί. Ακολουθεί προσθήκη στο ιγδίο 2 g silica gel ως προσροφητικό υλικό διασποράς. Ακολουθεί ομογενοποίηση του δείγματος μέχρι να παραληφθεί ένα ομογενές ξηρό μίγμα σε μορφή σκόνης. Το διασπαρμένο στη στερεά φάση πλέον υπόστρωμα, μεταφέρεται ποσοτικά με τη χρήση χωνιού σε κατάλληλη σύριγγα-μικροστήλη των 10 mL, στο κάτω μέρος της οποίας είχε προσαρμοστεί φίλτρο μεμβράνης (0.22 μ m) και υαλοβάμβακας (glass wool). Στην κορυφή της μικροστήλης εφαρμόζεται επιπλέον 1 g θειικού νατρίου (Na_2SO_4) και 1 g Florisil και ασκείται ελαφρά πίεση με το έμβολο της σύριγγας, που σκοπό έχει την αφαίρεση αέρα και την αποφυγή δημιουργίας ανεπιθύμητων καναλιών. Η εκχύλιση των αναλυτών ολοκληρώνεται με την χρήση 20 mL διχλωρομεθάνιο-οξικό αιθυλεστέρα (9:1, v/v). Η έκλουση αρχικά πραγματοποιείται με τη βαρύτητα και τέλος εφαρμόζεται μικρό κενό. Το έκλουσμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου και ακολουθεί επαναδιάλυση σε 1 mL μεθανόλη. Τέλος μεταφέρεται σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη και γίνεται έγχυση σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-UV/DAD).

5.2.3.2. Τεχνική εκχύλισης QuEChERS που δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά της στην ανάκτηση των επιλεγμένων δραστικών από το μέλι

Στο πρώτο στάδιο της εκχύλισης, 5 ± 0.001 g μελιού ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε σωλήνες πολυπροπυλενίου τύπου falcon των 50 mL. Στη συνέχεια προστέθηκαν 10 mL κρύου απεσταγμένου νερού, το δείγμα παρέμεινε 10 min για επαρκή επανυδάτωση του ιζήματος, ανακινήθηκε για 1 min σε vortex και έπειτα προστέθηκαν 10 mL ACN. Ο δοκιμαστικός σωλήνας κλείσθηκε ερμητικά και ανακινήθηκε 1 min σε vortex (4000 rpm). Ακολούθως προστέθηκαν 4 g MgSO_4 , 1 g NaCl, 1 g κιτρικό νάτριο (tri-sodium citrate dehydrate) και 0.5 g σεσκιωδρίτης διβασικού κιτρικού νατρίου (sodium citrate dibasic sesquihydrate) και ο σωλήνας

ανακινήθηκε αμέσως μετά την προσθήκη για 1 min χειροκίνητα για την παρεμπόδιση σχηματισμού κρυσταλλικών συσσωματωμάτων και για να εξασφαλιστεί επαρκής αλληλεπίδραση διαλύτη με όλο το δείγμα και 1 min στο vortex. Ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 min στις 4000 rpm. Το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) διεξήχθη με τεχνική εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης (dispersive SPE). Κατά τη φάση αυτή, κλάσμα από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρισης των 15 mL ο οποίος περιείχε κατάλληλη ποσότητα αλάτων. Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex για 1 min και φυγοκέντριση για 5 min στις 4000 rpm. Κάθε έκλουσμα συμπυκνώθηκε κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε 1 mL μεθανόλη. Τα τελικά εκχυλίσματα λήφθηκαν με πιπέτες pasteur και διηθήθηκαν μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE, 0.22 μm για να μεταφερθούν τελικά σε υάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτά πώματα με septa τεφλόν-σιλικόνης, συμβατά με αυτόματους δειγματολήπτες για τη χρωματογραφική ανάλυση.

5.2.3.2.1. Τεχνικές καθαρισμού του υπερκείμενου που προέκυψε από την εκχύλιση QuEChERS που δοκιμάστηκε για την αποτελεσματικότητά της στην ανάκτηση των επιλεγμένων δραστικών από το μέλι

Το υπερκείμενο που προέκυψε από την εκχύλιση QuEChERS υποβλήθηκε σε δοκιμές καθαρισμού (clean-up) με την χρήση αλάτων QuEChERS ως προσροφητικά υλικά. Ο σκοπός της μελέτης ήταν η επιλογή ενός προσροφητικού υλικού ή συνδυασμό αυτών που θα επέτρεπε τον προσδιορισμό των τεσσάρων αναλυτών στο μέλι με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας προσδίδοντας τις υψηλότερες ανακτήσεις. Οι διαδικασίες καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκαν, περιγράφονται στις ακόλουθες δοκιμές.

Χωρίς το στάδιο του clean-up. Μετά την φυγοκέντρωση και αφού έχουν διαχωριστεί οι φάσεις, μεταφέρονται 2 mL από το υπερκείμενο σε δοκιμαστικό σωλήνα των 10 mL και μετά την εξάτμιση του διαλύτη το υπόλειμμα επαναδιαλύεται σε 1 mL μεθανόλης και φιλτράρεται με μεμβράνη PTFE, 0.22 μm .

Καθαρισμός με την προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου και PSA (clean-up 1). Μετά την φυγοκέντρωση και αφού έχουν διαχωριστεί οι φάσεις, μεταφέρονται 2 mL

από το υπερκείμενο, όπου βρίσκεται το ακετονιτρίλιο και τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL στον οποίο έχουν τοποθετηθεί άνυδρο θειικό μαγνήσιο (0.15 g) καθώς και προσροφητικά υλικά, το PSA (0.05 g). Ακολουθεί έντονη ανάδευση με το χέρι για 1 λεπτό και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4.000 στροφές.

Καθαρισμός με την προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου, PSA και C18 (clean-up 2). Μετά την φυγοκέντρηση και αφού έχουν διαχωριστεί οι φάσεις, μεταφέρονται 2 mL από το υπερκείμενο, όπου βρίσκεται το ακετονιτρίλιο και τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL στον οποίο έχουν τοποθετηθεί άνυδρο θειικό μαγνήσιο (0.15 g) καθώς και τα προσροφητικά υλικά, τα PSA (0.05 g) και C18 (0.05 g). Ακολουθεί έντονη ανάδευση με το χέρι για 1 λεπτό και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4.000 στροφές.

Καθαρισμός με την προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου και PSA (clean-up 3). Μετά την φυγοκέντρηση και αφού έχουν διαχωριστεί οι φάσεις, μεταφέρονται 2 mL από το υπερκείμενο, όπου βρίσκεται το ακετονιτρίλιο και τοποθετούνται σε σωλήνα φυγοκέντρησης των 15 mL στον οποίο έχουν τοποθετηθεί άνυδρο θειικό μαγνήσιο (0.15 g) καθώς και προσροφητικά υλικά, το PSA (0.025 g). Ακολουθεί έντονη ανάδευση με το χέρι για 1 λεπτό και στη συνέχεια φυγοκέντρηση για 5 λεπτά στις 4.000 στροφές.

5.2.4. Επικύρωση μεθόδων

Η επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων στις εργαστηριακές συνθήκες πραγματοποιήθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα με βάση τις ισχύουσες οδηγίες 2002/657/EK, SANTE 11813/2017 και 96/23/EK.

Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε ως συνδυασμός της επί τοις εκατό ανάκτησης (% recovery, R) και της πιστότητας. Η πιστότητα είναι εκφρασμένη ως επαναληψιμότητα εντός της ίδιας ημέρας (repeatability, RSD_r) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (within-lab-reproducibility, RSD_{WR}). Μελετήθηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (method detection limits, MDL) και ποσοτικοποίησης (method quantification limits, MQL) της μεθόδου, η γραμμικότητα

(linearity) και η επίδραση του υποστρώματος (matrix effect). Ο **Πίνακας 5.6.** συνοψίζει τις απαιτήσεις για την επικύρωση των μεθόδων που προορίζονται για ποσοτικό προσδιορισμό, όπως περιγράφονται στην πιο πρόσφατη Ευρωπαϊκή οδηγία: European Commission (2017) SANTE/11813/2017.

Πίνακας 5.6. Χαρακτηριστικά επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων.

Παράμετρος	Τρόπος ελέγχου	Κριτήρια
Γραμμικότητα	Έλεγχος σε πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων	Απόκλιση $C_{\text{ΠΕΙΡ}}$, $C_{\text{ΘΕΩΡ}}$ $\leq 20\%$
Επίδραση υποστρώματος	Σύγκριση της απόκρισης του ανιχνευτή για διαλύματα παρασκευασμένα σε διαλύτη και σε εκχύλισμα από το υπόστρωμα	ME > 20%: ποσοτικοποίηση με καμπύλες αναφοράς προσομοιωμένες στο υπόστρωμα
MQI	Έλεγχος αν το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού πληροί τα κριτήρια επίδοσης της μεθόδου ως προς την ακρίβεια και την πιστότητα	$\leq \text{MRL}$ (αν υπάρχει)
Ακρίβεια (ορθότητα, συστηματικό σφάλμα)	Υπολογισμός μέσης ανάκτησης για όλα τα επίπεδα εμβολιασμού	70% – 120%
Επαναληψιμότητα (εντός ίδιας ημέρας)	Υπολογισμός %RSD _r για κάθε επίπεδο εμβολιασμού που ελέγχθηκε	$\leq 20\%$
Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα	Υπολογισμός %RSD _{WR} σε διαδοχικές ημέρες	$\leq 20\%$

Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπυλών αναφοράς με προσομοίωση υποστρώματος (matrix-matched calibration curves).

Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν με την πραγματοποίηση τριών διαδοχικών εκχυλίσεων (n=3) δειγμάτων εμβολιασμένων σε πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων. Για τον υπολογισμό της % ανάκτησης συγκρίθηκε η συγκέντρωση μετά την εφαρμογή της εκχύλισης με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού, με βάση την **Εξίσωση 5.1.:**

$$\%R = \frac{C_{\text{Πειραματική}} - C_{\text{Τυφλού}}}{C_{\text{Θεωρητική (εμβολιασμού)}}} \times 100 \quad (\text{εξίσωση 5.1.})$$

Τα όρια ανίχνευσης προσδιορίστηκαν ως η συγκέντρωση του εμβολιασμένου δείγματος για την οποία η αναλογία του σήματος του αναλύτη προς το θόρυβο του οργάνου είναι ίση με 3 ($SN=3$), ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης ως η αντίστοιχη συγκέντρωση του δείγματος που αντιστοιχεί σε σήμα ίσο με 10 φορές το θόρυβο του οργάνου.

Η γραμμικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με τη βοήθεια καμπύλης οκτώ σημείων η οποία κάλυπτε εύρος συγκεντρώσεων από το όριο ποσοτικοποίησης (MQL) της κάθε ένωσης έως περίπου 100 φορές την τιμή αυτή (100 MQL). Για τον έλεγχο της γραμμικότητας εξετάστηκε αν η ευθεία ακολουθεί τη γραμμική παλινδρόμηση, της οποίας οι συντελεστές υπολογίζονται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Η πιστότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε ως η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) που προκύπτει για τρεις διαδοχικές εκχυλίσσεις ($n=3$) εμβολιασμένου δείγματος την ίδια ημέρα, οπότε εκφράζει την επαναληψιμότητα (repeatability, RSD_r) καθώς και για την ίδια διαδικασία σε τρεις διαφορετικές μέρες ($n=9$) οπότε εκφράζει την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility, RSD_R). Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης που θεωρούνται αποδεκτές είναι $\leq \pm 20\%$.

Η πρότυπη καμπύλη αναφοράς με προσομοίωση υποστρώματος οκτώ σημείων σε εύρος συγκεντρώσεων μεταξύ των ορίων ποσοτικοποίησης και 10 φορές των ορίων ποσοτικοποίησης προετοιμαζόταν και αναλυόταν στην αρχή και στο τέλος κάθε παρτίδας δειγμάτων (batch). Η παρασκευή της καμπύλης έλαβε χώρα με εμβολιασμό προτύπου μείγματος των ενώσεων σε εκχυλίσματα τυφλών (blank) δειγμάτων μελιού, τα οποία δεν περιείχαν υπολείμματα των αναλυτών και υποβλήθηκαν στην ίδια αναλυτική διαδικασία εκχύλισης με τα δείγματα. Επίσης, γινόταν έγχυση δύο δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου (quality control, QC) τα οποία ήταν δείγματα μελιού, εμβολιασμένα με συγκέντρωση ίση με το όριο ποσοτικοποίησης και 10 φορές το όριο ποσοτικοποίησης, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, οι ανακτήσεις που προέκυπταν χρησιμοποιήθηκαν στον υπολογισμό των αγνώστων συγκεντρώσεων.

Σύμφωνα με την οδηγία SANTE 11813/2017, τα αποδεκτά όρια για τις μεμονωμένες ανακτήσεις θα πρέπει να κυμαίνονται στο εύρος της μέσης ανάκτησης εντός περιθωρίου $\pm 2 \times \text{RSD}$. Πρακτικά, για τις μεμονωμένες ανακτήσεις μπορεί να χρησιμοποιηθεί μια «κλίμακα εξ' ορισμού» στο εύρος 70–120%, η οποία θα αφορά τις αναλύσεις ρουτίνας. Οι ανακτήσεις που βρίσκονται εκτός του παραπάνω ορίου, κανονικά απαιτούν να επαναληφθεί όλη η σειρά των αναλύσεων (batch), ωστόσο υπό ορισμένες δικαιολογημένες συνθήκες τα αποτελέσματα μπορεί να είναι αποδεκτά. Παρόλα αυτά, σταθερά υψηλές ανακτήσεις ή RSDs εκτός του περιθωρίου του $\pm 20\%$ θα πρέπει να διερευνώνται περαιτέρω.

5.2.4.1. Επίδραση υποστρώματος (Matrix effects)

Γεγονός που χρήζει ιδιαίτερης αναφοράς είναι οι διαφορές στη σύσταση των προϊόντων κυψέλης δύνανται να επηρεάσουν την αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (Blasco C. et al., 2004)(Yu J. et al., 2004) και την απόκριση των χρωματογραφικών συστημάτων στις προς ανάλυση ουσίες (Volante M. et al., 2001)(Jimenez J.J. et al., 1998)(Karazafiris E. et al., 2008). Για το λόγο αυτό οι βαθμονομήσεις και οι ανακτήσεις θα πρέπει να πραγματοποιούνται σε εκχύλισμα του προς ανάλυση δείγματος. Ειδικότερα, ο αναλύτης εφαρμόζει την επιλεγθείσα τεχνική σε μέλι που δεν περιέχει ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις υπολειμμάτων των προς ανάλυση ουσιών. Το τελικό εκχύλισμα που προκύπτει από τη συνολική διαδικασία χρησιμοποιείται στην κατασκευή των πρότυπων καμπυλών βαθμονόμησης. Στην περίπτωση που δεν είναι εφικτή η εύρεση δειγμάτων ελεύθερων από τα συγκεκριμένα υπολείμματα, είναι δυνατή η χρήση εκχυλίσματος που να δίνει απόκριση μέχρι το 30% του ορίου αναφοράς (European Commission (2017) SANTE/11813/2017). Η απόκριση αυτή μπορεί να οφείλεται στην παρουσία της προς ανάλυσης ουσίας ή μιας παρεμβολής με τον ίδιο χρόνο κατακράτησης.

Η σύγκριση των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σε καθαρό διαλύτη με τις καμπύλες αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σε δείγματα υποστρώματος για τον υπολογισμό της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με την **Εξίσωση 5.2.:**

$$ME(\%) = \left(\left(\frac{Sm}{Ss} \right) - 1 \right) \times 100 \quad \text{(εξίσωση 5.2.)}$$

όπου: Sm η κλίση της ευθείας στο εκχύλισμα και Ss η κλίση της ευθείας σε καθαρό διαλύτη.

Όταν η ME είναι 0% δεν υφίσταται καμία επίδραση μεταξύ υποστρώματος και αναλύτη. Όταν οι τιμές της ME είναι μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ όταν είναι μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ME% μεταξύ -20% και 20% θεωρείται πως το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος και η επίδραση θεωρείται μη σημαντική. Για τιμές μεταξύ -50% και -20% ή 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια, ενώ για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή (Nannou C.I. et al., 2018).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 6

Βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων σε μέλι

A. Βελτιστοποίηση

6.1. Εισαγωγή

Η συγκεκριμένη μέθοδος περιελάμβανε την ανάλυση δειγμάτων μελιού με σκοπό τον προσδιορισμό των κυριότερων ακαρεοκτόνων που χρησιμοποιούνται στην Ελληνική και Παγκόσμια μελισσοκομία. Οι ακαρεοκτόνες δραστικές ουσίες, που προσδιορίζονται αξιόπιστα με τη συγκεκριμένη μέθοδο είναι το amitraz, το bromopropylate, το coumaphos και το tau-fluvalinate. Η επικύρωση και η επαλήθευση της μεθόδου πραγματοποιήθηκαν με τις διαδικασίες που περιγράφονται στην **Παράγραφο 4.1.6.**

6.2. Μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν τις εκχύλισεις QuEChERS και διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD)

Το κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων των εκχυλίσεων ήταν η ανάκτηση (%R) των ενώσεων. Για αυτό, «τυφλά» δείγματα μελιού εμβολιάζονταν με το πρότυπο μείγμα των δραστικών ουσιών σε συγκέντρωση 5 mg kg^{-1} , όπως περιγράφεται στην **Παράγραφο 5.2.1** και ακολουθούσε ανάλυση των δειγμάτων στο σύστημα HPLC-UV/DAD και για επιβεβαίωση στα UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL, GC-MS υπό τις συνθήκες που περιγράφηκαν στο **Κεφάλαιο 5**.

6.3. Καθαρισμός Εκχυλισμάτων (clean-up)

Το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) που ακολουθεί την εκχύλιση και προηγείται της ανάλυσης, είναι απαραίτητο σε πολύπλοκα και επιβαρυμένα υποστρώματα, για τη βελτίωση της ευαισθησίας και ανθεκτικότητας της μεθόδου,

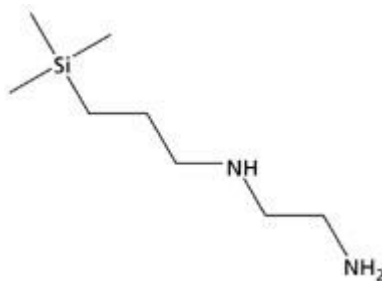
τη διευκόλυνση της ταυτοποίησης και της ποσοτικοποίησης. Ο καθαρισμός επιτυγχάνεται με τη μείωση των παρεμποδίσεων που προέρχονται από το υπόστρωμα (λιπίδια, κηροί, λιπαρά οξέα, στερόλες, χρωστικές, χλωροφύλλες, ξανθοφύλλες, αζωτούχες πρωτεΐνες, αλκαλοειδή, υδατάνθρακες, λιγνίνες, φαινόλες, τερπένια κ.α.) και στην απελευθέρωση των αναλυτών, ώστε να ληφθεί τελικά αναλυτικό σήμα μεγαλύτερης έντασης. Οι τεχνικές καθαρισμού επωφελούνται των διαφορών μεταξύ των φυσικοχημικών ιδιοτήτων (πολικότητα, διαλυτότητα, μοριακή μάζα) των αναλυτών και των συστατικών του υποστρώματος.

Στις πολυ-υπολειμματικές μεθόδους, το στάδιο αυτό απαιτεί προσοχή καθώς υπάρχει πιθανότητα απώλειας αναλυτών εκτός από τις παρεμποδίζουσες ενώσεις. Για παράδειγμα, κατά την εξάτμιση του διαλύτη για την επίτευξη προσυγκέντρωσης των αναλυτών, μπορεί να καθιζάνει στερεό, το οποίο εκτός από συστατικά του υποστρώματος, ενδεχομένως περιλαμβάνει και αναλύτες. Παρομοίως, απώλεια αναλυτών μπορεί να επέλθει και κατά την επαναδιάλυση του εκχυλίσματος σε διαλύτη διαφορετικής πολικότητας, λόγω μειωμένης διαλυτότητας των πρώτων στο διαλύτη.

Στην παρούσα Διατριβή εφαρμόστηκε η πιο δημοφιλής και ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική καθαρισμού που συνοδεύει την QuEChERS, η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (dispersive solid phase extraction, d-SPE) και χρησιμοποιήθηκαν τα κυριότερα εμπορικά διαθέσιμα προσροφητικά, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Zheng W. et al., 2018)(Calatayud-Vernich P. et al., 2016)(Souza Tette P.A. et al., 2016) και τις απαιτήσεις της ανάλυσης (φύση προσδιοριζόμενων ενώσεων, φύση υποστρώματος). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν: (α) πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (primary secondary amine, PSA), (β) τροποποιημένη με οκταδέκυλιο πυριτία (C18, octadecyl silica) και συνδυασμοί αυτών, με ταυτόχρονη χρήση 150 mg MgSO_4 ανά mL εκχυλίσματος σε όλες τις περιπτώσεις, το οποίο όπως και στο στάδιο της εκχύλισης, χρησιμοποιήθηκε για την απομάκρυνση της εναπομείνουσας υγρασίας.

Η πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (**Σχήμα 6.1.**) είναι ασθενής ανιονανταλλάκτης και χρησιμοποιείται κυρίως για την απομάκρυνση λιπαρών οξέων, οργανικών οξέων, σακχάρων, ορισμένων χρωστικών, ανθοκυανινών και

άλλων συνεκλούμενων συστατικών από το υπόστρωμα. Ταυτόχρονα όμως μπορεί να απομακρυνθούν και αναλύτες με όξινη συμπεριφορά λόγω του θετικού φορτίου του αζώτου σε $\text{pH} < 8$.



Σχήμα 6.1. Δομή πρωτοταγούς δευτεροταγούς αμίνης (PSA).

Η τροποποιημένη πυριτία (C18) είναι ένα υδρόφοβο, ανάστροφης φάσης προσροφητικό με εξαιρετικά ισχυρή ικανότητα κατακράτησης των μη πολικών παρεμποδίσεων. Όταν χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το PSA απομακρύνει επίσης πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, στερόλες και άλλες μη πολικές ενώσεις.

Για τη μελέτη των προσροφητικών, χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα από το ίδιο δείγμα μελιού. Το δείγμα εμβολιάστηκε με το αντίστοιχο μείγμα σε συγκέντρωση $250 \mu\text{g L}^{-1}$ και αφού χωρίστηκε σε κλάσματα των 2 mL, τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικούς σωλήνες από πολυαιθυλένιο (15 mL) οι οποίοι περιείχαν τους προς εξέταση συνδυασμούς προσροφητικών. Ο καθαρισμός περιγράφεται στην **Παράγραφο 5.2.3.2.1.**

Για τον καθορισμό του βέλτιστου συνδυασμού, λήφθηκαν υπόψη τόσο οι ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων όσο και η επίδραση του υποστρώματος. Στις επόμενες παραγράφους, η χρήση του MgSO_4 σε κάθε δοκιμή για την απομάκρυνση της υγρασίας είναι δεδομένη. Επίσης, οι ποσότητες των προσροφητικών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 50 mg ανά mL και 25 mg ανά mL εκχυλίσματος για το PSA, καθώς η προτεινόμενη αναλογία MgSO_4/PSA όταν χρησιμοποιείται η προσέγγιση AOAC 2007.01 είναι 3/1 (150 mg προσροφητικών ανά mL εκχυλίσματος), 50 mg για το C18, αφού τα μέλια δε συγκαταλέγονται στα πολύ λιπαρά υποστρώματα.

6.4. Μεθοδολογία ανάλυσης των τεσσάρων δραστικών ουσιών στο μέλι

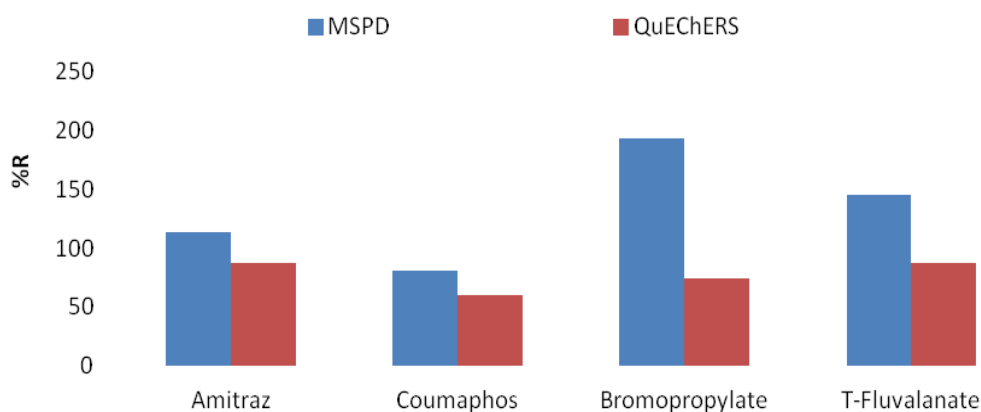
6.4.1. Αρχική μελέτη εκχύλισης QuEChERS και διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD) των τεσσάρων αναλυτών από το μέλι

Η εκχύλιση που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί για την ανάκτηση των τεσσάρων αναλυτών από το μέλι, ήταν η εκχύλιση QuEChERS με διαλύτη εκχύλισης ακετονιτρίλιο λόγω της αποτελεσματικής διαλυτότητας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων αναλυτών (log Kow από 4.13 έως 5.5) στον συγκεκριμένο διαλύτη.

Η εκχύλιση QuEChERS με διαλύτη εκχύλισης ακετονιτρίλιο είναι ή πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος εκχύλισης των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων από το μέλι. Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί αποτελεσματικά τόσο στον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών ενώσεων (Wiest L. et al., 2011)(Barganska Z. et al., 2013)(Berrada H. et al., 2011)(Font G. et al., 2011)(Naggar Y.A. et al., 2015) όσο και στον προσδιορισμό των πυρεθροειδών ενώσεων (Tomasini D. et al., 2012)(Shendy A.H. et al., 2016)(Paradis D. et al., 2014). Στις μεθόδους αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί δύο διαφορετικές διαδικασίες εκχύλισης οι οποίες και επιλέχθηκαν να μελετηθούν για την βελτιστοποίηση της μεθόδου εκχύλισης στον προσδιορισμό των τεσσάρων αναλυτών, που επιλέχθηκε στην παρούσα μελέτη. Οι δύο διαδικασίες: α) η εκχύλιση QuEChERS, κατά την οποία το δείγμα διαλύεται σε νερό και ακετονιτρίλιο και ακολουθεί η προσθήκη αλάτων β) η εκχύλιση διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD), κατά την οποία το δείγμα ομογενοποιήθηκε σε γουδί με silica gel και ακολουθεί η εκχύλιση των αναλυτών με την χρήση θεικού νατρίου και Florisil και ακολουθεί έκλουση με διχλωρομεθάνιο–οξικό αιθυλεστέρα (9:1, v/v).

Ο προσδιορισμός του μελιού πραγματοποιήθηκε εκχυλίζοντας τρία διαφορετικά βιολογικά μέλια με τις δύο διαδικασίες εκχύλισης. Η εκχύλιση μελιού με την διαδικασία εκχύλισης QuEChERS συμφωνεί με την επικύρωση της μεθόδου των Paradis D. et al., (2014) και Shendy A.H. et al., (2016) κατά τον προσδιορισμό του υπολείμματος με την ίδια διαδικασία εκχύλισης. Η διαδικασία εκχύλισης QuEChERS, επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στις περαιτέρω μελέτες καθαρισμού του εκχυλίσματος και μελέτης των ανακτήσεων των αναλυτών, ως η εκχύλιση κατά την οποία λαμβάνεται το καθαρότερο εκχύλισμα μελιού. Οι μέσες ανακτήσεις (% , n=6) των 4 δραστικών ουσιών που προσδιορίστηκαν με HPLC-UV/DAD παρουσιάζονται

στο **Σχήμα 6.2.** και κυμάνθηκαν από 81.13 έως 193.5% με την μέθοδο εκχύλισης MSPD και από 60 έως 87.32% με την μέθοδο εκχύλισης QuEChERS.



Σχήμα 6.2. Μέσες ανακτήσεις (%R, n=6), των 4 δραστικών ουσιών που προσδιορίστηκαν με HPLC-UV/DAD, όπως υπολογίσθηκαν με την μέθοδο εκχύλισης MSPD και QuEChERS.

6.4.2 Ανακτήσεις των τεσσάρων αναλυτών από το μέλι με την τεχνική εκχύλισης QuEChERS που μελετήθηκαν

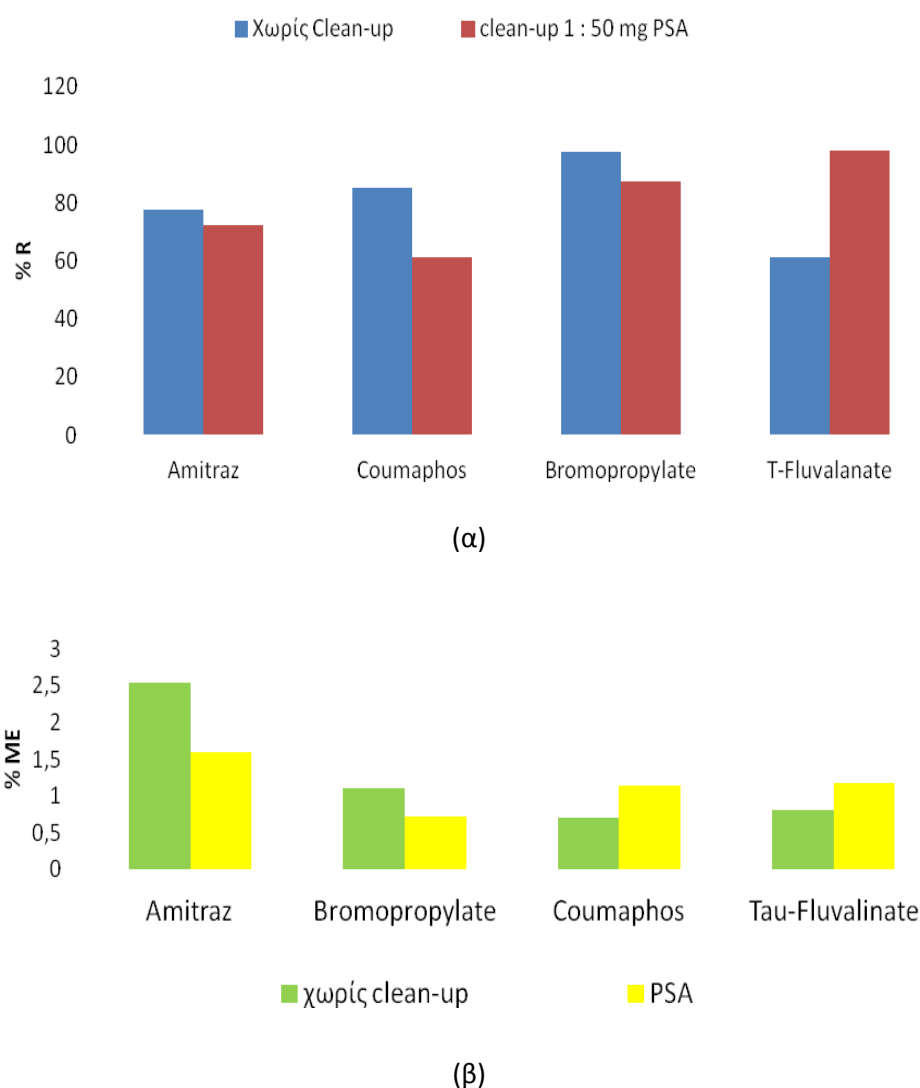
Οι ανακτήσεις των φυτοπροστατευτικών ενώσεων χωρίς καθαρισμό κυμαίνονταν μεταξύ 61.12% (tau-fluvalinate) και 85.2% (coumaphos). Η επίδραση του υποστρώματος πριν τον καθαρισμό ήταν μεταξύ 0.7% (bromopropylate) και 2.54% (amitraz). Οι ανακτήσεις (%R) και η επίδραση υποστρώματος (%ME) χωρίς καθαρισμό φαίνονται στον **Πίνακα 6.1.**

Πίνακας 6.1. Ανακτήσεις (%R) και επίδραση υποστρώματος (%ME) χωρίς καθαρισμό.

Δραστικές ουσίες	%R	%ME
Amitraz	77.6	2.54
Bromopropylate	85.2	0.7
Coumaphos	81.13	1.1
Tau-fluvalinate	61.12	0.8

Η χρήση 50 mg ανά mL εκχυλίσματος για το PSA οδήγησε σε μείωση των ανακτήσεων για το 75% των επιλεγμένων ενώσεων. Οι ανακτήσεις μετά τον

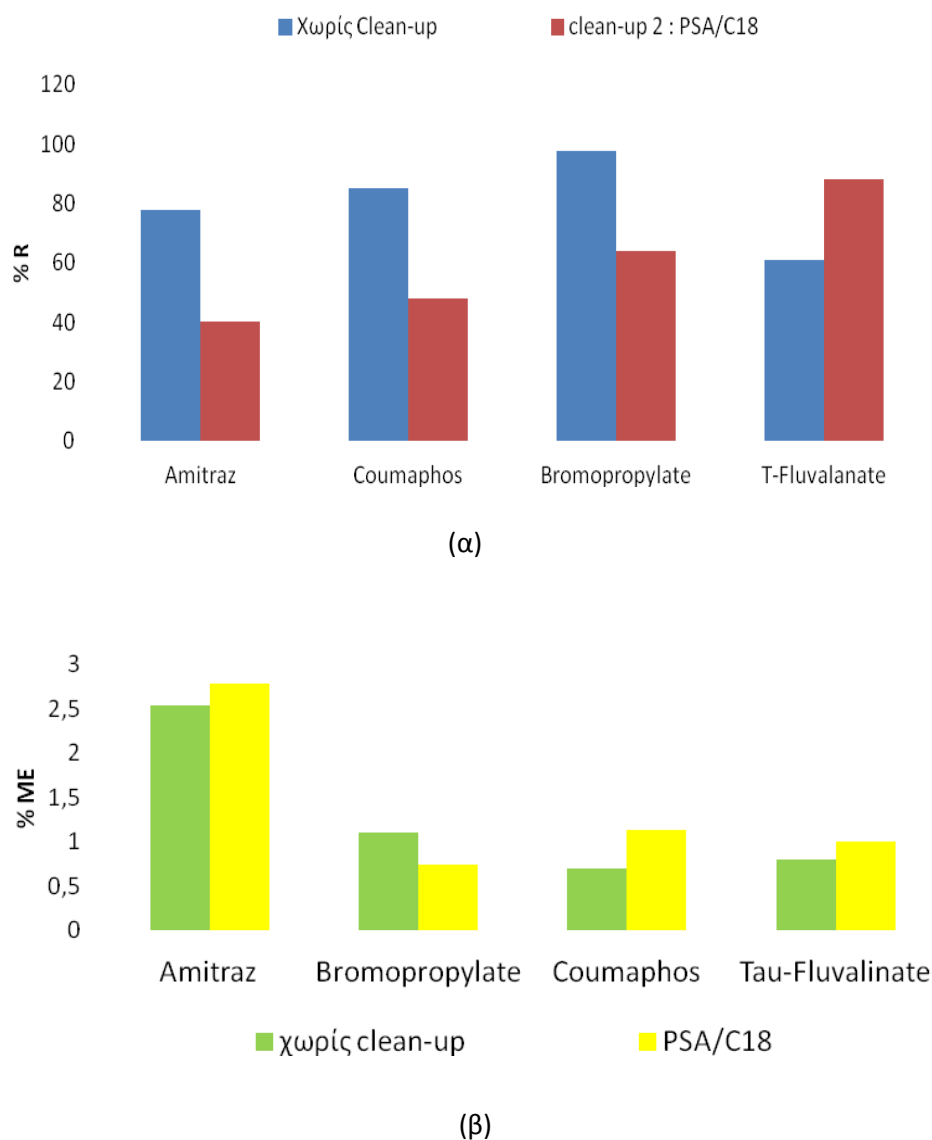
καθαρισμό κυμάνθηκαν μεταξύ 61.12% (coumaphos) και 98.08% (tau-fluvalinate), ενώ η μεγαλύτερη αύξηση (κατά 39.96%) σημειώθηκε για την ένωση tau-fluvalinate. Όσον αφορά την επίδραση του υποστρώματος, υπολογίστηκε μεταξύ 0.72% (bromopropylate) και 1.6% (amitraz). Ωστόσο, για το σύνολο των ενώσεων δεν παρατηρήθηκε ιδιαίτερη μείωση. Η επίδραση του PSA στις ανακτήσεις και στην επίδραση του υποστρώματος φαίνεται στα **Σχήματα 6.3. (α)** και **(β)** αντίστοιχα.



Σχήμα 6.3. Επίδραση PSA (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

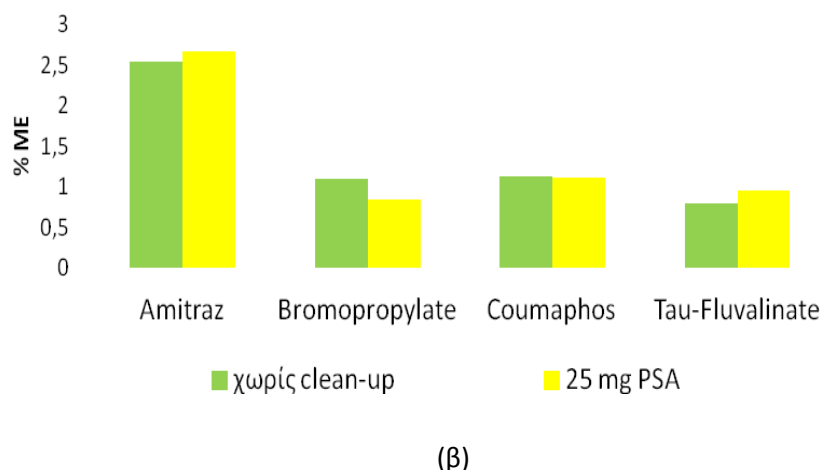
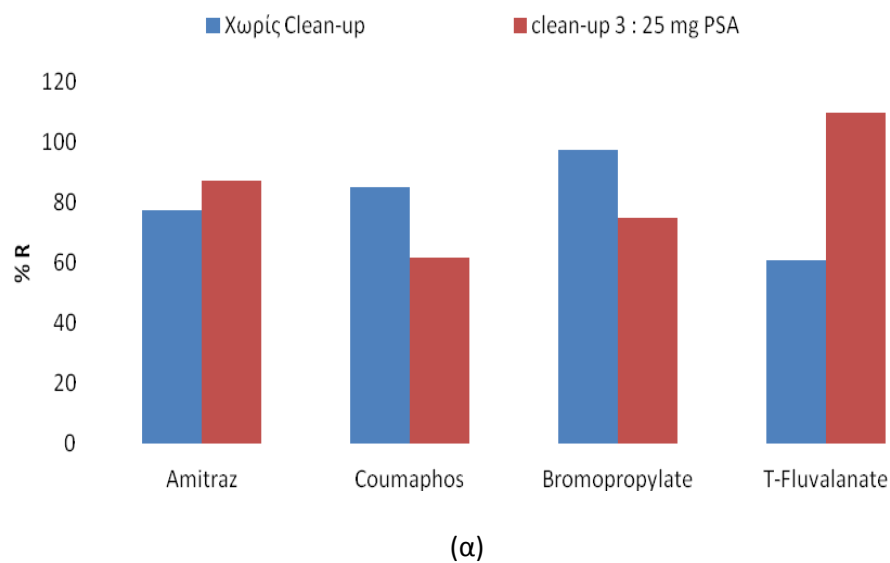
Ακολούθησε δοκιμή για το συνδυασμό PSA/C18 και παρατηρήθηκε μείωση των ανακτήσεων για όλους τους αναλύτες, με τιμές >90%. Αξίζει να σημειωθεί ότι ακόμα και στην περίπτωση που οι ανακτήσεις μειώθηκαν, η μεταβολή δεν ήταν

σημαντική και ήταν σε όλες τις περιπτώσεις εντός των αποδεκτών ορίων, με χαμηλότερη τιμή το 40% για το amitraz. Η επίδραση των PSA/C18 στις ανακτήσεις και στην επίδραση του υποστρώματος φαίνεται στα **Σχήματα 6.4. (α)** και **(β)**.



Σχήμα 6.4. Επίδραση PSA/C18 (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Η τελευταία δοκιμή, περιλάμβανε την μείωση κατά 25 mg για το PSA και κρίθηκε η πιο κατάλληλη για αρκετούς λόγους. Πρώτον, προκάλεσε σημαντικά αποδεκτές ανακτήσεις για το 75% των αναλυτών. Δεύτερον, παρατηρήθηκαν ανακτήσεις εντός των αποδεκτών ορίων. Η επίδραση των 25 mg για το PSA στις ανακτήσεις φαίνεται στα **Σχήματα 6.5. (α)** και **(β)**.

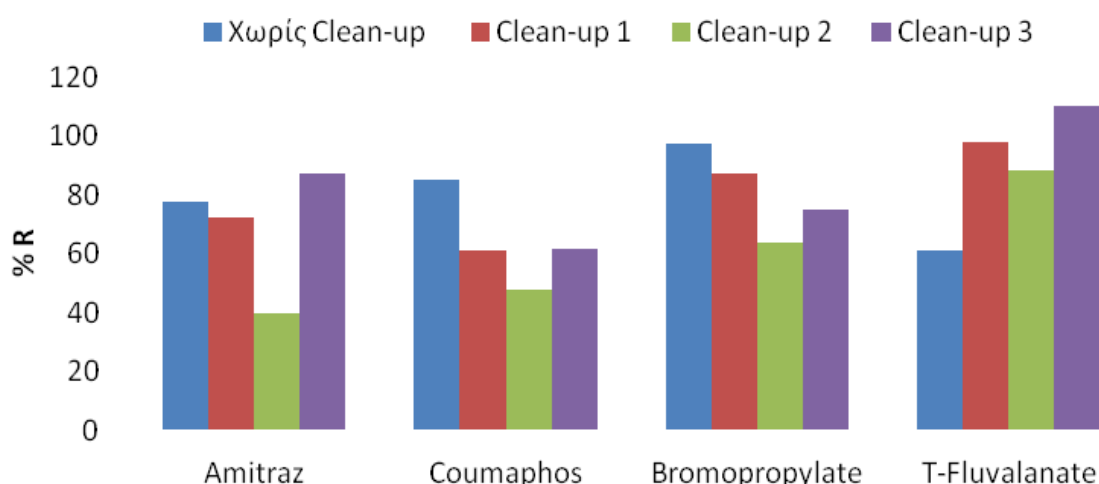


Σχήμα 6.5. Επίδραση των 25 mg για το PSA (α) στις ανακτήσεις και (β) στην επίδραση του υποστρώματος των φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Από τις τιμές των ανακτήσεων είναι εμφανές ότι το PSA είναι αρκετά αποτελεσματικό για την αύξηση των ανακτήσεων, ωστόσο η μείωση του κατά 25 mg για το PSA οδηγεί στην καλύτερη απομάκρυνση παρεμποδίζουσών ουσιών, φαίνεται ότι για τις επιλεγμένες ενώσεις η επίδραση από το υπόστρωμα είναι σταθερή και δεν έχει σημαντική επίδραση (0.8-1.2%), ακόμα βελτιώθηκαν οι ανακτήσεις για κάθε προσροφητικό/συνδυασμό προσροφητικού που μελετήθηκε.

Μετά την επιλογή της τεχνικής εκχύλισης και της διαδικασίας καθαρισμού του εκχυλίσματος, η μελέτη της διαδικασίας εκχύλισης QuEChERS συνεχίστηκε εκτιμώντας την αποτελεσματικότητα της στην ανάκτηση των τεσσάρων αναλυτών

από το μέλι. Ο προσδιορισμός των αποδόσεων της διαδικασίας καθαρισμού στην ανάκτηση των τεσσάρων αναλυτών πραγματοποιήθηκε σε τρία βιολογικά δείγματα μελιού εμβολιασμένα με συγκέντρωση $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ του μίγματος των αναλυτών. Τα δείγματα εκχυλίστηκαν με την εκχύλιση QuEChERS και πραγματοποιήθηκε καθαρισμός στην τεχνική εκχύλισης με τις μεθόδους που επιλέχθηκαν όπως περιγράφεται στο πειραματικό μέρος.



Σχήμα 6.6. Μέσες ανακτήσεις (% $n=8$), των 4 δραστικών ουσιών, όπως υπολογίστηκαν με την μέθοδο εκχύλιση QuEChERS που δοκιμάστηκε και την αντίστοιχη τεχνική καθαρισμού που χρησιμοποιήθηκε.

Στο **Σχήμα 6.6.** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μέσων ανακτήσεων ($n=8$) των τεσσάρων αναλυτών όπως προσδιορίστηκαν με την μέθοδο εκχύλισης QuEChERS. Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 61.12 έως 97.48% με την τεχνική καθαρισμού χωρίς clean-up, από 61.12 έως 98.08% με την τεχνική καθαρισμού clean-up 1, από 40 έως 88.24% με την τεχνική καθαρισμού clean-up 2 και από 61.72 έως 110.04% με την τεχνική καθαρισμού clean-up 3. Η εκχύλιση QuEChERS των 4 δραστικών ουσιών με την τεχνική καθαρισμού clean-up 3 (καθαρισμός με την προσθήκη 0.15 g άνυδρου θειικού μαγνησίου και 0.025 g PSA), παρουσίασε τις υψηλότερες ανακτήσεις όλων των αναλυτών.

B. Επικύρωση

6.5. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των 4 αναλυτών στο μέλι

6.5.1. Ανακτήσεις

Η εκτίμηση της ακρίβειας (ορθότητας και συστηματικού σφάλματος) της μεθόδου βασίστηκε στον υπολογισμό των ανακτήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα μελιού. Για κάθε επίπεδο εμβολιάστηκαν τρία βιολογικά δείγματα ($n=3$) τα οποία αναλύθηκαν μέσα στην ίδια μέρα, για να υπολογιστεί παράλληλα η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) και η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε για τρεις διαδοχικές ημέρες ($n=9$), για να υπολογιστεί η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (RSD_{WR}), συνθέτοντας την πιστότητα της μεθόδου.

Τα επίπεδα εμβολιασμού των φυτοπροστατευτικών ενώσεων ήταν 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$, 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$. Οι μέσες τιμές των ανακτήσεων ($n=3$) κυμάνθηκαν από 61.75% (bromopropylate) έως 113.75% (tau-fluvalinate). Το bromopropylate ήταν η ένωση που παρουσίασε τα χαμηλότερα επίπεδα ανακτήσεων και για τα τρία επίπεδα εμβολιασμού, ωστόσο σε καμία περίπτωση δεν επρόκειτο για μη αποδεκτές τιμές (**Πίνακας 6.2.**).

Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα, %RSD_r ήταν μικρότερη από 13%, για το amitraz σε επίπεδο εμβολιασμού 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα, RSD_{WR}%, ήταν μικρότερη του 20% που είναι το ανώτατο αποδεκτό όριο για όλες τις περιπτώσεις, σε επίπεδο εμβολιασμού 50 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ κυμάνθηκε από 3.6% για το amitraz έως 10.3% για το coumaphos, σε επίπεδο εμβολιασμού 100 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ κυμάνθηκε από 8.5% για το bromopropylate έως 11% για το coumaphos και σε επίπεδο εμβολιασμού 200 $\mu\text{g Kg}^{-1}$ κυμάνθηκε από 7.5% για το tau-fluvalinate έως 12.5% για το amitraz. Στον **Πίνακα 6.2.** φαίνονται οι ανακτήσεις (%R) της μεθόδου για κάθε επίπεδο, η επαναληψιμότητα (%RSD_r) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα (RSD_{WR}%).

Πίνακας 6.2. Ανακτήσεις (%R), επαναληψιμότητα (%RSD_r) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (%RSD_{WR}) των φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε εκχυλίσματα μελιού σε τρία επίπεδα εμβολιασμού.

	50 $\mu\text{g kg}^{-1}$			100 $\mu\text{g kg}^{-1}$			200 $\mu\text{g kg}^{-1}$		
	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}	%R	%RSD _r	%RSD _{WR}
Amitraz	90.8	3.0	3.6	103	3.0	10.2	78.1	13	12.5
Bromopropylate	81.25	8.7	8.4	78	12.0	8.5	61.75	7.0	8.6
Coumaphos	107.7	5.4	10.3	88.4	10.2	11.0	100.5	10.0	9.5
Tau-fluvalinate	66.5	5.1	7.4	94.8	5.2	9.9	113.75	9.0	7.5

6.5.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης

Η ευαισθησία της μεθόδου εκτιμήθηκε σημαντικά από το όριο των 0.01 mg kg^{-1} , που προβλέπει από τη νομοθεσία ως γενικότερο όριο αναλυτικού προσδιορισμού των δραστικών ουσιών για τις οποίες δεν έχουν θεσπιστεί MRLs. Το όριο ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης εκτιμήθηκε με τη χρήση του λογισμικού προγράμματος του συστήματος υγρής χρωματογραφίας και αντιστοιχούσε στη συγκέντρωση διαλύματος της δραστικής ουσίας που εμφάνιζε τουλάχιστον τριπλάσια και δεκαπλάσια απόκριση του ανιχνευτή σε σχέση με το θόρυβο της γραμμής βάσης. Η παράμετρος η οποία ελέγχθηκε είναι το σήμα/θόρυβο (S/N). Στο MQL πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10$. Ως όριο ανίχνευσης της μεθόδου (MDL) για τις 4 δραστικές ουσίες που προσδιορίστηκαν με HPLC-UV/DAD κυμάνθηκαν από 10 έως 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και τα αντίστοιχα όρια ποσοτικοποίησης (MQL) από 35 έως 65 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Πίνακας 6.3. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου HPLC-UV/DAD που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των 4 ακαρεοκτόνων που μελετήθηκαν.

Δραστικές ουσίες	MDL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MQL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Amitraz	10	40
Bromopropylate	18	60
Coumaphos	10	35
Tau-fluvalinate	20	65

6.5.3. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε με την κατασκευή καμπύλης οχτώ σημείων, σε εμβολιασμένα δείγματα για εύρος συγκεντρώσεων από το όριο ποσοτικοποίησης (MQL) έως περίπου $100 \times \text{MQL}$, η οποία ακολουθούσε τη γραμμική παλινδρόμηση. Ο συντελεστής προσδιορισμού (R^2) υπολογίστηκε για τις

ενώσεις να έχει τιμές μεγαλύτερες από 0.998, συνεπώς εξαιρετική γραμμικότητα για τη μέθοδο. Οι τιμές του συντελεστή R^2 για τις δραστικές ουσίες amitraz, coumaphos, bromopropylate και tau-fluvalinate κυμάνθηκαν από 0.998 (Tau-fluvalinate) έως 0.9995 (Bromopropylate). Στον **Πίνακα 6.4.** φαίνεται το εύρος γραμμικής περιοχής και ο συντελεστής προσδιορισμού για τις μελετώμενες ενώσεις.

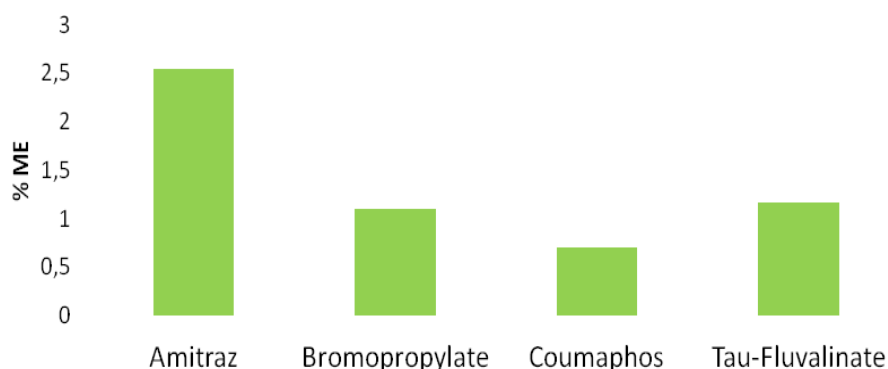
Πίνακας 6.4. Γραμμική περιοχή και συντελεστές προσδιορισμού για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις.

Δραστικές ουσίες	Γραμμική περιοχή ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	R^2
Amitraz	MQL-1000	0.999
Bromopropylate	MQL-1000	0.9995
Coumaphos	MQL-1000	0.9988
Tau-fluvalinate	MQL-1000	0.998

6.5.4. Επίδραση υποστρώματος

Το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος και οι πιθανοί παράγοντες στους οποίους οφείλεται έχουν ήδη περιγραφεί στο θεωρητικό μέρος. Ως γνωστόν, για τιμές μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ για μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ME μεταξύ -20% και 20% θεωρείται ότι το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος. Για τιμές μεταξύ -50% και -20% ή 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια, ενώ για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή.

Οι τιμές της (%) επίδρασης του υποστρώματος υποδηλώνουν πολύ μικρή ενίσχυση του σήματος (<20%, αμελητέα) μόνο για το coumaphos (0.7%) και σταθερή για όλες τις υπόλοιπες φυτοπροστατευτικές ενώσεις, με μέγιστη τιμή 2.54% για το amitraz (**Σχήμα 6.7.**).



Σχήμα 6.7. Επίδραση υποστρώματος για τις επιλεγμένες ενώσεις.

Αν και δεν παρατηρήθηκε ισχυρή μείωση ή αύξηση του σήματος λόγω επίδρασης υποστρώματος για καμία ένωση, η χρήση προτύπων καμπυλών αναφοράς σε υπόστρωμα μελιού για τον υπολογισμό των συγκεντρώσεων (matrix-matched calibration curve) μειώνει την πιθανότητα εσφαλμένων αποτελεσμάτων.

6.6. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των 4 αναλυτών στο μέλι

Στον Πίνακα 6.5. παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των 4 αναλυτών στο μέλι με την χρήση HPLC-UV/DAD. Τα όρια ανίχνευσης (MDL) και ποσοτικοποίησης (MQL) της μεθόδου προσδιορίστηκαν πειραματικά, προσδιορίζοντας το σήμα του θορύβου και το σήμα των αναλυτών σε λευκά (blank) και σε εμβολιασμένα δείγματα μελιού με το μίγμα των αναλυτών σε συγκεντρώσεις 100-1000 $\mu\text{g kg}^{-1}$, τα οποία και αναλύθηκαν με την μέθοδο που αναπτύχθηκε με τις τρεις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Ως σήμα του οργάνου θεωρήθηκε το ύψος των χρωματογραφικών κορυφών και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου προσδιορίστηκαν ως οι συγκεντρώσεις του αναλύτη στο δείγμα οι οποίες αντιστοιχούν σε σήμα ίσο με 3.3 και 10 φορές το σήμα του θορύβου αντίστοιχα.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (MDL) για τις 4 δραστικές ουσίες που προσδιορίστηκαν με HPLC-UV/DAD, κυμάνθηκαν από 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ έως 20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και το όριο ποσοτικοποίησης (MQL) από 35 $\mu\text{g kg}^{-1}$ έως 65 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Η γραμμικότητα της μεθόδου εξετάστηκε χρησιμοποιώντας 8 συγκεντρώσεις εμβολιασμένων δειγμάτων στην περιοχή $\text{MQL}-1000 \mu\text{g kg}^{-1}$ και κατασκευάζοντας την καμπύλη αναφοράς του λόγου των εμβαδών του αναλύτη, συναρτήσεως των συγκεντρώσεων των εμβολιασμένων δειγμάτων μελιού. Οι συντελεστές συσχέτισης σε όλες τις περιπτώσεις βρέθηκαν >0.998 υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος είναι γραμμική στις περιοχές συγκεντρώσεων που παρουσιάζονται στο πίνακα για τον κάθε αναλύτη και στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC-UV/DAD που χρησιμοποιήθηκε. Οι χρόνοι κατακράτησης, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, το γραμμικό εύρος της μεθόδου, ο συντελεστής συσχέτισης (R^2) και οι ανακτήσεις για τις φυτοπροστατευτικές-ακαρεοκτόνες ενώσεις, δίνονται στον **Πίνακα 6.5.**

Πίνακας 6.5. Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου HPLC-UV/DAD που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των 4 φυτοπροστατευτικών-ακαρεοκτόνων ενώσεων που μελετήθηκαν.

Δραστική ουσία	t_R (min)	MDL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	MQL ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Περιοχή γραμμικότητας (ppb)	R^2	Recovery (%)
Amitraz	2.84	10	40	MQL-1000	0.999	103
Coumaphos	2.85	10	35	MQL-1000	0.9988	88.4
Bromopropylate	4.09	18	60	MQL-1000	0.9995	78
Tau-fluvalinate	3.85	20	65	MQL-1000	0.998	94.8

t_R =χρόνος κατακράτησης, MDL=όριο ανίχνευσης της μεθόδου, MQL=όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου, προσδιορίστηκε αναλύοντας με την προτεινόμενη μέθοδο, 3 δείγματα μελιού εμβολιασμένα με το μίγμα φυτοφαρμάκων σε συγκέντρωση $50 \mu\text{g kg}^{-1}$, $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ και $200 \mu\text{g kg}^{-1}$ και υπολογίζοντας την σχετική τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων (%RSD, $n=3$). Τα συνολικά δεδομένα των σχετικών ανακτήσεων τριών συγκεντρώσεων και τριών επαναλήψεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.2.** οι μέσες ανακτήσεις των 4 αναλυτών, όπως υπολογίστηκαν από τρεις επαναλήψεις τριών συγκεντρώσεων εμβολιασμού των δειγμάτων κυμάνθηκαν από 78 έως 103% και οι αντίστοιχες σχετικές τυπικές αποκλίσεις από 3 έως 13%.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Κεφάλαιο 7

Ανίχνευση των 4 δραστικών ουσιών σε δείγματα μελιού

7.1. Δείγματα μελιού που εξετάστηκαν

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στο **Κεφάλαιο 6**, εφαρμόστηκε σε 36 δείγματα μελιού. Δέκα εννέα (19) από τα 36 δείγματα ήταν τυποποιημένο μέλι, ενώ τα υπόλοιπα 14 δείγματα συλλέχθηκαν από διάφορους μελοπαραγωγούς των περιοχών των Ιωαννίνων (9), Άρτας (4) και Χανίων (1), ενώ 3 ήταν βιολογικά μέλια της περιοχής του νομού Ιωαννίνων.

Πίνακας 7.1. Στοιχεία των δειγμάτων μελιού.

Κατηγορίες μελιών	Βιολογικής παραγωγής	Σύνολο
πεύκου	1	2
ελάτης	1	2
θυμαρίσιο	-	8
ανθέων	-	13
κωνοφόρων	-	4
φασκόμηλου	1	1
από άνθη εσπεριδοειδών	-	1
από άνθη πορτοκαλιάς	-	5

7.2. Γενική εκτίμηση της εφαρμογής της μεθόδου και των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεχθέντων δραστικών ουσιών στο τυποποιημένο μέλι διαφόρων κατηγοριών

Η μέθοδος εφαρμόστηκε με επιτυχία στα δείγματα μελιού που εξετάστηκαν, προσδιορίζοντας με ακρίβεια και σε χαμηλά επίπεδα τις συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων των επιλεχθέντων δραστικών ενώσεων. Τα συνολικά αποτελέσματα των θετικών ανιχνεύσεων των 19 συμβατικών δειγμάτων μελιού που εξετάστηκαν, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.2.**

Πίνακας 7.2. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου amitraz, bromopropylate, coumaphos και tau-fluvalinate στα 19 δείγματα τυποποιημένου μελιού (επιβεβαίωση με GC-MS και UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS).

Δραστική ουσία	σύνολο	Θετικές Ανιχνεύσεις	n < MQL	n > MRL	MRLs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Amitraz	19	0	19	0	200
Bromopropylate	19	0	19	0	100
Tau-Fluvalinate	19	0	19	0	100
Coumaphos	19	0	19	0	100

Στον **Πίνακα 7.2.**, παρουσιάζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα των 19 τυποποιημένων δειγμάτων μελιού. Στο τυποποιημένο μέλι το ποσοστό των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύτηκαν υπολείμματα ακαρεοκτόνων περιορίστηκε στο 0%, αφού σε κανένα δείγμα δεν προσδιορίστηκαν υπολείμματα σε ποσότητα άνω του ορίου ανίχνευσης τους με την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

Στα 19 δείγματα τυποποιημένου μελιού που εξετάσθηκαν δεν ανιχνεύτηκε καμία από τις δραστικές ουσίες. Από αυτά, μόνο τα MRLs του amitraz, bromopropylate και coumaphos, έχουν οριστεί, ενώ του tau-fluvalinate είναι αυτά που δεν έχουν οριστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (σύμφωνα με τις διατάξεις του Κανονισμού No 37/2010/EEC της Ε.Ε.) για το μέλι. Κατά την σύγκριση των συγκεντρώσεων με τα MRLs, σε κανένα δείγμα τυποποιημένου μελιού δεν βρέθηκε να περιέχουν υπολείμματα δραστικών ουσιών πάνω από το επιτρεπτό όριο.

7.3. Γενική εκτίμηση της εφαρμογής της μεθόδου και των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεχθέντων δραστικών ουσιών στο μέλι συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων

Στον **Πίνακα 7.3.**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των 17 δειγμάτων μελιού, εκ των οποίων τα 3 ήταν βιολογικά μέλια, που συλλέχθηκαν και προέρχονται από μέλι συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων. Σε κανένα από τα 17 δείγματα δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα ακαρεοκτόνων, με αποτέλεσμα καμία από τις 4 ενώσεις δεν βρέθηκαν συνολικά στα δείγματα που εξετάστηκαν. Δεν προσδιορίστηκαν το πυρεθροειδές ακαρεοκτόνο tau-fluvalinate, η φορμαμιδίνη amitraz, το οργανοαλογονωμένο bromopropylate και το οργανοφωσφορικό coumaphos.

Πίνακας 7.3. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου amitraz, bromopropylate, coumaphos και tau-fluvalinate στα 17 δείγματα συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων (επιβεβαίωση με GC-MS και UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS).

Δραστική ουσία	σύνολο	Θετικές Ανιχνεύσεις	n < MQL	n > MRL	MRLs ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Amitraz	17	0	17	0	200
Bromopropylate	17	0	17	0	100
Tau-Fluvalinate	17	0	17	0	100
Coumaphos	17	0	17	0	100

7.4. Γενική εκτίμηση της εφαρμογής της μεθόδου και των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεχθέντων δραστικών ουσιών στο βιολογικό μέλι

Τα τρία βιολογικά μέλια που εξετάστηκαν δεν περιείχαν υπολείμματα ακαρεοκτόνων και ήταν και τα τρία βιολογικά πιστοποιημένα μέλια παραγωγών-μελισσοκόμων. Οι Chiesa L.M. et al., (2016) κατά την μελέτη προσδιορισμού φυτοφαρμάκων και οργανικών ρύπων σε βιολογικά μέλια από διαφορετικές παραγωγικές περιοχές της Ιταλίας όπου η πλειονότητα των δειγμάτων μελιού περιείχε τουλάχιστον ένα από τα φυτοφάρμακα, ακόμη και αν διαπιστώθηκε ότι οι συγκεντρώσεις τους ήταν χαμηλότερες από τα μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs). Diazinon, mevinphos, coumaphos, chlorpyrifos και quinoxifen ήταν υπολείμματα που συχνά ανιχνεύτηκαν σε δείγματα που προέρχονταν από καλλιεργητικές περιοχές με μήλα και εσπεριδοειδή. Στην εν λόγω μελέτη οι συγγραφείς απέδωσαν την ύπαρξη των υπολειμμάτων στα μέλια βιολογικής παραγωγής σε ρύπανση του μελιού από την μεταφορά του φυτοφαρμάκου από γειτονικούς αγρούς.

7.5. Αναλυτικά αποτελέσματα των εργαστηριακών αναλύσεων ανά δραστική ουσία που εξετάστηκαν.

7.5.1. Amitraz

Η δραστική ουσία amitraz δεν προσδιορίστηκε ούτε στα δείγματα μελιού που διακινήθηκαν στην Ελληνική αγορά, ούτε στα δείγματα μελιού συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων. Σε περιορισμένα δείγματα

προσδιορίστηκαν ίχνη (κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης και των μέγιστων ορίων υπολειμμάτων) της δραστικής ουσίας (**Πίνακας 7.4.α.** και **Πίνακας 7.4.β.**).

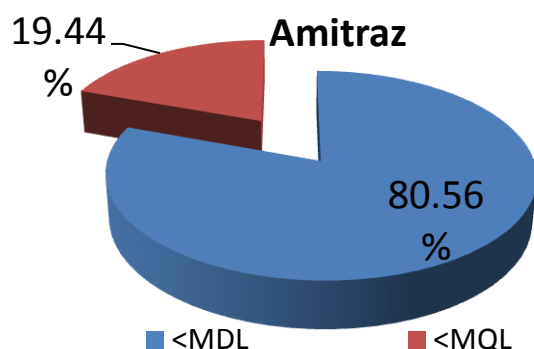
Πίνακας 7.4.α. Συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου amitraz στο μέλι που διακινήθηκε στην Ελληνική αγορά (MQL=40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και MRL=200 $\mu\text{g kg}^{-1}$)(επιβεβαίωση: ανάλυση με GC-MS).

Amitraz	
Δείγματα	C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
No 1	<MDL
No 2	<MDL
No 3	<MDL
No 4	<MQL
No 5	<MDL
No 6	<MQL
No 7	<MQL
No 8	<MDL
No 9	<MDL
No 10	<MDL
No 11	<MDL
No 12	<MDL
No 13	<MDL
No 14	<MQL
No 15	<MDL
No 16	<MDL
No 17	<MDL
No 18	<MQL
No 19	<MDL

Πίνακας 7.4.β. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου amitraz σε μέλι συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων (MQL=40 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και MRL=200 $\mu\text{g kg}^{-1}$)(επιβεβαίωση: ανάλυση με GC-MS).

Amitraz	
Δείγματα	C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
No 20	<MDL
No 21	<MDL
No 22	<MDL
No 23	<MDL
No 24	<MDL
No 25	<MDL
No 26	<MDL
No 27	<MDL
No 28	<MDL
No 29	<MDL
No 30	<MDL
No 31	<MQL
No 32	<MDL
No 33	<MDL
No 34	<MQL

No 35	<MDL
No 36	<MDL



Σχήμα 7.1. Ποσοστό ορίων ανίχνευσης και ορίων ποσοτικοποίησης της φυτοπροστατευτικής ένωσης που ανιχνεύθηκαν στα μέλια.

Στον **Πίνακα 7.4.** συνοψίζονται τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την ανίχνευση του ακαρεοκτόνου amitraz σε μέλια παγκοσμίως.

Πίνακας 7.4. Συγκεντρώσεις ακαρεοκτόνου amitraz σε μέλια παγκοσμίως.

Amitraz	Μέγιστη Συγκέντρωση ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Περιοχή-Χώρα	Αναφορά
16 (60)	120	Σλοβενία	Česnik H.B. et al., 2019
4 (142)	26	Quessant Island, Γαλλία "Région des Pays de la Loire" Δυτική Γαλλία Island of Yeu, Γαλλία	Wiest L. et al., 2011
0 (3)	-	Βραζιλία	Tomasini D. et al., 2012
0 (33)	-	Νότια Κορέα και Νέα Ζηλανδία	Zheng W. et al., 2018
54 (155)	600	Πολωνία	Gawel M. et al., 2019
6 (6)	<MDL	Ιταλία	Notardonato I. et al., 2016
22 (31)	16.1	Τόκιο, Ιαπωνία	Ohba Y. et al., 2018
127 (250)	< 20	Τόκιο, Ιαπωνία	Nakajima T. et al., 2015

7.5.2. Bromopropylate

Υπολείμματα bromopropylate δεν προσδιορίστηκαν στα δείγματα μελιού ακόμη και σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε σχέση με το MRL (**Πίνακας 7.5.α** και **Πίνακας 7.5.β**). Οι συγκεντρώσεις της δραστικής ουσίας στα μέλια βρέθηκαν πολύ χαμηλότερες από αυτές που αναφέρονται από τους Notardonato I. et al., (2016) και Tsiropoulos N.G. et al., (2011) κατά τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων της δραστικής ουσίας στα μέλια (**Πίνακας 7.5.**).

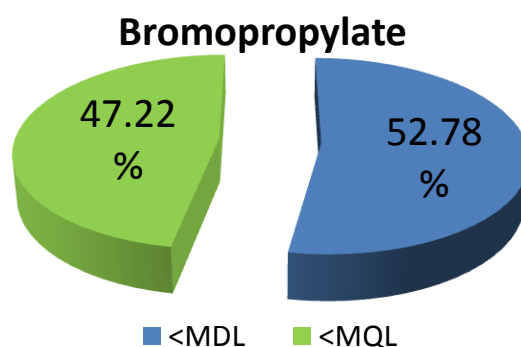
Πίνακας 7.5.α. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου bromopropylate σε μέλι που διακινήθηκε στην Ελληνική αγορά (MQL=60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και MRL=100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)(επιβεβαίωση: ανάλυση με GC-MS).

Bromopropylate	
Δείγματα	C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
No 1	<MDL
No 2	<MQL
No 3	<MDL
No 4	<MDL
No 5	<MQL
No 6	<MQL
No 7	<MQL
No 8	<MQL
No 9	<MQL
No 10	<MDL
No 11	<MQL
No 12	<MQL
No 13	<MDL
No 14	<MDL
No 15	<MQL
No 16	<MQL
No 17	<MQL
No 18	<MQL
No 19	<MQL

Πίνακας 7.5.β. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου bromopropylate σε μέλι συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων (MQL=60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και MRL=100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)(επιβεβαίωση: ανάλυση με GC-MS).

Bromopropylate	
Δείγματα	C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
No 20	<MDL
No 21	<MQL
No 22	<MQL
No 23	<MDL
No 24	<MQL
No 25	<MDL
No 26	<MDL
No 27	<MDL

No 28	<MDL
No 29	<MDL
No 30	<MDL
No 31	<MDL
No 32	<MDL
No 33	<MDL
No 34	<MDL
No 35	<MDL
No 36	<MDL



Σχήμα 7.2. Ποσοστό ορίων ανίχνευσης και ορίων ποσοτικοποίησης της φυτοπροστατευτικής ένωσης που ανιχνεύθηκαν στα μέλια.

Στον **Πίνακα 7.5.** συνοψίζονται τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την ανίχνευση του ακαρεοκτόνου bromopropylate σε μέλια παγκοσμίως.

Πίνακας 7.5. Συγκεντρώσεις ακαρεοκτόνου bromopropylate σε μέλια παγκοσμίως.

Bromopropylate	Μέγιστη Συγκέντρωση ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Περιοχή-Χώρα	Αναφορά
0 (17)	<MRL=100	Ελλάδα	Tsiropoulos N.G. et al., 2011
6 (6)	36	Ιταλία	Notardonato I. et al., 2016

7.5.3. Tau-fluvalinate

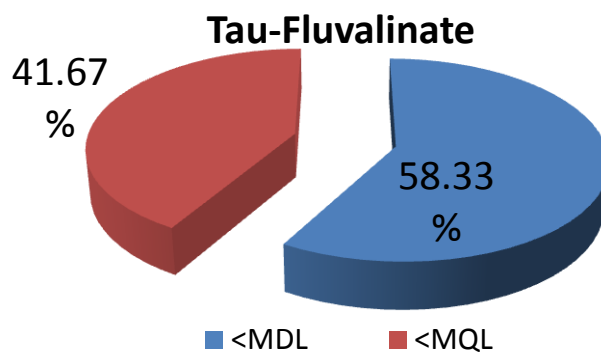
Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων tau-fluvalinate στα διάφορα δείγματα μελιού ήταν ικανοποιητικά σε σχέση με το προτεινόμενο MRL. Το ακαρεοκτόνο tau-fluvalinate, δεν ανιχνεύθηκε σε κανένα δείγμα τυποποιημένου και από μελισσοπαραγωγούς μελιού.

Πίνακας 7.6.α. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου tau-fluvalinate σε μέλι που διακινήθηκε στην Ελληνική αγορά (MQL=65 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και MRL=100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)(επιβεβαίωση: ανάλυση με GC-MS).

Tau-fluvalinate	
Δείγματα	C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
No 1	<MDL
No 2	<MQL
No 3	<MQL
No 4	<MQL
No 5	<MDL
No 6	<MQL
No 7	<MDL
No 8	<MDL
No 9	<MDL
No 10	<MDL
No 11	<MQL
No 12	<MDL
No 13	<MDL
No 14	<MDL
No 15	<MQL
No 16	<MQL
No 17	<MQL
No 18	<MQL
No 19	<MDL

Πίνακας 7.6.β. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου tau-fluvalinate σε μέλι συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων (MQL=65 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και MRL=100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)(επιβεβαίωση: ανάλυση με GC-MS).

Tau-fluvalinate	
Δείγματα	C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
No 20	<MDL
No 21	<MDL
No 22	<MDL
No 23	<MDL
No 24	<MQL
No 25	<MDL
No 26	<MDL
No 27	<MDL
No 28	<MQL
No 29	<MDL
No 30	<MDL
No 31	<MQL
No 32	<MQL
No 33	<MQL
No 34	<MQL
No 35	<MDL
No 36	<MDL



Σχήμα 7.3. Ποσοστό ορίων ανίχνευσης και ορίων ποσοτικοποίησης της φυτοπροστατευτικής ένωσης που ανιχνεύθηκαν στα μέλια.

Στον **Πίνακα 7.6.** συνοψίζονται τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την ανίχνευση του ακαρεοκτόνου tau-fluvalinate σε μέλια παγκοσμίως.

Πίνακας 7.6. Συγκεντρώσεις ακαρεοκτόνου tau-fluvalinate σε μέλια παγκοσμίως.

Tau-fluvalinate	Μέγιστη Συγκέντρωση ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Περιοχή-Χώρα	Αναφορά
5 (142)	30	Quessant Island, Γαλλία "Région des Pays de la Loire" Δυτική Γαλλία Island of Yeu, Γαλλία	Wiest L. et al., 2011
0 (3)	-	Βραζιλία	Tomasini D. et al., 2012
1 (64)	10.00	Αίγυπτος	Shendy A.H. et al., 2016
1 (47)	21.20	Ιταλία	Saitta M. et al., 2017
2 (33)	<MQL	Νότια Κορέα και Νέα Ζηλανδία	Zheng W. et al., 2018
5 (155)	3	Πολωνία	Gawel M. et al., 2019
0 (26)	-	Πακιστάν	Rafique N. et al., 2018
4 (6) 2 (6)	14 < MDL	Ιταλία	Notardonato I. et al., 2016
0 (32)	-	Ισραήλ	Bommuraj V. et al., 2019

7.5.4. Coumaphos

Υπολείμματα του οργανοφωσφορικού ακαρεοκτόνου coumaphos σε μέλι που διακινήθηκε στην Ελληνική αγορά και σε μέλι συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων δεν βρέθηκαν υπολείμματα σε κανένα από τα δείγματα που εξετάστηκαν (Πίνακας 7.7.α και Πίνακας 7.7.β). Οι συγκεντρώσεις του coumaphos στο μέλι δεν ήταν δυνατόν να προσδιοριστεί λόγω του ότι τα δείγματα ήταν κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης της μεθόδου.

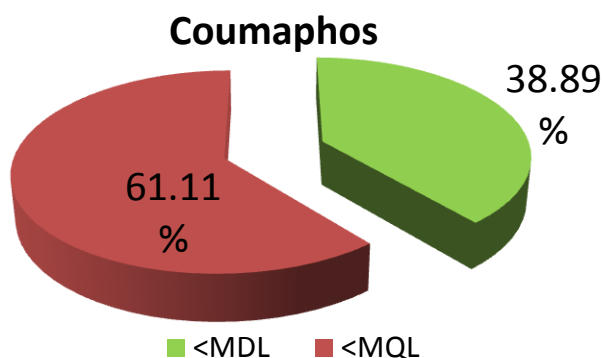
Πίνακας 7.7.α. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου coumaphos σε μέλι που διακινήθηκε στην Ελληνική αγορά (MQL=35 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και MRL=100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)(επιβεβαίωση: ανάλυση με UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS).

Coumaphos	C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
No 1	<MQL
No 2	<MQL
No 3	<MQL
No 4	<MQL
No 5	<MQL
No 6	<MQL
No 7	<MQL
No 8	<MQL
No 9	<MQL
No 10	<MQL
No 11	<MDL
No 12	<MQL
No 13	<MQL
No 14	<MQL
No 15	<MQL
No 16	<MQL
No 17	<MQL
No 18	<MQL
No 19	<MQL

Πίνακας 7.7.β. Υπολείμματα ακαρεοκτόνου coumaphos σε μέλι συμβατικής παραγωγής ανεξάρτητων μελισσοκόμων (MQL=35 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και MRL=100 $\mu\text{g kg}^{-1}$)(επιβεβαίωση: ανάλυση με UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS).

Coumaphos	C ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
No 20	<MDL
No 21	<MDL
No 22	<MDL
No 23	<MDL
No 24	<MDL
No 25	<MDL
No 26	<MDL
No 27	<MDL
No 28	<MQL
No 29	<MQL

No 30	<MDL
No 31	<MQL
No 32	<MDL
No 33	<MDL
No 34	<MDL
No 35	<MQL
No 36	<MDL



Σχήμα 7.4. Ποσοστό ορίων ανίχνευσης και ορίων ποσοτικοποίησης της φυτοπροστατευτικής ένωσης που ανιχνεύθηκαν στα μέλια.

Στον **Πίνακα 7.7.** συνοψίζονται τα πιο πρόσφατα βιβλιογραφικά δεδομένα που αφορούν την ανίχνευση του ακαρεοκτόνου coumarphos σε μέλια παγκοσμίως.

Πίνακας 7.7. Συγκεντρώσεις ακαρεοκτόνου coumarphos σε μέλια παγκοσμίως.

Coumarphos	Μέγιστη Συγκέντρωση ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Περιοχή-Χώρα	Αναφορά
13 (60)	55	Σλοβενία	Česnik H.B. et al., 2019
77 (142)	29	Quessant Island, Γαλλία "Région des Pays de la Loire" Δυτική Γαλλία Island of Yeu, Γαλλία	Wiest L. et al., 2011
17 (36) 19 (36)	41 <MQL	Κύπρος	Christodoulou D.L. et al., 2015
46 (47)	145.5	Ιταλία	Saitta M. et al., 2017
4 (33)	<MQL	Νότια Κορέα και Νέα Ζηλανδία	Zheng W. et al., 2018
9 (155)	39	Πολωνία	Gawel M. et al., 2019
0 (26)	-	Πακιστάν	Rafique N. et al., 2018

5 (6)	15	Ιταλία	Notardonato I. et al., 2016
1 (6)	<MDL		
28 (32)	17	Ισραήλ	Bommuraj V. et al., 2019

7.6. Συνολική εκτίμηση των προσδιορισθέντων δραστικών ουσιών και των επιπέδων συγκέντρωσης τους στις διάφορες κατηγορίες μελιού που εξετάστηκαν

Τα επίπεδα συγκέντρωσης των δραστικών ουσιών που προσδιορίστηκαν όπως παρουσιάζονται στους **Πίνακες 7.2. και 7.3.** περιλαμβάνουν και τις συγκεντρώσεις κάτω του ορίου ποσοτικοποίησης θεωρώντας ότι είναι ίσες με το μισό του ορίου ποσοτικοποίησης τους στην μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε. Στο τυποποιημένο μέλι το ποσοστό των δειγμάτων στα οποία ανιχνεύτηκαν υπολείμματα φυτοφαρμάκων περιορίστηκε στο 0%, αφού σε κανένα δείγμα δεν προσδιορίστηκαν υπολείμματα σε ποσότητα άνω του ορίου ανίχνευσης τους με την μέθοδο που χρησιμοποιήθηκε.

Τα υψηλότερα ποσοστά σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ανίχνευσης παρατηρήθηκαν για τις ενώσεις amitraz, bromopropylate, coumaphos και tau-fluvalinate σε μέλι παραγωγών, όπως φαίνεται στο **πίνακας 7.8.**

Πίνακας 7.8. Ποσοστά σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ανίχνευσης των φυτοπροστατευτικών ενώσεων στα μέλια.

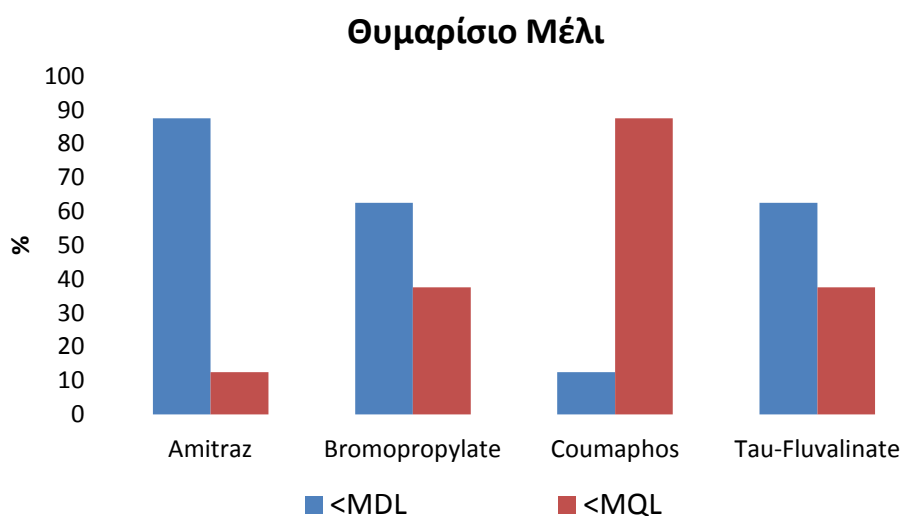
	<MDL%			
	Amitraz	Bromopropylate	Coumaphos	Tau-fluvalinate
Τυποποιημένο μέλι	73.68	31.58	5.26	52.63
Μέλι παραγωγών	88.23	76.47	76.47	64.7

Οι ακαρεοκτόνες ενώσεις δεν ανιχνεύθηκαν σε κανένα δείγμα από τα 36 δείγματα μελιού. Από τις ενώσεις αυτές, στο amitraz μόνο το 19.44% ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, στο bromopropylate το 47.22%, στο coumaphos το 61.11% και στο tau-fluvalinate το 41.67%. Στον **Πίνακα 7.9.** δίνεται το ποσοστό των θετικών ανιχνεύσεων επί του συνόλου των δειγμάτων μελιού (n=36) και η ελάχιστη, μέγιστη τιμή των συγκεντρώσεων (αν υπάρχουν) για κάθε ακαρεοκτόνο ένωση.

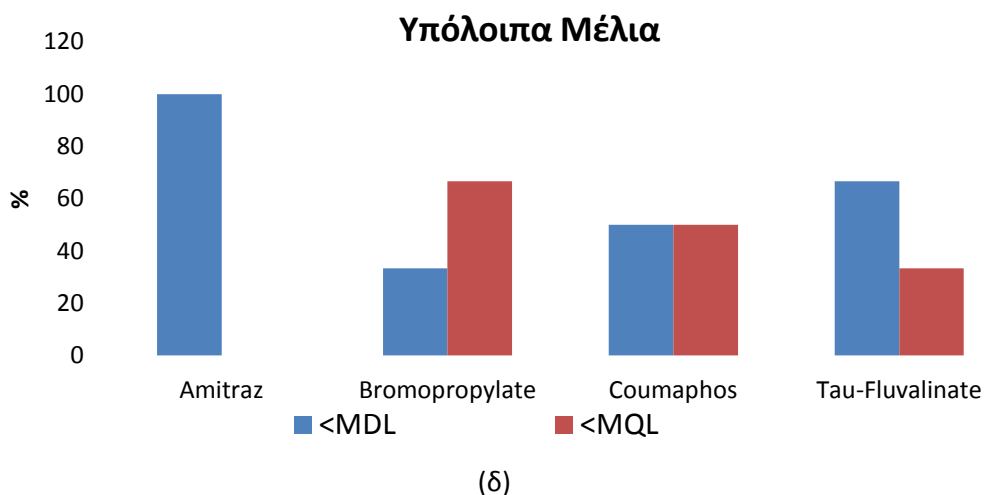
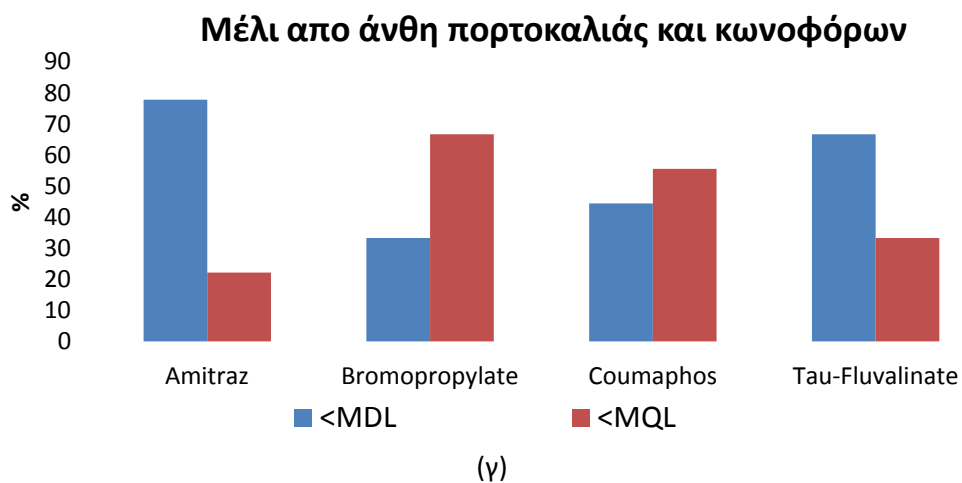
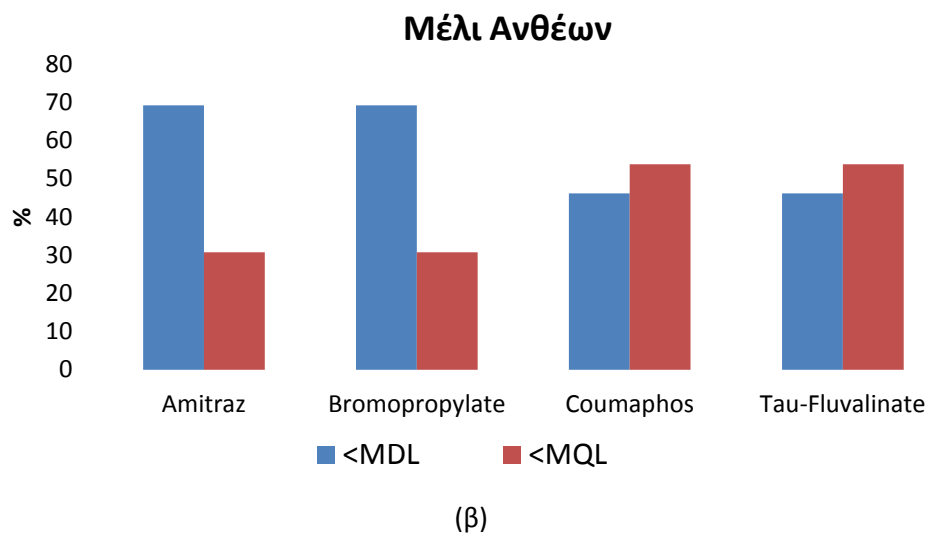
Πίνακας 7.9. Θετικές ανιχνεύσεις (%), εύρος συγκεντρώσεων για τις ακαρεοκτόνες ενώσεις που μελετήθηκαν στα μέλια.

	% Θετικές ανιχνεύσεις	C_{min} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	C_{max} ($\mu\text{g kg}^{-1}$)
Amitraz	0	<MDL	<MQL
Bromopropylate	0	<MDL	<MQL
Coumaphos	0	<MDL	<MQL
Tau-fluvalinate	0	<MDL	<MQL

Συγκρίνοντας περαιτέρω, τις συγκεντρώσεις των υπολειμμάτων στο τυποποιημένο μέλι και στο μέλι από συμβατική παραγωγή ανεξάρτητων μελισσοκόμων, στα τυποποιημένα μέλια προσδιορίστηκαν αξιοσημείωτα χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να διευκρινιστεί ότι τα τυποποιημένα δείγματα μελιού είναι από συγκομιδή της προηγούμενης μελισσοκομικής περιόδου και οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις των 4 δραστικών ουσιών (amitraz, bromopropylate, coumaphos και tau-fluvalinate) μπορούν να αποδοθούν στην σταθερότητα (χρόνος που παραμένει στο μέλι) υπολειμμάτων κατά την αποθήκευση του μελιού. Διότι κάποιες από τις χημικές ουσίες που παραμένουν ως υπολείμματα στα προϊόντα της κυψέλης διασπώνται και δίνουν παραπροϊόντα, ενώ άλλα είναι σταθερά.



(α)



Σχήμα 7.5. Ποσοστά (%) των ακαρεοκτόνων ενώσεων που ανιχνεύθηκαν σε συγκεντρώσεις κάτω των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης στα (α) θυμαρίσιο μέλι (n=8), (β) μέλι ανθέων (n=13), (γ) μέλι από άνθη πορτοκαλιάς και κωνοφόρων (n=9) και (δ) υπόλοιπα μέλια (πεύκου, ελάτης, φασκόμηλου και από άνθη εσπεριδοειδών, n=6).

Στο **Σχήμα 7.5**, δίνονται όλα τα αποτελέσματα από την ανάλυση των ακαρεοκτόνων ενώσεων στα μέλια. Από τα δείγματα θυμαρίσιου μελιού, στο amitraz το 12.5% ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης, στο bromopropylate το 37.5%, στο coumaphos το 87.5% και στο tau-fluvalinate το 37.5%. Από τα δείγματα μελιού ανθέων, ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης στα amitraz και bromopropylate το 30.77% και στα coumaphos και tau-fluvalinate το 53.85%. Στα δείγματα μελιού από άνθη πορτοκαλιάς και κωνοφόρων, ανιχνεύθηκε σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης στο amitraz το 22.22%, στο bromopropylate το 66.67%, στο coumaphos το 55.56% και στο tau-fluvalinate το 33.33%. Τέλος, στα υπόλοιπα δείγματα μελιού (πεύκου, ελάτης, φασκόμηλου και από άνθη εσπεριδοειδών), στο amitraz όλα τα δείγματα ανιχνευθήκαν κάτω του ορίου ανίχνευσης, ενώ ανιχνευθήκαν σε συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης στο bromopropylate το 66.67%, στο coumaphos το 50% και στο tau-fluvalinate το 33.33%.

Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κεφάλαιο 8

Συμπεράσματα διατριβής

Στην παρούσα διατριβή αρχικά αναπτύχθηκαν μέθοδοι προσδιορισμού τεσσάρων δραστικών ουσιών, διαφορετικών χημικών κατηγοριών και από διαφορετικές κατηγορίες μελιού (**Κεφάλαιο 6**).

Τα κύρια κριτήρια για την επιλογή των μελετώμενων ενώσεων ήταν η συχνότητα εφαρμογής από τους μελισσοκόμους. Η αποδεδειγμένη παρουσία και εν δυνάμει τοξικότητα των ενώσεων στο περιβάλλον λήφθηκε επίσης υπόψιν, προκειμένου να συμπεριληφθούν ενώσεις που χρήζουν συστηματικής μελέτης.

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των τεσσάρων αναλυτών στο μέλι περιλαμβάνει την τεχνική εκχύλισης της QuEChERS και τον καθαρισμό του εκχυλίσματος με την τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης σε διασπορά (dispersive solid phase extraction, d-SPE). Οι ενώσεις εκχυλίστηκαν και τα εκχυλίσματα καθαρίστηκαν με κατάλληλα μίγματα αλάτων προσαρμοσμένα στη μήτρα και τις προς εκχύλιση ουσίες. Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC-UV/DAD), ενώ η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (Ultra High Pressure Liquid Chromatography, UHPLC) και συγκεκριμένα με τον υβριδικό αναλυτή μαζών LTQ/Orbitrap MS καθώς επίσης και με σύστημα αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS).

Τα σημαντικότερα συμπεράσματα που προέκυψαν από την σχετική μελέτη ανάπτυξης των αναλυτικών μεθοδολογιών είναι :

- Η ποσοτικοποίηση σε όλες τις περιπτώσεις (βελτιστοποίηση, επικύρωση και εφαρμογή των μεθόδων) πραγματοποιήθηκε με καμπύλες αναφοράς προσομοιωμένες στο υπόστρωμα (matrix-matched calibration curves). Τα κριτήρια για τον ορθό ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης ήταν τα προβλεπόμενα από τις οδηγίες 2002/657/EK, SANTE 11813/2017 και 96/23/EK.

- Η εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα μέλια πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο QuEChERS ακολουθούμενη από καθαρισμό με εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (dSPE), αφού προηγήθηκε βελτιστοποίηση των σημαντικότερων παραμέτρων για τα μείγματα των επιλεγμένων ακαρεοκτόνων ενώσεων. Όσον αφορά τα άλατα της εκχύλισης, επιλέχθηκαν τα άνυδρο θειικό μαγνήσιο, χλωριούχο νάτριο, κιτρικό νάτριο και σεσκιυδρίτης διβασικού κιτρικού νατρίου (4 g MgSO_4 , 1 g NaCl , 1 g NaOAc και 0.5 g κιτρικό δινάτριο). Ο διαλύτης της εκχύλισης ήταν το ακετονιτρίλιο (10 mL). Ως βέλτιστη ποσότητα του προς ανάλυση δείγματος επιλέχθηκαν τα 5 g μελιού. Ακόμη, η διερεύνηση της χρησιμότητας επανυδάτωσης του δείγματος πριν από την εκχύλιση κατέδειξε ότι η προσθήκη 10 mL νερού πριν από την εκχύλιση είναι απαραίτητη. Επίσης, η ψύξη του δείγματος δε βελτίωσε τις ανακτήσεις, όμως παράλληλα δεν προκάλεσε και προβλήματα διάσπασης, εξασφαλίζοντας ότι η συντήρηση των δειγμάτων υπό ψύξη είναι ενδεδειγμένη. Ο χρόνος της εκχύλισης ορίστηκε στο 1 min ενώ για την αποφυγή των συσσωματωμάτων, βοήθησε η έντονη ανακίνηση χειροκίνητα πριν την τοποθέτηση στο vortex.
- Στην μελέτη καθαρισμού των εκχυλισμάτων, μελετήθηκαν διαφορετικοί συνδυασμοί προσροφητικών και τελικά επιλέχθηκε αυτός του PSA (25 mg) με ταυτόχρονη προσθήκη 150 mg MgSO_4 , παρέχοντας πολύ πιο καθαρά εκχυλίσματα χωρίς να ενέχεται κίνδυνος απώλειας αναλυτών. Τα τελικά εκχυλίσματα συμπυκνώνονταν κάτω από ήπιο ρεύμα αζώτου στους 30°C και επαναδιαλύονταν σε 1 mL μεθανόλη.
- Τα αποτελέσματα από την επικύρωση της μεθόδου QuEChERS επιβεβαίωσαν την καταλληλότητα της για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων σε μέλια. Για τις ακαρεοκτόνες ενώσεις που αναλύθηκαν με την μέθοδο HPLC-UV/DAD, οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 78% έως 103%, τα όρια ποσοτικοποίησης ήταν κάτω από 65 $\mu\text{g kg}^{-1}$, η γραμμικότητα ήταν μεγαλύτερη από 0.998 σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) υπολογίστηκε κάτω από 13% και 12.5% αντίστοιχα. Η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος φανέρωσε ότι για τις επιλεγμένες ενώσεις η

επίδραση από το υπόστρωμα είναι σταθερή και δεν έχει σημαντική επίδραση (0.7-2.54%).

Η μέθοδος προσδιορισμού που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των 4 δραστικών ουσιών στο μέλι εφαρμόστηκε σε διάφορες κατηγορίες μελιού, για την εκτίμηση της ύπαρξης και των επιπέδων συγκέντρωσης των επιλεχθέντων ενώσεων σε αυτά. Ο έλεγχος μελιού περιέλαβε τυποποιημένα δείγματα μελιού και βιολογικού μελιού. Τα δείγματα μελιού προήλθαν από καταστήματα λιανικής πώλησης από την περιοχή των Ιωαννίνων. Το σύνολο των δειγμάτων αναλύθηκε για την παρουσία υπολειμμάτων ακαρεοκτόνων δραστικών ουσιών και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον **Πίνακα 7.2.**

Τα αποτελέσματα των αναλύσεων, καθώς και τα συμπεράσματα που προέκυψαν από την σχετική μελέτη ελέγχου των μελιών παρατίθενται παρακάτω και είναι:

- Η εξέταση 19 τυποποιημένων δειγμάτων μελιού που προήλθαν από καταστήματα λιανικής πώλησης από την περιοχή των Ιωαννίνων δεν υπέδειξε την παρουσία των τεσσάρων δραστικών ουσιών ακαρεοκτόνου δράσης.
- Το bromopropylate δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα 19 δείγματα μελιού (**Πίνακας 7.2.**). Ειδικότερα σε ότι αφορά στο bromopropylate, η μηδενική παρουσία του σε αποτελέσματα αναλύσεων δειγμάτων οφείλεται στο γεγονός ότι πρόκειται για δραστική ουσία που δεν έχει έγκριση για μελισσοκομική χρήση τα τελευταία έτη. Επιπλέον, δε θα πρέπει να παραβλέπεται το γεγονός της πιθανότητας μεταφοράς του bromopropylate στο μέλι, έπειτα από εφαρμογή του σε συγκεκριμένες γεωργικές καλλιέργειες όπως εσπεριδοειδή, μηλοειδή και λαχανικά. Αυτός είναι ο λόγος, που για το bromopropylate θεσπίστηκε MRL για το μέλι, βάση του Κανονισμού της Ε.Ε. 37/2010. Το MRL στην περίπτωση μεταφοράς από γεωργικές καλλιέργειες αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0.1 mg kg^{-1} και είναι σημαντικά υψηλότερο από το MRL της μελισσοκομικής χρήσης που αντιστοιχεί στο όριο ποσοτικού προσδιορισμού.
- Το coumaphos δεν ανιχνεύτηκε σε κανένα από τα 19 δείγματα μελιού (**Πίνακας 7.2.**). Τελικό συμπέρασμα για το συγκεκριμένο ακαρεοκτόνο είναι πως δεν αναμένεται να προκαλέσει οποιοδήποτε πρόβλημα στην ασφάλεια και τη νομιμότητα του διακινούμενου μελιού, καθώς δεν χρησιμοποιείται πλέον, τόσο

στο χώρο της μελισσοκομίας, όσο και στον ευρύτερο χώρο της γεωργίας. Το ανώτατο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων που θεσπίστηκε με τον Κανονισμό 37/2010 της Ε.Ε. είναι 0.1 mg kg^{-1} .

- Οι ανιχνεύσιμες συγκεντρώσεις του ακαρεοκτόνου tau-fluvalinate κυμάνθηκαν πολύ κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης. Το ανώτατο επιτρεπτό όριο υπολειμμάτων που θεσπίστηκε με τον Κανονισμό 37/2010 της Ε.Ε. θεσπίστηκε στα 0.2 mg kg^{-1} και αποτελεί το όριο για το μέλι που διακινείται στην Ελλάδα.
- Ως μη συμμορφούμενα προς τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου δεν κρίθηκε κανένα δείγμα από τα 19 αναλυθέντα δείγματα. Επομένως, το ποσοστό εμφάνισης ήταν 0% στα δείγματα μελιών από την Ελληνική αγορά που παρατηρήθηκε στη συγκεκριμένη μελέτη.

Τα δείγματα μελιού από παραγωγούς προήλθαν από την περιοχή των Ιωαννίνων, την Άρτα και τα Χανιά. Πιο αναλυτικά, 12 δείγματα συλλέχθηκαν από την περιοχή των Ιωαννίνων, 4 δείγματα συλλέχθηκαν από την περιοχή της Άρτας και 1 δείγμα συλλέχθηκε από περιοχή των Χανίων. Το σύνολο των δειγμάτων αναλύθηκε για την παρουσία υπολειμμάτων ακαρεοκτόνων δραστικών ουσιών και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον **Πίνακα 7.3.** Τα αποτελέσματα των αναλύσεων, καθώς και τα συμπεράσματα που εξάγονται παρατίθενται παρακάτω και είναι:

- Η εξέταση 14 συμβατικών δειγμάτων μελιού (χύμα-ανεξάρτητων παραγώγων) που συλλέχθηκαν στην περιοχή των Ιωαννίνων, Άρτας και Χανίων δεν υπέδειξε την παρουσία των τεσσάρων δραστικών ουσιών ακαρεοκτόνου δράσης.
- Τα τρία βιολογικά μέλια που εξετάστηκαν δεν περιείχαν υπολείμματα ακαρεοκτόνων φυτοπροστατευτικών ενώσεων.

Εν κατακλείδι, η ολοκλήρωση της παρούσας Διατριβής οδήγησε στην ανάπτυξη αναλυτικής μεθοδολογίας για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε μέλια.

Η μέθοδος πραγματοποιήθηκε με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-UV/DAD) και η επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων στα δείγματα μελιού με την μέθοδο της υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης

με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (UHPLC/LTQ-ORBITRAP MS) και με την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας (GC-MS), αποδεικνύονται πολύτιμα εργαλεία για την αναλυτική χημεία και την περιβαλλοντική ανάλυση. Επιπλέον, προσφέρουν εξαιρετικά ακριβείς και αξιόπιστες μετρήσεις, εξαλείφοντας σχεδόν την πιθανότητα ψευδών αποτελεσμάτων, ακόμα και σε πολύπλοκα υποστρώματα και μάλιστα όταν οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις αφορούν ίχνη.

Η επιλογή της σχετικά πρόσφατης, απλής και φιλικής προς το περιβάλλον μεθόδου QuEChERS, αποδεικνύεται ιδανική για τα μέλια. Σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε είναι ο μικρός συνολικός χρόνος ανάλυσης, ο μικρός αριθμός των σταδίων, το δυναμικό εύρος των αναλυόμενων ενώσεων αλλά και η σχετική μείωση του κόστους ανάλυσης.

Γενικότερο συμπέρασμα αποτελεί η διαπίστωση ότι το μέλι δεν επιβαρύνεται από υπολείμματα των τεσσάρων φυτοπροστατευτικών ουσιών που μελετήθηκαν, αλλά από λανθασμένη χρήση των εγκεκριμένων και μη ακαρεοκτόνων που χρησιμοποιούν οι μελισσοκόμοι για την καταπολέμηση του ακάρεος *Varroa destructor* Anderson & Trueman. Ακόμα και στις περιπτώσεις που ανιχνεύτηκαν υπολείμματα των ακαρεοκτόνων δραστικών στο μέλι, η ασφάλεια και ποιότητα των τροφίμων παραμένει υψηλή, καθώς οι προσδιορισθείσες συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν στα επίπεδα του MQL. Το γεγονός ότι τα δείγματα δεν ξεπέρασαν το MRL δεν συνιστούν διατροφικό κίνδυνο με βάση την Ημερήσια Αποδεκτή Πρόσληψη και την ημερήσια κατανάλωση του μελιού.

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΙΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΜΕΛΙ**

Ερμιόνη Σ. Γότση
Διδακτορική Διατριβή

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η επιβάρυνση των προϊόντων κυψέλης με υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών και λοιπών ρυπαντών οφείλεται σε δύο παράγοντες. Ο πρώτος παράγοντας είναι το περιβάλλον, διαμέσου του οποίου εισέρχονται στην κυψέλη υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ενώσεων, αντιβιοτικών, βαρέων μετάλλων, PCBs κ.α.. Η παρουσία των περιβαλλοντικών ρύπων στα προϊόντα κυψέλης δεν θεωρείται δεδομένη, καθώς τα αποτελέσματα των σχετικών ερευνών είναι σε πολλές περιπτώσεις αντικρουόμενα. Σε αρκετές περιπτώσεις, η ανάλυση των προϊόντων της μέλισσας είχε ως αποτέλεσμα τη διαπίστωση της παρουσίας πολύ χαμηλών έως οριακά ανιχνεύσιμων συγκεντρώσεων υπολειμμάτων περιβαλλοντικών ρύπων. Ο δεύτερος παράγοντας αφορά στον ίδιο το μελισσοκόμο, που με τις επεμβάσεις του επιβαρύνει τα προϊόντα με υπολείμματα αντιβιοτικών, ακαρεοκτόνων και πτητικών εντομοκτόνων. Στην περίπτωση των υπολειμμάτων που οφείλονται στις επεμβάσεις που πραγματοποιεί ο μελισσοκόμος στην κυψέλη, τα αποτελέσματα των μελετών συγκλίνουν μεταξύ τους. Ερωτηματικό στη συγκεκριμένη περίπτωση αποτελεί η προσδιοριζόμενη συγκέντρωση υπολειμμάτων, σε σχέση με τη δραστική ουσία και τον τρόπο εφαρμογής της. Έτσι, ο έλεγχος των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι και τα υπόλοιπα προϊόντα κυψέλης είναι απαραίτητος για την προστασία του

καταναλωτή. Ιδιαίτερα σημαντικός κρίθηκε ο προσδιορισμός των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι, το οποίο παράγεται με ήπιες διεργασίες (με φυγοκέντρηση σε οριζόντιο φυγοκεντρικό σύστημα), επιτρέπεται αλλά και συνίσταται να καταναλωθεί ωμό λόγω των αποδεδειγμένων ευεργετικών ιδιοτήτων του. Οι διαστάσεις του προβλήματος θα μπορούσαν να είναι ακόμα μεγαλύτερες αν ληφθεί υπόψη και η ισχύουσα αγρο-οικονομική πολιτική του μελιού όπου ο ίδιος ο παραγωγός εμπορεύεται το προϊόν, προϊόν μεγάλης οικονομικής σημασίας όπου πάντα ένα από τα επίκαιρα αναλυτικά και νομοθετικά προβλήματα που αντιπροσώπευε ήταν η νοθεία του. Ωστόσο, η νομοθεσία για τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο μέλι είναι περιορισμένη και έρχεται σε αντιδιαστολή με το όλο και πιο αυστηρό νομοθετικό πλαίσιο που αναπτύσσεται γύρω από τον καθορισμό των ποιοτικών χαρακτηριστικών του. Έτσι, η Ευρωπαϊκή Ένωση δεν προβλέπει ανώτατα επιτρεπτά όρια παρά μόνο για το πρωτογενές προϊόν (μέλι) ενώ η Επιτροπή του Κώδικα Τροφίμων (Codex Alimentarius Commission, FAO/WHO) δεν προτείνει MRLs για τις δραστικές ουσίες στο μέλι. Σε όλα τα ανωτέρω εισέρχεται και η αναλυτική δυσκολία που παρουσιάζουν τα υποστρώματα και ιδιαίτερα του μελιού στον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων ο οποίος κατά βάση πραγματοποιείται με αέρια και υγρή χρωματογραφία. Έτσι, οι αναλυτικές μεθοδολογίες προσδιορισμού υπολειμμάτων που συνήθως προτείνονται περιλαμβάνουν δραστικές ουσίες από την ίδια χημική κατηγορία φυτοφαρμάκων με επικρατέστερη κατηγορία αυτή των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων.

Στο πλαίσιο των παραπάνω παρατηρήσεων, η ανάπτυξη μιας μεθόδου υπολειμμάτων για την ανάλυση φυτοπροστατευτικών προϊόντων από διαφορετικές χημικές οικογένειες σε ένα δύσκολο υπόστρωμα σε μια τέτοια ανάλυση όπως το μέλι, ήταν ο πρωταρχικός στόχος της παρούσα μελέτης.

Το κείμενο της εργασίας αποτελείται από δυο μέρη, το θεωρητικό μέρος και το πειραματικό μέρος. Στο θεωρητικό μέρος δίνονται πληροφορίες για τους τρόπους επιβάρυνσης του μελιού και των άλλων προϊόντων κυψέλης με παρασιτοκτόνα ή και άλλους ρύπους. Ακόμα, δίνονται πληροφορίες για τα παρασιτοκτόνα (φυτοπροστατευτικά προϊόντα και κτηνιατρικά φάρμακα) και για τις κατηγορίες ταξινόμησης των ουσιών αυτών, τη τοξικότητα τους σύμφωνα με τους

Κανονισμούς της Ευρωπαϊκή Ένωσης, και στατιστικά στοιχεία για την αγορά γεωργικών φυτοπροστατευτικών ουσιών (**Κεφάλαιο 1**). Επίσης, δίνονται πληροφορίες για το μέλι, τις κατηγορίες του και την χημική του σύσταση (**Κεφάλαιο 2**). Επίσης, δίνονται πληροφορίες για τις ασθένειες των μελισσών, καθώς και την ισχύουσα νομοθεσία για τα υπολείμματα γεωργικών φαρμάκων στο μέλι και τα ανώτατα επιτρεπτά όρια καταλοίπων φυτοπροστατευτικών ουσιών σε προϊόντα ζωικής προέλευσης (**Κεφάλαιο 3**). Τέλος, γίνεται εκτενής αναφορά στην αναλυτική μεθοδολογία, στις τεχνικές εκχύλισης, καθώς και πρόσφατη ανασκόπηση αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ουσιών και ακαρεοκτόνων στο μέλι (**Κεφάλαιο 4**).

Στο πειραματικό μέρος παρουσιάζονται ο σκοπός της πραγματοποίησης της παρούσας εργασίας και αναπτύσσεται η αναλυτική μεθοδολογία και το οργανικό σύστημα υγρής και αέριας χρωματογραφίας που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό και την επιβεβαίωση των ουσιών στόχου (**Κεφάλαιο 5**).

Στο **Κεφάλαιο 6** περιγράφονται οι μέθοδοι υπολειμμάτων που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό 4 δραστικών ουσιών, από διαφορετικές χημικές οικογένειες φυτοπροστατευτικών προϊόντων (πυρεθροειδή, οργανοφωσφόρος, τριαδιαζίνες και οργανοχλωρίνες) και έχουν χρησιμοποιηθεί ως ακαρεοκτόνα. Τα επιλεγμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αναλύθηκαν με HPLC χρησιμοποιώντας ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας σε σύστημα συστοιχίας διόδων SPD-M10A (UV/Diode Array Detector, UV/DAD) και στήλη Discovery C18.

Η αναλυτική μέθοδος για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων στο μέλι αναπτύχθηκε, βελτιστοποιήθηκε και αξιολογήθηκε σταδιακά. Για το σκοπό αυτό, πραγματοποιήθηκαν δύο διαδικασίες εκχύλισης: α) η εκχύλιση QuEChERS, κατά την οποία το δείγμα διαλύεται σε νερό και ακετονιτρίλιο και ακολουθεί η προσθήκη αλάτων β) η εκχύλιση διασποράς προσροφητικού υλικού στο υπόστρωμα (MSPD), κατά την οποία το δείγμα ομογενοποιήθηκε σε γουδί με silica gel και ακολουθεί η εκχύλιση των αναλυτών με την χρήση θειικού νατρίου και Florisil και ακολουθεί έκλυση με διχλωρομεθάνιο–οξικό αιθυλεστέρα (9:1, v/v) δοκιμάστηκαν για τη βελτιστοποίηση των υψηλότερων ανακλήσεων φυτοφαρμάκων με το χαμηλότερο κατάλοιπο μελιού στα τελικά εκχυλίσματα. Πραγματοποιήθηκαν πειραματικές δοκιμές προκειμένου να μελετηθεί η αποτελεσματικότητα διαφορετικών

διαδικασιών καθαρισμού με την τεχνική εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης (d-SPE) σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-UV/DAD). Η ανάκτηση φυτοπροστατευτικών προϊόντων από το μέλι με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε κυμαινόταν από 78 έως 103%, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης φυτοφαρμάκων από 10-20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και 35-65 $\mu\text{g kg}^{-1}$ και η ακρίβεια, εκφραζόμενη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) κυμαινόταν από 3 έως 13%.

Η προτεινόμενη μέθοδος για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των 4 φυτοπροστατευτικών ουσιών στο μέλι εφαρμόστηκε με επιτυχία σε 36 δείγματα μελιού (**Κεφάλαιο 7**). Τα περισσότερα δείγματα αναλύθηκαν ελήφθησαν από μεμονωμένους παραγωγούς κατά την περίοδο της συγκομιδής 2019. Σε αυτήν την έρευνα συμπεριλήφθηκαν επίσης δείγματα βιολογικών κατηγοριών, καθώς και δείγματα μελιού που έχουν συσκευαστεί στο εμπόριο, προκειμένου να καλυφθεί το μεγαλύτερο μέρος της προσφοράς Ελλήνων καταναλωτών σε μέλι κατά την περίοδο 2016-2019.

Τα αποτελέσματα της εκτεταμένης παρακολούθησης που πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές κατηγορίες μελιού δείχνουν ότι σε κανένα δείγμα είτε από παραγωγούς είτε τυποποιημένου μελιού δεν περιείχαν καμία από τις 4 δραστικές ουσίες που μελετήθηκαν.

Σε σχέση με τις υπάρχουσες μεθόδους, η προτεινόμενη μεθοδολογία οδηγεί σε υψηλότερη συγκέντρωση του κλάσματος φυτοφαρμάκων επιτρέποντας τον ευαίσθητο και επιλεκτικό προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών ουσιών σε μέλι με παρόμοια ή χαμηλότερα mMDL των φυτοπροστατευτικών ουσιών που μελετήθηκαν. Αυτό το πλεονέκτημα μαζί με τα πλεονεκτήματα του χαμηλού κόστους, της χαμηλής κατανάλωσης διαλυτών και των μη ειδικών απαιτήσεων οργάνων στην προετοιμασία του δείγματος είναι σημαντικά, δεδομένου ότι ένα σημαντικό καθήκον της αναλυτικής πειθαρχίας είναι η παροχή αξιόπιστων και οικονομικά αποδοτικών μεθόδων. Η έρευνα για τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών ουσιών σε διαφορετικές κατηγορίες δειγμάτων μελιού που πραγματοποιήθηκε με εφαρμογή αναλυτικής μεθόδου επισήμανε την επείγουσα

ανάγκη για ανάλυση ελέγχου χρησιμοποιώντας μεθόδους υπολειμμάτων, καθώς οι μελισσοκόμοι μπορούν να χρησιμοποιούν φυτοπροστατευτικά προϊόντα για να εξασφαλίσουν υψηλής ποιότητας μέλι.

Development and application of a multiresidue method for the determination of pesticide residues in honey

Ermioni S. Gotsi

Ph.D Thesis

SUMMARY

The burden of hive products with residues of plant protection substances and other pollutants is due to two factors. The first factor is the environment through which residues of plant protection compounds, antibiotics, heavy metals, PCBs, etc. enter the hive. The presence of environmental pollutants in the hive products is not taken for granted, as the results of relevant research are in many cases conflicting. In several cases, the analysis of bee products resulted in the presence of very low to marginally detectable concentrations of environmental pollutants. The second factor concerns the beekeeper himself, who with his interventions burdens the products with residues of antibiotics, acaricides and volatile insecticides. In the case of residues due to the beekeeper's interventions in the hive, the results of the studies converge. Questionable in this case is the identified concentration of residues, in relation to the active substance and the method of its application. Thus, control of pesticide residues in honey and other beehive products is necessary to protect the consumer. Particularly important was the determination of pesticide residues in honey, which is produced by mild processes (by centrifugation in a horizontal centrifugal system), allowed and recommended to be consumed raw due to its proven beneficial properties. The scale of the problem could be even greater if we

take into account the current agricultural and economic policy of honey where the producer himself trades the product, a product of great economic importance where always one of the current analytical and legislative problems it represented was fraud. However, the legislation on pesticide residues in honey is limited and contradicts the increasingly strict legal framework that develops around determining its quality characteristics. European Union established MRLs of pesticides in the commodity of honeys and Codex Alimentarius Commission accessory of honeys has not established MRLs for pesticides in honey. In all of the above, the analytical difficulty presented by the substrates and especially of the honey in the determination of pesticide residues enters, which is basically carried out with gases and liquid chromatography. Thus, the detailed methodologies for identifying residues that are commonly suggested include active substances from the same chemical class of pesticides as the predominant class of organophosphate insecticides.

In the context of the above observations, the development of a method of residues for the analysis of pesticide products from different chemical families on a difficult substrate in such an analysis as honey, was the primary goal of this study.

The text of the work consists of two parts, the theoretical part and the experimental part. The theoretical part provides information on how honey and other bee products can be loaded with pesticides or other pollutants. In addition, information is provided on pesticides and on the categories of classification of these substances, their toxicity in accordance with European Union Regulations, and statistics on the purchase of agricultural pesticides (**Chapter 1**). Information is also given on honey, its categories and its chemical composition (**Chapter 2**). Information is also provided on bee diseases, as well as current legislation on the residues of agricultural residues in honey and the maximum residue levels (MRLs) in food of animal products (**Chapter 3**). Finally, extensive reference is made to analytical methodology, extraction techniques, and recent review of detailed methods for the determination of pesticide residues and acaricides in honey (**Chapter 4**).

In the experimental part, the purpose of the present work is presented and the detailed methodology and the instrumental system of liquid and gaseous

chromatography used for the determination and confirmation of the target substances are developed (**Chapter 5**).

In **Chapter 6** are described the residue methods developed for the determination of 4 active substances, from different chemical families of pesticides (pyrethroids, organophosphorus, triadiazines and organochlorines) using acaricides. Selected pesticides were analysed by liquid chromatography coupled to a Shimadzu UV detector with the diode array SPD-M10A (UV/Diode Array Detector, UV/DAD) and a Discovery C18 column.

The analytical method for residue determination in honey was stepwise developed, optimized and evaluated. For this purpose, two extraction procedures were performed: a) QuEChERS extraction, in which the sample is dissolved in water and acetonitrile, followed by the addition of salts b) Matrix solid phase dispersion (MSPD), in a mortar with silica gel followed by the extraction of analyzers using sodium sulfate and Florisil followed by extraction with dichloromethane-acetyl ethyl ester (9:1, n/n) were tested to optimize the highest pesticide recoveries with the lowest residue extracts. Experimental tests were performed to study the effectiveness of different cleaning procedures with the solid-phase diffusion extraction (d-SPE) technique in combination with high-performance liquid chromatography (HPLC-UV/DAD). Pesticide recoveries from honey with the method developed ranged from 61.75 to 113.75%, pesticide detection and quantification limits from 10-20 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and 35-65 $\mu\text{g kg}^{-1}$ respectively, expressed as relative standard deviation (RSD%) ranged from 3 to 13%.

The proposed method for the residue determination of the 4 pesticides in honey was applied successfully in 36 honey samples (**Chapter 7**). Most of the samples analysed were obtained from individual beekeepers at the time of their production in apiculture, during the honey crop period 2019. Organic samples, as well as commercial packed honey samples were also included in this survey in order to cover the largest part of Greek consumer's supply in honey during 2016-2019.

Results of the extended monitoring performed in different types of honey show that none of the samples (from producers and standard honey) did not contain any of the 4 active substances studied.

Relative to existing methods, the proposed methodology lead to a higher concentration of the pesticide fraction allowing the sensitive and selective determination of pesticides in honey with similar or lower mMDL of the pesticides studied. This advantage along with the advantages of low cost, low solvent consumption and non-specific instrument requirements in sample preparation are important, as an important task of analytical discipline is to provide reliable and cost-effective methods. Research on pesticide residues in different categories of honey samples carried out using a detailed analysis method highlighted the urgent need for control analysis using residual methods, as beekeepers can use plant protection products to ensure high quality honey.

E. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Adamczyk S., Lázaro R., Pérez-Arquillué C., Herrera A., 2007. Determination of synthetic acaricides residues in beeswax by high-performance liquid chromatography with photodiode array detector. *Analytica Chimica Acta*, 581, p.p. 95-101.
- Aloglu A.K., Harrington Peter de B., Sahin S., Demir C., 2017. Chemical profiling of floral and chestnut honey using high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, p.p. 205-210.
- Altun S.K., Dinç H., Paksoy N., Temamoğullari F.K., Savrunlu M., 2017. Analyses of mineral content and heavy metal of honey samples from South and East region of Turkey by using ICP-MS. *Hindawi, International Journal of Analytical Chemistry*, Article ID6391454, p.p. 6.
- Amendola G., Pelosi P., Dommarco R., 2011. Solid-phase extraction for multi-residues analysis of pesticides in honey. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 46, p.p. 24-34.
- 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), p.p. 412-431.
- Annual Report on Surveillance for Veterinary Residues in the UK, 2007. Available from: <http://www.vet-residues-committee.gov.uk/Reports/vrcar2007other.pdf>
- AOAC Official Method 2007.01, 2007. Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. AOAC Int.
- Arthur C.L., Pawliszyn J., 1990. *Anal. Chem.*, 62, p.p. 2145.

- Astwood K., Lee B., Manley-Harris M., 1998. Oligosaccharides in New Zealand Honeydew Honey. *J. Agric. Food Chem.*, 46, p.p. 4958-4962.
- Atienza J., Jimenez J.J., Bernal J.L., Martin M.T., 1993. Supercritical fluid extraction of fluvalinate residues in honey. Determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 655, p.p. 95-99.
- Atkins E.L., Kellum D., 1984. Microencapsulated pesticides: Visual microscopical detection of capsules: Quantification of residue in honey and pollen. *American Bee Journal*, 124, p.p. 800-804.
- Balayiannis G., Balayiannis P., 2008. Bee Honey as a Environmental Bioindicator of Pesticides Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 55 (3), p.p. 462-470.
- Balayiannis P.G., 2001. Gas chromatographic determination of coumaphos and tau-fluvalinate in royal jelly produced under commercial conditions. *Journal of Apicultural Research*, 40 (2), p.p. 71-78.
- Baltussen E., Sandra P., David F., Cramers C., 1999. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), Novel Extraction Techniques for Aqueous Samples: Theory and Principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 11 (10), p.p. 737-747.
- Banerjee B.D., 1999. The influence of various factors on immune toxicity assessment of pesticide chemicals. *Toxicology Letters*, 107, p.p. 21-31.
- 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*, p.p. 98-109.

- Barakat A.A., Badawy H.M.A., Salama E., Attallah E., Maatook G., 2007. Simple and rapid method of analysis for determination of pesticide residues in honey using dispersive solid phase extraction and GC determination. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 5 (2), p.p. 97-100.
- Bargańska Z., Ślebioda M., Namieśnik J., 2013. Pesticide residues levels in honey from apiaries located of Northern Poland. *Food Control*, 31, p.p. 196-201.
- Barker S.A., 2007. Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70 (2), p.p. 151-162.
- Berlitz-Barbier A., Vauchez A., Wiest L., Baudot R., Vulliet E., Cren-Olivé C., 2014. Multi-residue analysis of emerging pollutants in sediment using QuEChERS-based extraction followed by LC-MS/MS analysis. *Anal Bioanal Chem.*, 406, p.p. 1259–1266. doi: 10.1007/s00216-013-7450-8.
- Bernal J.L., Nozal del M.J., Rivera J.M., Jimenez J.J., Atienza J., 1996. Determination of the fungicide vinclozolin in honey and bee larvae by solid-phase and solvent extraction with gas chromatography and electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 754, p.p. 507-513.
- Bernal J.L., Nozal del M.J., Toribio L., Jimenez J.J., Atienza J., 1997. High-performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian samples. *Journal of Chromatography A*, 787, p.p. 129-136.
- Bernal J.L., Jimenez J.J., Nozal del M.J., Higes M., Llorente J., 2000. Gas Chromatographic determination of acrinathrine and 3-phenoxybenzaldehyde residues in honey. *Journal of Chromatography A*, 882, p.p. 239-243.
- Bernal J.L., Nozal M.J., Jiménez J.J., Martín M.T., Sanz E., 2009. A new and simple method to determine trace levels of sulfonamides in honey by high

- performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1216, p.p. 7275-7280.
- Berrada H., Carlos M.J., Jordi M., Guillermina F., Amendola G., Pelosi P., Dommarco R., 2011. Survey of 50 multiclass pesticide residues in bee products. *Toxicology Letters*, 211S, p.p. S43-S216.
- Blasco C., Fernandez M., Pena A., Lino C., Silveira MAI., Font G., Pico Y., 2003. Assessment of pesticide residues in honey samples from Portugal and Spain. *Journal of Agriculture & Food Chemistry*, 51, p.p. 8132-8138.
- Blasco C., Font G., 2002. "Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry.". *J. Chromatogr A*, 970 (1-2), p.p. 201-212.
- Blasco C., Fernandez M., Pico Y., Font G., 2004. Comparison of solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction for determining six organophosphorus insecticides in honey by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1030, p.p. 77-85.
- Bogdanov S., 2006. Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37, p.p. 1-8.
- Bommuraj V., Chen Y., Klein H., Sperling R., Barel S., Shimshoni J.A., 2019. Pesticide and trace element residues in honey and beeswax combs from Israel in association with human risk assessment and honey adulteration. *Food Chemistry*, 299, p.p. 125123.
- Bonerba E., Panseri S., Arioli F., Nobile M., Terio V., Di Cesare F., Tantillo G., Chiesa L.M., 2021. Determination of antibiotic residues in honey in relation to different potential sources and relevance for food inspection. *Food Chemistry*, 334, 127575.

- Bormatin J.M., Moineau I., Charvet R., Fleche C., Colin M.E., Bengsch E.R., 2003. A LC/APCI/MS/MS method for analysis of imidacloprid in soils, in plants and in pollens. *Anal. Chem.*, 75, p.p. 2027-2033.
- Bouhlali E.T., Bammou M., Sellam K., Midaoui A.E., Bourkhis B., Ennassir J., Alem C., Filali-Zegzouti Y., 2019. Physicochemical properties of eleven monofloral honey samples produced in Morocco. *Arab Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 26, No.1, p.p. 476-487.
- Calatayud-Vernich P., Calatayud F., Simó E., Picó Y., 2016. Efficiency of QuEChERS approach for determining 52 pesticide residues in honey and honey bees. *MethodsX*, 3, p.p. 452-458.
- Campillo N., Viñas P., Férrez-Melgarejo G., Hernández-Córdoba M., 2013. Liquid chromatography with diode array detection and tandem mass spectrometry for the determination of neonicotinoid insecticides in honey samples using dispersive liquid liquid microextraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61, p.p. 4799-4805.
- Carson R., 1962. *Silent Spring*. Boston: Houghton Mifflin Co.
- Česnik H.B., Kmecl V., Bolta S.V., 2019. Pesticide and veterinary drug residues in honey—validation of methods and a survey of organic and conventional honeys from Slovenia. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 36 (9), p.p. 1358-1375.
- Chauzat M.P., Faucon J.P., Martel A.C., Lachaize J., Cougoule N., Aubert M., 2006. A survey of pesticide residues in pollen loads collected by honey bees in France. *Journal of Economic Entomology*, 99 (2), p.p. 253-262.
- Chen H., Ying J., 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 Chem. Acta, 632 (1), p.p. 80-85.
- Chen Y.P., Evans J.D., Murphy C., Gutell R., Zuker M., Gundensen–Rindale D., Pettisa J.S., 2009. Morphological, Molecular and Phylogenetic characterization of *Nosema ceranae*, a Microsporidian Parasite isolated from the European Honey Bee, *Apis mellifera*, Journal of Eukaryotic Microbiology, 56 (2), p.p. 142-147.
- 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), p.p. 1244-1248.
- Cherchi A., Spanedda L., Tuberoso C., Cabras P., 1994. Solid-phase extraction and hing-performance liquid chromatographic determination of organic acids in honey. J. Chromatogr. A, 669, p.p. 59-64.
- Chiesa L.M., Labella G.F., Giorgi A., Panseri S., Pavlovic R., Bonacci S., Arioli F., 2016. The occurrence of pesticides and persistent organic pollutants in Italian organic honeys from different productive areas in relation to potential environmental pollution. Chemosphere, 154, p.p. 482-490.
- Christodoulou D.L., Kanari P., Kourouzidou O., Constantinou M., Hadjiloizou P., Kika K., Constantinou P., 2015. Pesticides residues analysis in honey using ethyl acetate extraction method : validation and pilot survey in real samples. Intern. J. Environ. Anal. Chem., vol. 95, No. 10, p.p. 894-910.
- Codex Alimentarius Commission, 1993. Guidelines on good laboratory practice in pesticide residue analysis, cac/gl 401.

-
- Commission of the European Union, 2006. Quality control procedures for pesticide residues analysis. Document No. SANCO/10232/2006.
- Commission of the European Union, 2009. Method Validation and Quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed. Document No. SANCO/10684/2009.
- Czipa N., Borbély M., Györi Z., 2012. Proline content of different honey types. *Acta Alimentaria*, vol. 41 (1), p.p. 26-32.
- Del Carlo M., Pepe A., Sergi M., Mascini M., Tarentini A., Compagnone D., 2010. Detection of coumaphos in honey using a screening method based on an electrochemical acetylcholinesterase bioassay. *Talanta*, 81, p.p. 76-81.
- Diagne R.G., Foster G.D., 2002. "Comparison of soxhlet and microwave-assisted extractions for the determination of fenitrothion residues in beans." *J. Agric Food Chem.*, 50 (11), p.p. 3204-3207.
- Dong H., Xiao K., Xian Y., Wa Y., 2018. Authenticity determination of honeys with non extractable proteins by means of elemental analyzer (EA) and liquid chromatography (LC) coupled to isotope ratio mass spectrometry (IRMS). *Food Chemistry*, 240, p.p. 717-724.
- Eichhorn P., Pérez S., Barceló D., 2012. Chapter 5 - Time-of-Flight Mass Spectrometry Versus Orbitrap-Based Mass Spectrometry for the Screening and Identification of Drugs and Metabolites: Is There a Winner?. *Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 58, p.p. 217-272.
- El-Kazafy A.T., Saad Al-K., Reda T., 2019. Protein content and amino acids composition of bee-pollens from major floral sources in Al-Ahsa, eastern Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26, p.p. 232-237.

EMA, 1999. Committee for veterinary medicinal products. Amitraz (Bees). Summary report 2. EMA/MRL/572/99-FINAL. Available from: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/057299en.pdf>

EMA, 2001. Committee for veterinary medicinal products. Coumaphos. Summary report 2. EMA/MRL/769/00-FINAL. Available from: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/076900en.pdf>

EMA, 1998. Committee for veterinary medicinal products. Tau-fluvalinate. Revised Summary report 1. EMA/MRL/021-REV1/95. Available from: <http://www.ema.europa.eu/pdfs/vet/mrls/002195r1.pdf>

Erbach G., 2012. "Pesticides legislation in the EU- towards sustainable use of plant protection products". Library Briefing, Library of the European Parliament. <http://www.library.ep.ec>.

Eskilsson C.S., Bjorklund E., 2000. "Analytical-scale microwave-assisted extraction." J. Chromatogr A, 902 (1), p.p. 227-250.

European Commission, 2017. SANTE/11813/2017; Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed.

European Commission, 2009. Directive 2009/128/EC of the European Parliament and the Council of 21 October 2009 establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides. Off J Eur Communities, 309, p.p. 71–86. doi: 10.3000/17252555.L_2009.309.

European Commission, 2008. Commission regulation (EC) No 889/2008 of 5 September 2008 laying down detailed rules for the implementation of council regulation (EC) no 834/2007 on organic production and labelling of organic

products with regard to organic production, labelling and co. Off J Eur Union L, 250, p.p. 1–84.

European Commission, 2002. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off J Eur Communities, L221, p.p. 8–36.

EU, 2006. The impact assessment of the thematic strategy on the sustainable use of pesticides.

EU Commission DG AGRI C4-2012. Κ.Μ.ΠΑΣΕΓΕΣ-Μάιος 2012.

Eurostat Statistic Explained 2016. Pesticide sale statistics. Available at http://ec.europa.eu/eurostat/statisticsexplained/index.php/Pesticide_sales_statistics#Data_sources_and_availability.

Falqui-Cao C., Wang Z., 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), p.p. 5092-5097.

Faucon J.P., Aurieres C., Drajnudel P., Ribière M., Martel A.C., Zeggane S., Chauzat M.P., Aubert M., 2004. Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies. Pest Manage. Sci., 61, p.p. 111-125.

Fernandez M., Picó Y., Manes J., 2002. "Analytical Methods for Pesticide Residue Determination in Bee Products." Journal of Food Protection, 65 (9), p.p. 1503.

Fernandez M., Picó Y., Manes J., 2002. Rapid Screening of Organophosphorus Pesticides in Honey and Bees by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. Chromatographia, 56, p.p. 577-583.

- Font G., Ferrer E., Berrada H., 2011. Multiresidue analysis of pesticides in honey by quenchers and gas chromatography mass spectrometry in tandem. *Toxicology Letters*, 205S, p.p. S60-S179.
- Fontana A.R., Camargo A.B., Altamirano J.C., 2010. Coacervative microextraction ultrasound-assisted back-extraction technique for determination of organophosphates pesticides in honey samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, p.p. 6334-6341.
- Fredes C., Montenegro G., 2006. Heavy metals and other trace elements contents in Chilean honey. *Ciencia e Investigación Agraria*, 33 (1), p.p. 50-58.
- Fries I., Feng F., da Silva A., Slemenda S. B., Pieniazek N. J., 1996. *Nosema cearanae* sp. (Microspora, Nosema-tideae), Morphological and Molecular characterization of a Microsporidian parasite of the Asian honey bee *Apis ceranae* (Hymenoptera, Apoidea), *European J. Protistol*, 32, p.p. 356-365.
- Fries I., De Ruijter A., Paxton R.J., Da Silva A.J., Stemenda S.B., Pieniazek N.J., 2001. Molecular characterization of *Nosema bombi* (Microsporidia: Nosematidae) and a note on its sites of infection in *Bombus terrestris* (Hymenoptera: Apoidea), *Journal of Apicultural Research*, 40 (3-4), p.p. 91-96.
- Fries I., Slemend S.B., da Silva A., Pieniazek N.J., 2003. African honey bees (*Apis mellifera scutellata*) and nosema (*Nosema apis*) infections, *journal of Apicultural Research*, 42, p.p. 13-15.
- Fries I., 2010. *Nosema ceranae* in European honey bees (*Apis mellifera*), *Journal of Invertebrate Pathology*, 103, p.p. S73-S79.
- 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), p.p. 2543-2549.
- Gawel M., Kiljanek T., Niewiadowska A., Semeniuk S., Goliszek M., Burek O., Posyniak A., 2019. Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 282, p.p. 36-47.
- Gómez-Pérez M.L., Plaza-Bolaños P., Romero-González R., Martínez-Vidal J.L., Garrido-Frenich A., 2012. Comprehensive qualitative and quantitative determination of pesticides and veterinary drugs in honey using liquid chromatography-Orbitrap high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1248, p.p. 130-138.
- Gomis D.B., Mangas J.J., Castaño A., Gutiérrez M.D., 1996. Determination of Acaricides in Honey by Liquid Chromatography with Ordinary, Narrow-Bore, and Microbore Columns. *Analytical Chemistry*, 68, p.p. 3867-3870.
- Granja R.H.M.M., Montes Niño A.M., Rabone F., Salerno A.G., 2008. A reliable high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection for the determination of sulfonamides in honey. *Analytica Chimica Acta*, 613, p.p. 116-119.
- Hermosin I., Chicon R.M., Cabezudo M.D., 2003. Free amino acid composition and botanical origin of honey. *Food Chem.*, 83, p.p. 263-268.
- Herrera A., Perez-Arquillue C., Conchello P., Bayarri S., Lazaro R., Yagu C., Arino A., 2005. Determination of pesticides and PCBs in honey by solid-phase extraction cleanup followed by gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pp. 695-701.
- Iglesias M.T., Lorenzo C.D., Polo M.D.C., Martín-Alvarez P.J., Pueyo E., 2004. Usefulness of amino acid composition to discriminate between honeydew and

- floral honeys. Application to honeys from a small geographic area. J. Agric. Food Chem., 52, p.p. 84-89.
- Invernizzi C., Abud C., Tomasco I. H., Harriet J., Ramallo G., Campa J., Katz H., Gardiol G., Mendoza Y., 2009. Presence of *Nosema ceranae* in honeybees in Uruguay, Journal of Invertebrate Pathology, 101, p.p. 150-153.
- Ioannidou M.D., Zachariadis G.A., Anthemidis A.N., Stratis J.A., 2005. Direct determination of toxic trace metals in honey and sugars using inductively coupled plasma atomic emission spectrometry. Talanta, 65, p.p. 92-97.
- Jansson C., 2000. "Multiresidue method for the gas chromatographic determination of pesticides in honey after solid-phase extraction cleanup". J. AOAC Int., 83 (3), p.p. 714-719.
- Jaycox E.R., 1964. Effect on honeybees of nectar from systemic insecticide-treated plants. Journal of Economic Entomology, 57, p.p. 3-8.
- Jimenez J.J., Bernal J.L., Atienza J., 1996. CGC/AED and CGC/ECD/NPD Comparison for the Determination of Acaricides in Honey after Hexane/Acetone Extraction Chromatographia, 42, No. 3/4, February, p.p. 130-134.
- Jimenez J.J., Bernal J.L., del Nozal M.J., Martin M.T., Mayorga A.L., 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), p.p. 269-277.
- Jimenez J.J., Bernal J.L., del Nozal M.J., Toribio L., Martin M.T., 1998. Gas Chromatography with electron capture and nitrogen-phosphorus detection in the analysis of pesticides in honey after elution from a Florisil column. Influence of the honey matrix on the quantitative results. Journal of Chromatography A, 823, p.p. 381-387.

-
- Jimenez J.J., Bernal J.L., Nozal M.J., Novo M., Higes M., Llorente J., 2000. Determination of rotenone residues in raw honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 871, p.p. 67-73.
- Jimenez J.J., Bernal J.L., Nozal M.J., Martin M., 2005. Residues of organic contaminants in beeswax. *Eur. Journal of Lipid Science & technology*, 107, p.p. 896-902.
- Jimenez J.J., Nozal M.J., Bernal J.L., Santos M., Mayorga A.L., 2002. Factors affecting the extraction, hydrolysis and derivatization steps for the quantitation of total residues of amitraz in honey by gas chromatography with electron capture detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 374, p.p. 300-304.
- Johansen C., Mayer D., 1990. Pollinator Protection. *A bee & Pesticide Handbook*. Wicwas Press, p.p. 212.
- Karazafiris E., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasyvoulou A., 2008. New multiresidue method using solid-phase extraction and gas chromatography-micro-electron-capture detection for pesticide residues analysis in royal jelly. *Journal of Chromatography A*, 1209, p.p. 17-21.
- Kasiotis K.M., Anagnostopoulos C., Anastasiadou P., Machera K., 2014. Pesticide residues in honeybees, honey and bee pollen by LC-MS/MS screening: Reported death incidents in honeybees. *Science of the Total Environment*, 485-486, p.p. 633-642.
- Korta E., Bakkali A., Berrueta L.A., Gallo B., Vicente F., 2001. Study of semi-automated solid-phase extraction for the determination of acaricide residues in honey by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 930, p.p. 21-29.

- Krauss M., Singer H., Hollender J., 2010. "LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns". *Anal Bioanal Chem.*, 397, p.p. 943-951.
- Kubik M., Nowacki J., Pidek A., Warakomska Z., Michalczyk L., Goszczynski W., 1999. Pesticide residues in bee products collected from cherry trees protected during blooming period with contact and systemic fungicides. *Apidologie*, 30, p.p. 521-532.
- Kujawski M.W., Namieśnik J., 2011. Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS. *Food Control*, 22, p.p. 914-919.
- Kujawski M.W., Bargańska Z., Marciniak K., Miedzianowska E., Kujawski J.K., Ślebioda M., Namieśnik J., 2014. Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS – Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches. *LWT-Food Science and Technology*, 56, p.p. 517-523.
- Latorre M.J., Pena R., Pita C., Botana A., Garcia S., Herrero C., 1999. Chemometric classification of honeys according to their type. II. Metal content data. *Food Chem.*, 66, p.p. 263-268.
- Lehotay S.J., 2004. Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe (QuEChERS) Approach for Determining Pesticide Residues. 2004 FIFRA Fall Pesticide Analytical Workshop.
- López D.R., Ahumada D.A., Díaz A.C., Guerrero J.A., 2014. Evaluation of pesticides residues in honey from different geographic regions of Colombia. *Food Control*, 37, p.p. 33-40.
- Lozano A., Hernando M.D., Uclés S., Hakme E., Fernández-Alba A.R., 2019. Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products. *Food Chemistry*, 274, p.p. 61-70.

-
- Malhat F.M., Haggag M.N., Loutfy N.M., Osman M.A.M., Tawfic Ahmed M., 2015. Residues of organochloride and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study. *Chemosphere*, 120, p.p. 457-461.
- Martel A.C., Zeggane S., 2002. Determination of acaricides in honey by high-performance liquid chromatography with photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*, 954, p.p. 173-180.
- Maus C., Cure G., Schmuck R., 2003. Safety of imidacloprid seed dressing to honey bees: A comprehensive overview and compilation of the current state of knowledge. *Bull. Insectology*, 56, p.p. 51-57.
- Menkissoglu-Spiroudi U., Diamantidis C.G., Georgiou E.V., Thrasyvoulou T.A., 2000. Determination of Malathion, Coumaphos and Fluvalinate Residues in Honey by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus or Electron Capture Detectors. *Journal of AOAC International*, 83 (1), p.p. 178-182.
- Mitra S., 2003. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- Moschet C., Piazzoli A., Singer H., Hollender J., 2013. "Alleviating the reference standard dilemma using a systematic exact mass suspect screening approach with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry". *Anal. Chem.*, 85, p.p. 10312-10320.
- Naggar Y.A., Cogling G., Vogt A., Naiem E., Mona M., Seif A., Giesy J.P., 2015. Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, p.p. 1-8.

- Naggar Y., Wiseman S., Sun J., Cutler G.C., Aboul-Soud M., Naiem E., Seif A., Giesy J.P., 2015. Effects of environmentally-relevant mixtures of four common organophosphorus insecticides on the honey bee (*Apis mellifera* L.). *Journal of Insect Physiology*, vol. 82, p.p. 85-91.
- Nakajima T., Tsuruoka Y., Kanda M., Hayashi H., Hashimoto T., Matsushima Y., Yoshikawa S., Nagano C., Okutomi Y., Takano I., 2015. Determination and surveillance of nine acaricides and one metabolite in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 32, No. 7, p.p. 1099-1104.
- Nannou C.I., Boti V.I., Albanis T.A., 2018. Trace analysis of pesticide residues in sediments using liquid chromatography–high-resolution Orbitrap mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.*, 410, p.p. 1977–1989. doi: 10.1007/s00216-018-0864-6.
- Notardonato I., Avino P., Cinelli G., Russo M.V., 2016. Rapid and reliable method for analyzing acaricides in honey-based products. *Food Anal. Methods*, 9, p.p. 1675-1685.
- Nozal M.J., Bernal J.L., Diego J.C., Gomez L.A., Ruiz J.M., Higes M., 2000. Determination of oxalate, sulfate and nitrate in honey and honeydew by ion-chromatography. *J. Chromatogr. A*, 881, p.p. 629-638.
- Ohba Y., Nakajima T., Kanda M., Hayashi H., Matsushima Y., Nakagawa Y., Koike H., Nagano C., Sekimura K., Otsuka K., Sasamoto T., Hashimoto T., 2018. Simultaneous determination of nine acaricides and two metabolites in comb honey by LC/MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, vol. 35, No. 12, p.p. 2375-2386.
- Orso D., Martins M.L., Donato F.F., Rizzetti T.M., Kemmerich M., Adaime M.B., Zanella R., 2014. Multiresidue determination of pesticide residues in honey by

- modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection. J. Braz. Chem. Soc., vol. 25, No. 8, p.p. 1355-1364.
- Otten C., 1991. "Entwicklung der bosartigen Faulbrut in der Bundesrepublik", Dtsch. Imker J., 2(2), p.p. 55-56.
- Panseri S., Catalano A., Giorgi A., Arioli F., Procopio A., Britti D., Chiesa L.M., 2014. Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources. Food Control, 38, p.p. 150-156.
- Paoloni A., Alunni S., Pelliccia A., Pecorelli I., 2016. Rapid determination of residues of pesticides in honey by μ GC-ECD and GC-MS/MS: Method validation and estimation of measurement uncertainty according to document No. SANCO/12571/2013. Journal of Environmental Science and Health Part B, vol. 51, No. 3, p.p. 133-142.
- Papaefthimiou C., Papachristoforou A., Theophilidis G., 2013. Biphasic responses of the honeybee heart to nanomolar concentrations of amitraz. Pesticide Biochemistry and Physiology, 107, p.p. 132-137.
- Paradis D., Bérail G., Bonmatin J.M., Belzunces L.P., 2014. Sensitive analytical methods for 22 relevant insecticides of 3 chemical families in honey by GC-MS/MS and LC-MS/MS. Anal Bioanal Chem., 406, p.p. 621-633.
- Pawliszyn J., Arthur C.L., 1990. "Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers.". Anal. Chem., 62 (19), p.p. 2145-2148.
- Paxton R.J., 2010. Does infection by *Nosema ceranae* cause "Colony Collapse Disorder" in honey bees?, Journal of Apicultural Research, 49 (1), p.p. 80-84.
- Piro R., Mutinelli F., 2003. The European Legislation for honey residue control. Apiacta, 38, p.p. 15-20.

- Prados-Rosales R.C., Luque Garcia J.L., 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), p.p. 121-129.
- Radakovic M., Stevanovic J., Djelic N., Lakic N., Knezevic-Vukcevic J., VukovicGacic B., Stanimirovic Z., 2013. Evaluation of the DNA damaging effects of amitraz on human lymphocytes in the Comet assay. *J. Biosci.*, 38 (1).
- Rafique N., Nazir S., Akram S., Ahad K., Gohar A., Abbasi S.T., Ahmed I., Rafique K., 2018. Screening of multiclass pesticide residues in honey by SPE-GC/MSD: a pilot study. *Environ Monit Assess*, 190, p.p. 666.
- RASFF, 2003. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report on the functioning of the RASFF 2003. Available from: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2003_en.pdf.
- RASFF, 2004. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report on the functioning of the RASFF 2004. Available from: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2004_en.pdf.
- RASFF, 2005. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report on the functioning of the RASFF 2005. Available from: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2005_en.pdf.
- RASFF, 2006. Rapid Alert System for Food and Feed (RASFF). Annual report on the functioning of the RASFF 2006. Available from: http://ec.europa.eu/food/food/rapidalert/report2006_en.pdf.
- Reybroeck W., 2010. Screening for residue of antibiotics and chemotherapeutics in milk and honey, Sigrid Ooghe, Laboratory of Chemical Analysis, chapter 1: 31–32, p.p. 295.

-
- Rezic I., Horvat A.J.M., Babic S., Kastelan-Macan M., 2005. Determination of pesticides in honey by ultrasonic solvent extraction and thin-layer chromatography. *Ultrasonics Sonochemistry*, 12, p.p. 477-481.
- Rial-Otero R., Gaspar E.M., Moura I., Capelo J.L., 2007. Gas chromatography mass spectrometry determination of acaricides from honey after a new fast ultrasonic-based solid phase micro-extraction sample treatment. *Talanta*, 71, p.p. 1906-1914.
- Rial-Otero R., Gaspar E.M., Moura I., Capelo J.L., 2007. Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*, 71, p.p. 503-514.
- Rissato S.R., Galhiane M.S., Knoll F.R.N., Apon B.M., 2004. Supercritical fluid extraction for pesticide multiresidue analysis in honey: determination by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometry detection. *Journal of Chromatography A*, 1048, p.p. 153-159.
- Rissato S.R., Galhiane M.S., Knoll F.R.N., Apon B.M., 2004. *J. Chromatogr. A*, 1048 (153).
- Rogers R.E.L., Kemp J.R., 2003. Imidacloprid, potatoes and honey bees in Atlantic Canada: Is there a connection? *Bull. Insectology*, 56, p.p. 83-88.
- Ruoff K., Karoui R., Dufour E., Luginbuhl W., Bosset J-O., Bogdanov S., Amado R., 2005. Authentication of the Botanical Origin of Honey by Front-Face Fluorescence Spectroscopy. A Preliminary Study. *J. Agric. Food Chem.*, 53, p.p. 1343-1347.
- Saitta M., Di Bella G., Fede M.R., Lo Turco V., Potortì A.G., Rando R., Russo M.R., Dugo G., 2017. Gas chromatography-tandem mass spectrometry multi-residual

- analysis of contaminants in Italian honey samples. Food Additives & Contaminants: Part A, vol. 34, No. 5, p.p. 800-808.
- Sajid M., Na N., Safdar M., Lu X., Ma L., He L., Ouyang J., 2013. Rapid trace level determination sulfonamide residues in honey with online extraction using short C-18 column by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography A, 1314, p.p. 173-179.
- Sanford T.M., 1993. Protecting honey bees from pesticides. Circular 534, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. Publication date: April 25. Available from: <http://edis.ifas.ufl.edu/pdf/AA/AA14500.pdf>.
- Schöning R., Schmuck R., 2003. Analytical determination of imidacloprid and metabolite residues by LC-MS/MS. Bull. Insectology, 56, pp. 41-50.
- Schmuck R., Schoning R., Stork A., Schramel O., 2001. Risk posed to honeybees (*Apis mellifera* L. Hymenoptera) by an imidacloprid seed dressing of sunflowers. Pest Manage. Sci., 57, p.p. 225-238.
- Schymanski E.L., Jeon J., Gulde R., Fenner K., Ruff M., Singer H.P., Hollender J., 2014. Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence. Environ Sci Technol., 48, p.p. 2097-2098.
- Shalpa U.M., Solayman Md., Alam N., Khalil M.I., Gan S.H., 2018. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) levels in honey and other food products: effects on bees and human health. Chemistry Central Journal, 12, p.p. 35.
- Shendy A.H., Al-Ghobashy M.A., Mohammed M.N., Gad Alla S. A., Lotfy H.M., 2016. Simultaneous determination of 200 pesticide residues in honey using gas chromatography-tandem mass spectrometry in conjunction with streamlined quantification approach. Journal of Chromatography A, 1427, p.p. 142-160.

-
- Slamovits C.H., Williams B.A.P., Keeling P.J., 2004. Transfer of *Nosema locustae* (Microsporidia) to *Antonospora locustae* n. Comb. Based on molecular and ultrastructutive data, *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, p.p. 207-213.
- Souza Tette P.A., Aurélio da Silva O.F., Corrêa Pereira E.N., Silva G., Beatriz de Abreu Glória M., Fernandes C., 2016. Multiclass method for pesticides quantification in honey by means of modified QuEChERS and UHPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, 211, p.p. 130-139.
- Stadler T., Martinez Ginés D., Buteler M., 2003. Long-term toxicity assessment of imidacloprid to evaluate side effects on honey bees exposed to treated sunflower in Argentina. *Bull. Insectology*, 56, p.p. 77-81.
- Steeg E., Montag A., 1987. Aromatic carbonic acids of honey. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 184, p.p. 17-19.
- Steeg E., Montag A., 1988. Quantitative determination of aromatic carbonic acid in honey. *Z. Lebensm. Unters Forsch.*, 187, p.p. 115-120.
- Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants, (Assessed 2011), URL: <http://chm.pops.int>.
- Taccheo M.B., Paoli M.D., Spessotto C., 1988. Determination of total amitraz residue in honey by Electron Capture Capillary Gas Chromatography–A simplified method. *Pesticide Science*, 23, p.p. 59-64.
- Terrab A., Hernanz D., Heredia F.J., 2004a. Inductively coupled plasma optical emission spectrometric determination of minerals in thyme honeys and their contribution to geographical discrimination. *J. Agric. Food Chem.*, 52(11), p.p. 3441-3445.

Their H.P., Zeumer H., 1987. Manual of Pesticide Residue Analysis. Pesticides Commission, DFG, VCH Publisher: Weinheim Germany, vol. 1, p.p. 37-44.

Thermo Fisher Scientific, 2010. TSQ Series Hardware Manual, Revision D.

Tomasini D., Sampaio M.R.F., Caldas S.S., Buffon J.G., Duarte F.A., Primel E.G., 2012. Simultaneous determination of pesticides and 5-hydroxymethylfurfural in honey by the modified QuEChERS method and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Talanta*, 99, p.p. 380-386.

Tomlin C.D.S., 1997. The pesticide manual, 11th Edition, British Council Crop Protection.

Truzzi C., Annibaldi A., Illuminati S., Finale C., Scarponi G., 2014. Determination of proline in honey: Comparison between official methods, optimization and validation of the analytical methodology. *Food Chemistry*, 150, p.p. 477-481.

Tsiropoulos N.G., Amvrazi E.G., 2011. Determination of pesticide residues in honey by single-drop microextraction and gas chromatography. *Journal of AOAC International*, 94, p.p. 634-644.

Tsigouri A.D., Menkissoglu-Spiroudi U., Thrasyvoulou A., 2001. Study of tau-fluvalinate persistence in honey. *Pest Management Science*, 57, p.p. 467-471.

Tsipi D., Triantafyllou M., 1999. Determination of organochlorine pesticide residues in honey, applying solid phase extraction with RP-C18 material. *Analyst*, 124 (4), p.p. 473-475.

Valverde S., Ibáñez M., Bernal J.L., Nozal M.J., Hernández F., 2018. Development and validation of ultra liquid high performance-liquid chromatography-tandem mass spectrometry based methods for the determination of neonicotinoid insecticides in honey. *Food Chemistry*, 266, p.p. 215-222.

- Vetter W., Weichbrodt M., 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), p.p. 2439-2449.
- Volante M., Galarini R., Miano V., Cattaneo M., Pecorelli I., Bianchi M., Marinono M.T., Cossignani L., Damiani P., 2001. A SPME-GC-MS approach for antivarroa and pesticide residues in food. *Journal of Chromatography A*, 829, p.p. 269-277.
- Volante M., Galarini R., Miano V., Cattaneo M., Pecorelli I., Bianchi M., Marinono M.T., Cossignani L., Damiani P., 2001. A SPME-GC-MS approach for antivarroa and pesticide residues analysis in honey. *Chromatographia*, 54, p.p. 241-246.
- Von der Ohe W., 2003. Control of American Foulbrood by using alternatively eradication method and artificial swarms, *Apiacta*, 38, p.p. 137-139.
- Von Eyken A., Furlong D., Arooni S., Butterworth F., Roy J.-F., Zweigenbaum J., Bayen S., 2019. Direct injection high performance liquid chromatography coupled to data independent acquisition mass spectrometry for the screening of antibiotics in honey. *Journal of food and drug analysis*, 27, p.p. 679-691.
- Waliszewski S.M., Pardio V.T., Waliszewski K.N., Ochoa A., Infanzon R.M., 1998. A rapid and low cost monitoring method for τ -Fluvalinate determination in honey. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 77 (2), p.p. 149-152.
- Wennrich L., Popp P., 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), p.p. 1194-1201.

- Wiest L., Buleté A., Giroud B., Fratta C., Amic S., Lambert O., Pouliquen H., Arnaudguilhem C., 2011. Multi-residue analysis of 80 environmental contaminants in honeys, honeybees and pollens by one extraction procedure followed by liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A*, 1218, p.p. 5743-5756.
- Wilkowska A., Marek Biziuk M., 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125, p.p. 803-812.
- Xu J.-Z., Miao J.-J., Lin H., Ding T., Zhao Z.-Y., Wu B., Shen C.-Y., Jiang Y., 2009. Determination of amitraz and 2,4-dimethylaniline residues in honey by using LC with UV detection and MS/MS. *J. Sep. Sci.*, 32, p.p. 4020-4024.
- Yu J., Wu C., Xing J., 2004. Development of new solid-phase microextraction fibers by sol-gel technology for the determination of organophosphorus pesticide multiresidues in food. *Journal of Chromatography A*, 1036, p.p. 101-111.
- 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), p.p. 161-168.
- Zhang Y., Xiu Qin Li, Hong Mei Li, Qing He Zhang, Yan Gao, Xian Jiang Li, 2019. Antibiotic residues in honey: A review on analytical methods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, vol. 110, p.p. 344-356.
- Zhang W., Jiang F., Feng Ou J., 2011. Global pesticide consumption and pollution: with China as a focus. *Proc. Intern. Acad. Ecol. Environ. Sci.*, 1 (2), p.p. 125-144.
- Zheng W., Park J.-A., Abd El-Aty A.M., Kim S.-K., Cho S.-H., Choi J.-M., Yi H., Cho S.-M., Ramadan A., Jeong J.H., Shim J.-H., Shin H.-C., 2018. Development and validation of modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS for

simultaneous determination of cymiazole, fipronil, coumaphos, fluvalinate, amitraz, and its metabolite in various types of honey and royal jelly. *Journal of Chromatography B*, 1072, p.p. 60-69.

Zhihong S., Xinye L., Hongyu M., Weiyue P., Yamei S., Yifan H., Meiting L., Zhang H., 2019. Determination of seven phenolic acids in honey by counter flow salting-out homogeneous liquid-liquid extraction coupled with ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Royal Society of Chemistry, Anal. Methods*, 11, p.p. 4044-4051.

Αλυσσανδράκης Ε., 2007. Διαφοροποίηση αμιγών ελληνικών μελιών πορτοκαλιάς, θυμαριού και βαμβாகιού με βάση τα πτητικά συστατικά τους. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Εργαστήριο Σηροτροφίας και Μελισσοκομίας.

Απόφαση 313049 (Φ.Ε.Κ.Β' 16/ 14-1-1994) για μέλι Ελάτης Μαινάλου-Βανίλια, και Υπουργικές αποφάσεις και εγκρίσεις (12) για προϊόντα Π.Ο.Π..

Γούναρη Σ., 2004. Ωφελιμότητα των προϊόντων της μέλισσας στον άνθρωπο. Πρακτικά 2^{ου} Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα, σελ: 29-36.

Ζιώγας Β. και Μαρκόγλου Α., 2010. «Γεωργική Φαρμακολογία». Εκδόσεις Σταμούλη.

Θρασυβούλου Α., Μανίκης Ι., Τανανάκη Χ., Τσέλλιος Δ., Καραμπουρνιώτη Σ. και Δήμου Μ., 2002. Η ταυτότητα του ελληνικού μελιού. Α, Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά που στηρίζουν την ποιότητα του προϊόντος. Πρακτικά 1^{ου} Επιστημονικού Συνεδρίου Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας, Αθήνα, σελ: 232-253.

Θρασυβούλου Α., 1997. Πρακτική μελισσοκομία. Εκδόσεις Μελισσοκομική Επιθεώρηση. Ν. Παππάς, Θεσσαλονίκη, σελ: 255.

Θρασυβούλου Α., Τσιγουρή Α., Πασαλόγλου Μ., Τυρπένου Α., Δόβα Χ., Καρατζόγλου Μ., 1992. Επιβάρυνση μελιού με κατάλοιπα εντομοκτόνων. Πρακτικά Ημερίδας Μελισσοκομίας II. Το μέλι-Δυνατότητες πληρέστερης εκμετάλλευσης της μέλισσας. Διοργάνωση ΓΕΩΤΕΕ, σελ: 193-234.

Θρασυβούλου Α., Υφαντίδης Μ., Παππάς Ν., Σιμμον Κ., 1985. Έλεγχος υπολειμμάτων μαλαθείου στα ελληνικά μέλια. Β' Πανελλήνιο Συνέδριο Μελισσοκομίας-Σηροτροφίας.

Θρασυβούλου Α., «Είναι η νοσεμίαση η ασθένεια που θα αφανίσει τα μελίσσια μας;». ([www.beelab.agro.auth.gr/DataFiles/Arthra/Exthroi&Asthenies/Nosema_Tha afaisei ta melissia mas.pdf](http://www.beelab.agro.auth.gr/DataFiles/Arthra/Exthroi&Asthenies/Nosema_Tha%20afaisei%20ta%20melissia%20mas.pdf)).

Θρασυβούλου Α., 1998. Πρακτική Μελισσοκομία, *Μελισσοκομική Επιθεώρηση*, (7): 108-126, σελ: 255.

Θρασυβούλου Α., 2009. Πρακτική Μελισσοκομία. Θεσσαλονίκη.

Θωμαΐδης Ν.Σ., www.chem.uoa.gr, EURACHEM 2000, (on-line document): Εκτίμηση Αβεβαιότητας στην Ενόργανη Ανάλυση, (20/5/2012).

Θωμαΐδης Ν.Σ., Εργ. Αναλυτικής Χημείας, ΕΚΠΑ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.

Κακλαμάνος Γ., 2009. «Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ορμονών με αυξητική δράση σε βιολογικά δείγματα με υγρή χρωματογραφία-φασματοφωτομετρία μαζών». Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) αριθ. 37/2010 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 22ας Δεκεμβρίου 2009 σχετικά με φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες και την ταξινόμησή τους όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:015:0001:0072:EL:PDF>.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90 του Συμβουλίου της 26ης Ιουνίου 1990 για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990R2377:EL:HTML>.

ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΟΚ) αριθ. 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου του Συμβουλίου της 23ης Φεβρουαρίου 2005 για τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα ή πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης και για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:070:0001:0016:EL:PDF>.

Κουϊμτζή Θ., Φυτιάνου Κ., Σαμαρά-Κωνσταντίνου Κ., 1998. «Χημεία Περιβάλλοντος». Εκδόσεις University studio Press, σελ: 264.

Κωστάκης Μ., Θωμαΐδης Ν., Κουμπάρης Μ., 2012. www.chem.uoa.gr. (on-line document): Εκτίμηση Αβεβαιότητας στις Χημικές Μετρήσεις.

Μαυρομανωλάκης Κ., 2007. «Διάσπαση φυτοφαρμάκων στο έδαφος». Πτυχιακή εργασία, σελ: 10-12.

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

Οδηγία 2014/63/ΕΕ του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου, της 15^{ης} Μαΐου 2014, για την τροποποίηση της οδηγίας 2001/110/ΕΚ του Συμβουλίου για το μέλι.

Οδηγία 2002/657/ΕΚ: Απόφαση της Επιτροπής, της 12^{ης} Αυγούστου 2002, για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

Οδηγία 2002/63/ΕΚ της Επιτροπής, της 11^{ης} Ιουλίου 2002, για την καθιέρωση κοινοτικών μεθόδων δειγματοληψίας για τον επίσημο έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων μέσα και πάνω σε προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης και την κατάργηση της οδηγίας 79/700/ΕΟΚ. Available from: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ?LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:187:0030:0043:EL:PDF>.

Οδηγία 2001/110/ΕΚ, του Συμβουλίου, της 20ής Δεκεμβρίου 2001, για το μέλι.

Παπαδοπούλου-Μουρκίδου Ε., 2008. «Γεωργικά φάρμακα, χημεία, φαρμακολογία (φαρμακοκινητική, μεταβολισμός, τρόπος δράσης), τοξικολογία, οικοτοξικολογία και συμπεριφορά και τύχη στο περιβάλλον». Εκδόσεις Μέθεξις.

Τανανάκη Χ.Ι., 2006. «Μελέτη παραγόντων που επηρεάζουν τα πτητικά συστατικά των μελιών που προέρχονται από μελίτωμα». Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ). Σχολή Γεωπονική.

Υφαντίδης Μ., 1995. Παθήσεις του Μελισσιού, Αρισταίος, 43-53, σελ: 291.

Φρίντριχ Ούβε, 1990. Οι κίνδυνοι από τα φυτοφάρμακα και οι δυνατές εναλλακτικές λύσεις 86-93. Στα φυτοφάρμακα, προβλήματα και εναλλακτικές λύσεις. Γενική Γραμματεία Νέας Γενιάς. Δίκτυο δράσης για τα φυτοφάρμακα. σελ: 299.

t-meli.blogspot.com/2010/.../blog-post_8722.html

slideplayer.gr/slide/11185278/. Ενημέρωση Μελισσοκόμων, 2012. Πανελλήνια Συνομοσπονδία Ενώσεων αγροτικών Συνεταιρισμών.

http://www.waters.com/waters/nav.html?locale=fr_CH&cid=10146521

<http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>

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

http://www.jasco.hu/konyvtar/TN111_Matrix_solid_phase_dispersion_MSPD.pdf

www.beekeeping.com

<http://www.cfsan.fda.gov> 2003

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι
ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΣΤΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Δείγματα μελιού

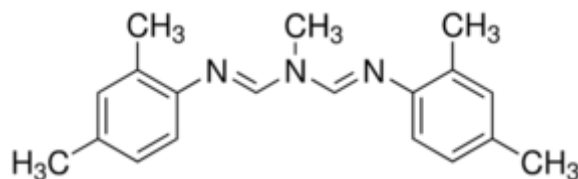
No/ Κωδικός	Άλλα στοιχεία	Προμηθευτές	Περιοχή προέλευσης	Ημερομηνία δειγματοληψίας
1.	Θυμαρίσιο	Super Market	AB κοντά στην ελληνική γη	2-Φεβρ-2016
2.	Μέλι ελάτης	Super Market	AB κοντά στην ελληνική γη μέλι ελάτης Παρνασσού	2-Φεβρ-2016
3.	Θυμαρίσιο	Super Market	Αττική Πιπτάς Α.Ε.Β.Ε. (Κρυονέρι-Αττικής)	2-Φεβρ-2016
4.	Μέλι Ανθέων	Super Market	AB Βασιλόπουλος 365 Χώρα συγκομιδής : Βουλγαρία	2-Φεβρ-2016
5.	Θυμαρίσιο	Super Market	Συνεργασία : Κρητικό μέλι (Σούδα Χανίων)	2-Φεβρ-2016
6.	Θυμαρίσιο	Super Market	AB κοντά στην ελληνική γη μέλι από τη Μάνη	2-Φεβρ-2016
7.	Μέλι από άνθη, κωνοφόρα και θυμάρι	Super Market	AB κοντά στην ελληνική γη	2-Φεβρ-2016
8.	Μέλι από άνθη πορτοκαλιάς	Super Market	AB Βασιλόπουλος Ελληνικό προϊόν	2-Φεβρ-2016
9.	Θυμαρίσιο	Super Market	Μέλι Μάνης	2-Φεβρ-2016
10.	Θυμαρίσιο	Super Market	AB κοντά στην ελληνική γη μέλι από την Κρήτη	2-Φεβρ-2016
11.	Μέλι από άνθη, κωνοφόρα και θυμάρι	Super Market	Γλυκάνθη-Μελίντα Ε.Π.Ε. (Μέλι Κρήτης)	7-Φεβρ-2017

12.	Μέλι από αγριολούλουδα και κωνοφόρα δέντρα	Super Market	Ανθέλια-Μελίντα Ε.Π.Ε. Χώρα συγκομιδής : Ελλάδα-Βουλγαρία	16-Μαρτ-2017
13.	Μέλι Ανθέων	Super Market	Μέλι Άνθια Χώρα συγκομιδής : Ουκρανία-Ελλάδα	8-Φεβρ-2017
14.	Μέλι Ανθέων	Super Market	Flora-Μελίντα Ε.Π.Ε. Χώρα συγκομιδής : Βουλγαρία	23-Μαιου-2017
15.	Μέλι από διάφορα άνθη και άνθη εσπεριδοειδών	Super Market	Μέλι ανθέων economy flower honey Χώρα συγκομιδής : Ελλάδα, Βουλγαρία, Ισπανία, Αργεντινή, Κίνα, Μεξικό, Βραζιλία.	14-Δεκ-2017
16.	Μέλι Ανθέων	Super Market	Products of first class-Μελίντα Ε.Π.Ε. Χώρα συγκομιδής : Βουλγαρία	20-Σεπτ-2017
17.	Μέλι Ανθέων	Super Market	Μέλι Ανθέων Ελληνικό προϊόν	5-Οκτ-2017
18.	Μέλι Ανθέων	Super Market	Bella Bee	12-Οκτ-2017
19.	Μέλι από αγριολούλουδα και κωνοφόρα δέντρα	Super Market	ΑΒ Βασιλόπουλος Ελληνικό προϊόν	2-Φεβρ-2016
20.	Μέλι από πεύκο	Τοπικός παραγωγός	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	24-Ιαν-2019
21.	Μέλι από άνθη και άνθη φασκόμηλου	Τοπικός παραγωγός	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	24-Ιαν-2019
22.	Μέλι από έλατο και βότανα	Τοπικός παραγωγός	ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	28-Φεβρ-2019

23.	Μέλι Ανθέων	Τοπικός παραγωγός	Χανιά	19-Νοεμβρ- 2019
24.	Μέλι Ανθέων	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
25.	Μέλι Ανθέων	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
26.	Μέλι Ανθέων	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
27.	Θυμαρίσιο	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
28.	Θυμαρίσιο	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
29.	Μέλι από πεύκο	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
30.	Μέλι Ανθέων	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
31.	Μέλι Ανθέων	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
32.	Μέλι Ανθέων	Τοπικός παραγωγός	Ν. Ιωαννίνων, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
33.	Μέλι από άνθη πορτοκαλιάς	Τοπικός παραγωγός	Κεραμάτες, Ν. Άρτας, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
34.	Μέλι από άνθη πορτοκαλιάς	Τοπικός παραγωγός	Καλεντίνη, Ν. Άρτας, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
35.	Μέλι από άνθη πορτοκαλιάς	Τοπικός παραγωγός	Αγ. Σπυρίδων, Ν. Άρτας, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019
36.	Μέλι από άνθη πορτοκαλιάς	Τοπικός παραγωγός	Γέφυρα Πουρναρίου, Ν. Άρτας, Ήπειρος	19-Νοεμβρ- 2019

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II
ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΑΙ ΤΟΞΙΚΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΠΟΥ
ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Amitraz



Κοινή ονομασία : amitraz (BSI, ISO - E, ANSI, BPC, JMAF, ESA)

Χημικές ονομασίες :

N,N'-[[(methylimino)dimethyldiylidene]di-2,4-xylylidene] (IUPAC)

N'-(2,4-dimethylphenyl)-*N*-[[[(2,4-dimethylphenyl)imino]methyl]-*N*-Methylmethaniminamide (CA)

N,N-bis(2,4-xylyliminomethyl)methylamine

N-methyl-*N'*-2,4-xylyl-*N*-(*N*-2,4-xylylformimidoyl)formamidine

1,5-bis(2,4-dimethylphenyl)-3-methyl-1,3,5-triazapenta-1,4-diene

Άλλες ονομασίες : amitraz (ISO-F)

Χημική Κατηγορία : Φορμαμιδίνη

Μοριακός Τύπος : C₁₉H₂₃N₃

Μοριακό Βάρος : 293.41

Φυσική Μορφή : Στερεοί αχρόχρωμοι κρύσταλλοι.

Σημείο Τήξεως : 86-87°C.

Τάση Ατμών : 2.0x10⁻⁶ mmHg στους 25°C.

Henry's Law Constant : 9.87x10⁻⁶ atm m³/mol στους 25°C.

Log Kow : 5.5

Σταθερότητα : Ασταθές σε όξινα μέσα (pH<7). Παρατεταμένη αποθήκευση υπό υγρές συνθήκες, αποσυντίθεται αργά.

Διαβρωτικότητα : Μη διαβρωτικό.

Διαλυτότητα : Στο νερό 1 mg L⁻¹ σε θερμοκρασία δωματίου. Διαλυτό στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Στα ακετόνη και τολουόλιο, >300 g L⁻¹.

Τοξικότητα :

Οργανισμός	Δοκιμή	Χορήγηση	Δόση
Αρουραίος	LD50	Στοματική	800 mg Kg ⁻¹

Ποντίκι	LD50	Στοματική	>1600 mg Kg ⁻¹
Κουνέλι	LD50	Δερματική	>200 mg Kg ⁻¹
Οργανισμός	Δοκιμή	Χορήγηση	Δόση
Αρουραίος	LD50	Δερματική	>1600 mg Kg ⁻¹
Πάπια	LC50	Στοματική	7000 mg Kg ⁻¹
Ορτύκι	LC50	Στοματική	1800 mg Kg ⁻¹
Μέλισσα	LD50	Στοματική	12 μg/μέλισσα
Μέλισσα	LD50	Δερματική	3.6 mg L ⁻¹

Φαρμακευτικά σκευάσματα εγκεκριμένα στην Ελλάδα : Δεν υπάρχουν.

Φαρμακευτικά σκευάσματα μη εγκεκριμένα στην Ελλάδα : Apivar¹, Apiwarol², Biowar², Varataz³, Varachet forte³, Varietol fum⁴, Varidol AEP⁴.

Τρόποι χρήσης στη μελισσοκομία : Αν και δεν είναι εγκεκριμένο για μελισσοκομική χρήση στην Ελλάδα, χρησιμοποιείται από τους παραγωγούς. Το κυριότερο σκεύασμα της συγκεκριμένης δραστικής ουσίας, το Tactic, χρησιμοποιείται στην κτηνοτροφία και ιδιαίτερα στα άλογα και τα πρόβατα. Η εφαρμογή του στην μελισσοκομία γίνεται με υποκαπνιστικές ταινίες, ψεκασμό (spray) και αερολύματα (aerosol).

MRL στο μέλι : Η Ε.Ε. θέσπισε Ανώτατο Επιτρεπτό Όριο Υπολειμμάτων του amitraz στα 0.2 mg Kg⁻¹ και αποτελεί το όριο για το μέλι που διακινείται στην Ελλάδα και περιλαμβάνει το μητρικό μόριο και τους μεταβολίτες που περιέχουν την 2,4-dimethylaniline.

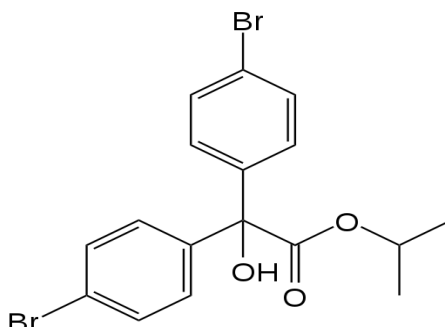
¹ Εγκεκριμένο σκεύασμα στη Γαλλία, την Ιταλία, την Πορτογαλία και την Ισπανία.

² Εγκεκριμένα σκευάσματα στην Πολωνία.

³ Εγκεκριμένα σκευάσματα στη Ρουμανία. Το Varachet forte εκτός από αμιτράζη περιέχει και tau-fluvalinate.

⁴ Εγκεκριμένα σκευάσματα στη Σλοβακία.

Bromopropylate



Κοινή ονομασία : bromopropylate (BSI, ISO, ANSI, ESA)

Χημικές ονομασίες :

isopropyl 4,4'-dibromobenzilate (IUPAC)

1-methylethyl-4-bromo- α -(4-bromophenyl)- α -hydroxybenzeneacetate (CA)

Άλλες ονομασίες : phenisobromolate (JMAF)

Χημική Κατηγορία : Οργανοαλογονωμένο και ειδικότερα ανήκει στα παράγωγα του βενζολίου

Μοριακός Τύπος : $C_{17}H_{16}Br_2O_3$

Μοριακό Βάρος : 428.115

Φυσική Μορφή : Άχρωμοι κρύσταλλοι

Σημείο Τήξεως : 77°C

Τάση Ατμών : 8.2×10^{-8} mmHg στους 20°C.

Henry's Law Constant : 4.6×10^{-7} atm m³/mol στους 25°C.

Ειδικό Βάρος : 1.49 στους 20°C.

Log Kow : 5.4

Σταθερότητα : Σταθερό σε ουδέτερα ή ελαφρώς όξινα μέσα.

Διαβρωτικότητα : Μη διαβρωτικό

Διαλυτότητα : Στο νερό, <5 mg L⁻¹ στους 20°C, στην ακετόνη 850 g Kg⁻¹ στους 20°C, στο διχλωρομεθάνιο 970 g Kg⁻¹ στους 20°C, στη διοξάνη 870 g Kg⁻¹ στους 20°C, στο βενζόλιο 750 g Kg⁻¹ στους 20°C, στην μεθανόλη 280 g Kg⁻¹ στους 20°C, στο ξυλένιο 730 g Kg⁻¹ στους 20°C, στην ισοπροπανόλη 90 g Kg⁻¹ στους 20°C.

Τοξικότητα :

Οργανισμός	Δοκιμή	Χορήγηση	Δόση
Αρουραίος	LD50	Στοματική	>5000 mg Kg ⁻¹

Αρουραίος	LD50	Δερματική	>40000 mg Kg ⁻¹
Κουνέλι	LD50	Δερματική	Ήπια ερεθιστικό
Κουνέλι	LD50	Οφθαλμικής επαφής	Μη ερεθιστικό
Οργανισμός	Δοκιμή	Χορήγηση	Δόση
Ορτύκια	LC50	Στοματική	>2000 mg Kg ⁻¹
Πάπια	LD50	Στοματική	600 mg Kg ⁻¹
Μέλισσα	LD50	Στοματική, Δερματική	Μη τοξικό

Φαρμακευτικά σκευάσματα εγκεκριμένα στην Ελλάδα : Δεν υπάρχουν.

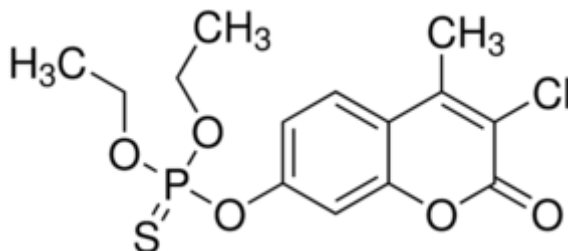
Φαρμακευτικά σκευάσματα μη εγκεκριμένα στην Ελλάδα : Folbex VA (Giba-Geigy)⁵.

Τρόποι χρήσης στη μελισσοκομία : Η χρήση του συγκεκριμένου σκευάσματος γίνεται με τη μορφή υποκαπνιστικών ταινιών.

MRL στο μέλι : Εξαιτίας της μη έγκρισης, δε θεωρήθηκε αναγκαίος ο καθορισμός MRL από την Ε.Ε., αν και μερικές χώρες όρισαν εθνικά MRL. Σε ορισμένες περιπτώσεις εντοπίστηκαν δείγματα μελιού με συγκέντρωση υπολειμμάτων που υπερέβη τα Εθνικά MRL. Η δραστική ουσία bromopropylate χρησιμοποιήθηκε σε καλλιέργειες όπως τα μηλοειδή, τα πυρηνόκαρπα και τα σολανώδη. Η γεωργική χρήση του οδήγησε σε θέσπιση δεύτερου MRL με βάση τις διατάξεις του Κανονισμού 396/2005 της Ε.Ε.. Το δεύτερο MRL αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 0.1 mg Kg⁻¹ και αφορά στην επιβάρυνση των προϊόντων κυψέλης εξαιτίας της χρήσης γεωργικών φυτοπροστατευτικών ουσιών.

⁵ Εγκεκριμένα σκευάσματα στην Ελβετία.

Coumaphos



Κοινή ονομασία : coumaphos

Χημικές ονομασίες :

O,O-Diethyl *O*-3-chloro-4-methyl-2-oxo-2*H*-chromen-7-yl phosphorothioate (IUPAC)

Άλλες ονομασίες : 3-Chloro-7-diethoxyphosphinothioyloxy-4-methyl-2-chromenone, coumafes, meldane, asunthol, azunthol, muscatox, agridip, asuntol, meldone, resitox, baymix

Χημική Κατηγορία : Οργανοφωσφορικό

Μοριακός Τύπος : C₁₄H₁₆ClO₅PS

Μοριακό Βάρος : 362.77

Φυσική Μορφή : Άχρωμοι κρύσταλλοι με ελαφριά οσμή θειαφίου

Σημείο Τήξεως : 90-92°C (τεχνική).

Τάση Ατμών : 10⁻⁷ mm Hg στους 20°C.

Henry's Law Constant : 3.1x10⁻⁸ atm m³/mol στους 25°C.

Ειδικό Βάρος : 1.474

Log K_{ow} : 4.13

Σταθερότητα : Υδρολύεται αργά σε αλκαλικά μέσα. Σταθερό σε κανονικές συνθήκες αποθήκευσης και χρήσης. Ασταθές με πιπερονυλοβουτοξείδιο.

Διαλυτότητα : Στο νερό, 1.5 mg L⁻¹ στους 20°C. Ελάχιστα διαλυτό σε οργανικούς διαλύτες.

Τοξικότητα :

Οργανισμός	Δοκιμή	Χορήγηση	Δόση
Αρουραίος	LD50	Στοματική	13-41 mg Kg ⁻¹
Ποντίκι	LD50	Στοματική	28-55 mg Kg ⁻¹

Ινδικό Χοιρίδιο	LD50	Στοματική	58 mg Kg ⁻¹
Κουνέλι	LD50	Στοματική	80 mg Kg ⁻¹
Αρουραίος	LD50	Δερματική	860 mg Kg ⁻¹
Οργανισμός	Δοκιμή	Χορήγηση	Δόση
Κουνέλι	LD50	Δερματική	500-2400 mg Kg ⁻¹
Κουνέλι	LD50	Οφθαλμικής επαφής	2.6 mg Kg ⁻¹
Γυναίκα	LC50	Αναπνευστική	341 mg m ⁻³
Άνδρας	LC50	Αναπνευστική	mg m ⁻³
Αρσενικός Αρουραίος	LC50	Αναπνευστική	1.1 mg L ⁻¹
Πουλί - Άγριο	LD50	Στοματική	3 mg Kg ⁻¹
Πάπια	LD50	Στοματική	29.4 mg Kg ⁻¹
Φασιανός	LD50	Στοματική	7.94 mg Kg ⁻¹
Κοτόπουλο	LD50	Στοματική	14 mg Kg ⁻¹

Φαρμακευτικά σκευάσματα εγκεκριμένα στην Ελλάδα : Perizin, Check-Mite.

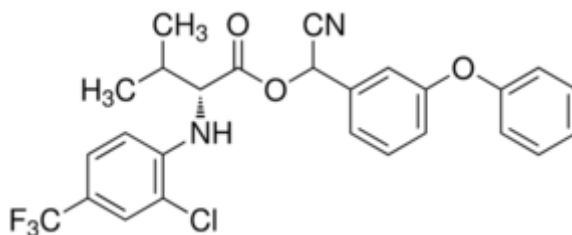
Φαρμακευτικά σκευάσματα μη εγκεκριμένα στην Ελλάδα⁶ : Asuntol⁶.

Τρόποι χρήσης στη μελισσοκομία : Η χρησιμοποίηση του άρχισε από τις Η.Π.Α., με τη διάθεση περιορισμένου αριθμού ταινιών ανά πολιτεία. Στην Ελλάδα πήρε έγκριση το 2006 και κυκλοφορεί με τη μορφή τριών διαφορετικών φαρμακευτικών σκευασμάτων. Το Perizin και το CheckMite+ που είναι εγκεκριμένα και το Asuntol που δεν έχει έγκριση για μελισσοκομική χρήση. Εφαρμόζεται με ψεκασμό, ως σκεύασμα βραδείας απελευθέρωσης (ταινίες CheckMite+), στην τροφή και συνηθέστερα με τη μορφή σταγόνων μεταξύ των πλαισίων των κυψελών (Perizin), αλλά μπορεί να εφαρμοστεί και με ψεκασμό.

MRL στο μέλι : Το θεσπισμένο MRL του coumaphos για την Ευρωπαϊκή Ένωση και την Ελλάδα είναι 0.1 mg Kg⁻¹.

⁶ Δεν αποτελεί εγκεκριμένο σκεύασμα σε κάποια χώρα της Ε.Ε.. Συγκεκριμένα στην Πορτογαλία υπάρχουν αναφορές για εκτεταμένη παράνομη χρήση.

Tau-Fluvalinate



Κοινή ονομασία : fluvalinate (ANSI)

Χημικές ονομασίες :

Cyano(3-phenoxyphenyl)methyl N-[2-chloro-4-(trifluoromethyl)phenyl]-DL-valinate
(CAS)

(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl N-[2-chloro-α,α,α-trifluoro-p-tolyl]-DL-valinate
(IUPAC)

(RS)-α-cyano-3-phenoxybenzyl (R)-2-[2-chloro-4-(trifluoromethyl)anilino-3-methyl-
butanoate]

Χημική Κατηγορία : Τριφθορομεθύλιο, πυρεθροειδές

Μοριακός Τύπος : C₂₆H₂₂ClF₃N₂O₃

Μοριακό Βάρος : 502.91

Φυσική Μορφή : Άχρωμο παχύρευστο υγρό.

Σημείο Ζέσεως : Μεγαλύτερο από 450°C.

Σημείο Τηξεως : 25°C.

Τάση Ατμών : <1x10⁻⁷ mm Hg στους 25°C.

Henry's Law Constant : 1.18x10⁻⁹ atm m³/mol στους 25°C.

Ειδικό Βάρος : 1.29 στους 25°C.

Δείκτης Διάθλασης : n_D²⁰ 1.549

Log Kow : 7.02

Σταθερότητα : Σταθερό σε ουδέτερα ή ελαφρώς όξινα μέσα.

Διαβρωτικότητα : Μη διαβρωτικό για ελαφρώς διαβρωτικά, ανάλογα με το μέταλλο.

Διαλυτότητα : Στο νερό 0.012 mg L⁻¹, στους 25°C. Διαλυτό σε αρωματικούς

υδρογονάνθρακες, αλκοόλες, διαιθυλαιθέρα και διχλωρομεθάνιο.

Τοξικότητα :

Οργανισμός	Δοκιμή	Χορήγηση	Δόση
Αρουραίος	LD50	Στοματική	261-282 mg Kg ⁻¹
Οργανισμός	Δοκιμή	Χορήγηση	Δόση
Ποντίκι	LD50	Στοματική	150-220 mg Kg ⁻¹
Αρουραίος	LD50	Δερματική	>20.000 mg Kg ⁻¹
Κουνέλι	LD50	Δερματική	>20.000 mg Kg ⁻¹
Ορτύκι	LD50	Στοματική	>2510 mg Kg ⁻¹
Ορτύκι	LC50	Στοματική	>5620 mg Kg ⁻¹

Φαρμακευτικά σκευάσματα εγκεκριμένα στην Ελλάδα : Fluvalinate.

Φαρμακευτικά σκευάσματα μη εγκεκριμένα στην Ελλάδα : Gabon PF 90⁷, Mavriol⁸, Varachet-forte⁹.

Τρόποι χρήσης στη μελισσοκομία : Κυκλοφορεί ως δραστική ουσία τριών φαρμακευτικών σκευασμάτων (Apistan, Mavrik, Klartan). Από τα σκευάσματα αυτά μόνο τα δύο πρώτα κυκλοφορούν στην Ελλάδα. Τα εγκεκριμένα σκευάσματα εφαρμόζονται με τη μορφή ταινιών ελεγχόμενης απελευθέρωσης, ενώ του μη εγκεκριμένου με διαβροχή.

MRL στο μέλι : Κατά την αξιολόγηση , η Ε.Ε. έκρινε ότι δεν απαιτείται η θέσπιση MRL, καθώς οι συγκεντρώσεις υπολειμμάτων ήταν πολύ χαμηλές.

⁷ Εγκεκριμένο σκεύασμα στην Τσεχία και τη Σλοβακία.

⁸ Εγκεκριμένο σκεύασμα στη Ρουμανία.

⁹ Εγκεκριμένο σκεύασμα στη Ρουμανία. Εκτός από το tau-fluvalinate περιέχει και Αμιτράζη.