

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Χημική και Βιομοριακή Ανάλυση

Διπλωματική Εργασία

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ
ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΜΕΛΙ

Αναστασία Ιωάννα Ζαΐμη

Επιβλέπων καθηγητής: Λαμπροπούλου Δημητρούλα

Πάτρα, Νοέμβριος 2023

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

ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟ ΜΕΛΙ

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

Δημητρούλα Λαμπροπούλου

Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

στο Τμήμα Χημείας του

Αριστοτελείου Πανεπιστημίου

Θεσσαλονίκης

Πάτρα, Νοέμβριος 2023

*Στους γονείς μου, Νικόλαο και Γεωργία
και στα αδέλφια μου, Ευάγγελο και Μαρία Ελένη*

Περίληψη

Το μέλι είναι ένα φυσικό προϊόν, το οποίο παράγουν οι μέλισσες από το νέκταρ των φυτών και αποτελεί πλούσια πηγή θρεπτικών συστατικών, συμπεριλαμβανομένων των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών, των βιταμινών και των μετάλλων, ενώ ταυτόχρονα έχει αντιμικροβιακές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες. Ωστόσο, η παρουσία φυτοφαρμάκων στο μέλι αποτελεί μια σοβαρή απειλή για την υγεία των ανθρώπων και των μελισσών. Τα φυτοφάρμακα είναι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των παρασίτων, των ζιζανίων και των ασθενειών στις καλλιέργειες. Τα φυτοφάρμακα μπορούν να μολύνουν το μέλι μέσω της επαφής με τα άνθη ή τα φυτά που έχουν ψεκάσει. Η παρουσία φυτοφαρμάκων στο μέλι ενδέχεται να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία των ανθρώπων, καθώς μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα υγείας, όπως αλλεργίες, νευρολογικές διαταραχές και καρκίνο. Αντίστοιχα, οι αρνητικές επιπτώσεις στις μέλισσες μπορούν να σχετιστούν με τον θάνατό τους, με τη μείωση της αναπαραγωγικής τους ικανότητας και με προβλήματα στην πλοήγησή τους.

Η ανάλυση των φυτοφαρμάκων στο μέλι είναι μια περίπλοκη διαδικασία που απαιτεί τη χρήση εξειδικευμένων μεθόδων και εξοπλισμού. Στις πιο κοινές μεθόδους ανάλυσης φυτοφαρμάκων στο μέλι περιλαμβάνονται οι χρωματογραφικές μέθοδοι, στις οποίες ανήκουν η αέρια χρωματογραφία GC, η υγρή χρωματογραφία LC και η υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης HPLC. Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να συνδυαστούν με μια πληθώρα ανιχνευτών όπως ο μαζικός φασματογράφος (MS), ανιχνευτές απορρόφησης UV/Vis, ανιχνευτές φλόγας-ιονισμού (FID) και ανιχνευτές φθορισμού. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι είναι οι πιο ευαίσθητες και ακριβείς και διαχωρίζουν τα φυτοφάρμακα από το μέλι με βάση τις φυσικές τους ιδιότητες, όπως η πολικότητα και η διαλυτότητα. Ένα άλλο είδος είναι η ανοσολογική μέθοδος ELISA που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο των φυτοφαρμάκων στο μέλι, βασιζόμενη στην ειδική δέσμευση αντισωμάτων με στόχο τα φυτοφάρμακα, η οποία παράγει ένα μετρήσιμο σήμα. Αυτές οι τεχνικές, είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό, χρησιμοποιούνται για την ακριβή αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι.

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει όρια για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στο μέλι. Τα όρια αυτά είναι βασισμένα στα επίπεδα που θεωρούνται ασφαλή για την υγεία των ανθρώπων. Τα όρια αυτά καθορίζονται για κάθε φυτοφάρμακο ξεχωριστά και συνήθως εκφράζονται ως η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση (MRL). Η MRL είναι η μέγιστη ποσότητα ενός φυτοφαρμάκου που μπορεί να ανιχνευθεί στο μέλι χωρίς να θεωρείται επιβλαβής για την υγεία των ανθρώπων. Τα όρια των φυτοφαρμάκων στο μέλι αναθεωρούνται τακτικά για να διασφαλιστεί ότι είναι επαρκή για την προστασία της δημόσιας υγείας. Στην Ελλάδα, τα όρια των φυτοφαρμάκων στο μέλι είναι τα ίδια με τα όρια που ισχύουν στην Ευρωπαϊκή Ένωση.

Οι κανονισμοί που αφορούν τη χρήση φυτοφαρμάκων στην παραγωγή μελιού αναδεικνύονται ως ουσιαστικοί για την προστασία της δημόσιας υγείας και της βιοποικιλότητας. Οι εν λόγω κανονισμοί παίζουν κρίσιμο ρόλο στην διασφάλιση ότι τα φυτοφάρμακα που εφαρμόζονται στις καλλιέργειες είναι ασφαλή για την ανθρώπινη υγεία. Επιπλέον, συμβάλλουν στον περιορισμό του κινδύνου έκθεσης των ανθρώπων σε φυτοφάρμακα μέσω του μελιού, ενώ παράλληλα προστατεύουν τις μέλισσες από τις αρνητικές επιπτώσεις που μπορεί να έχουν τα φυτοφάρμακα σε αυτές.

Λέξεις κλειδιά: Φυτοφάρμακα, μέλι, χημειομετρικές μέθοδοι, χρωματογραφικές, μέθοδοι, φασματομετρία μάζας.

Analytical techniques for the determination of pesticides in honey

Abstract

Honey is a natural product produced by bees from the nectar of plants and constitutes a rich source of nutrients, including carbohydrates, proteins, vitamins, and minerals, while simultaneously possessing antimicrobial and antioxidant properties. However, the presence of pesticides in honey poses a serious threat to both human health and bee populations. Pesticides are chemical substances used to control pests, weeds, and diseases in crops. They can contaminate honey through contact with sprayed flowers or plants. The presence of pesticides in honey may have adverse effects on human health, potentially leading to health issues such as allergies, neurological disorders, and cancer. Similarly, negative impacts on bees can range from mortality to reduced reproductive capacity and navigational problems.

The analysis of pesticides in honey is a complex process that requires the use of specialized methods and equipment. The most common methods for pesticide analysis in honey include chromatographic techniques, such as Gas Chromatography (GC), Liquid Chromatography (LC), and High-Pressure Liquid Chromatography (HPLC). Chromatographic techniques can be combined with a variety of detectors such as Mass Spectrometry (MS), UV/Vis Absorption Detectors, Flame Ionization Detectors (FID), and Fluorescence Detectors. Chromatographic methods are more sensitive and precise and they separate pesticides from honey based on their physical properties, such as polarity and solubility. Another type is the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method, which is used for pesticide monitoring in honey. It is based on the specific binding of antibodies to target pesticides, producing a measurable signal. These techniques, either individually or in combination, are used for the accurate identification and quantification of pesticide residues in honey. The European Union has established limits for pesticide residues in honey, based on levels considered safe for human health.

These limits are set for each pesticide individually and are usually expressed as Maximum Residue Levels (MRLs). MRLs represent the maximum amount of a pesticide that can be detected in honey without being considered harmful to human health. Pesticide limits in honey are regularly reviewed to ensure public health protection. In Greece, pesticide limits in honey are the same as those applied in the European Union.

Regulations governing the use of pesticides in honey production are crucial for safeguarding public health and biodiversity. These regulations play a critical role in ensuring that the pesticides applied to crops are safe for human health. Additionally,

they contribute to minimizing the risk of human exposure to pesticides through honey, while simultaneously protecting bees from the negative effects of these chemicals.

Keywords: Pesticides, honey, chemometric methods, chromatographic techniques, mass spectrometry.

Περιεχόμενα

Περίληψη.....	5
Abstract.....	7
1. Εισαγωγή.....	10
1.2 Σύσταση του μελιού	10
2. Φυτοφάρμακα.....	14
2.1 Τι ορίζεται φυτοφάρμακο	14
2.2 Κατηγορίες φυτοφαρμάκων	15
2.2.1 Προέλευση	15
2.2.2 Δράση	16
2.2.3 Χημική σύσταση	18
3. Τεχνικές προσδιορισμού φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού.....	23
3.1 Προετοιμασία δείγματος	23
3.2 Χρωματογραφικές τεχνικές.....	45
3.2.1 Αέρια Χρωματογραφία	46
3.2.2. Υγρή Χρωματογραφία.....	58
3.3 Ανοσολογικές τεχνικές	69
4. Όρια και MRL φυτοφαρμάκων σε μέλι.....	73
5. Συμπεράσματα.....	75
6. Βιβλιογραφία	79

1. Εισαγωγή

Το μέλι είναι ένα φυσικό, αρωματικό και γλυκό προϊόν που παράγεται από μέλισσες. Προέρχεται από το νέκταρ των φυτών, το οποίο οι μέλισσες συλλέγουν και μετατρέπουν σε πυκνό υγρό, αποθηκεύοντάς το στις κηρήθρες. Το μέλι διατηρεί υγρασία 14%-18% και παράγεται με δύο βασικούς τρόπους: από νέκταρ λουλουδιών (ανθόμελο) ή από μελιτώματα (εκκρίματα εντόμων). Το μέλι αποτελεί μια πηγή σημαντικής θρεπτικής αξίας, καθώς απορροφάται εύκολα από τον ανθρώπινο οργανισμό. Περιλαμβάνει στοιχεία όπως σάκχαρα, οργανικά οξέα, πρωτεΐνες, αμινοξέα, μεταλλικά στοιχεία όπως κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο, σίδηρο, καθώς και βιταμίνες όπως B2, B6, C, D, E και άλλες. Η κατανάλωση μελιού συνδέεται με τη βελτίωση της κατάστασης υγείας σε ανθρώπους που αντιμετωπίζουν προβλήματα καρδιαγγειακού συστήματος και μπορεί να συμβάλει στη μείωση της υπέρτασης.

Το ελληνικό μέλι διακρίνεται για την υψηλή ποιότητά του, λόγω των ευνοϊκών φυσικών συνθηκών και της ποικιλίας των φυτών. Συλλέγεται κυρίως από άγρια οικοσυστήματα και δεν περιέχει γενετικά τροποποιημένα φυτά. Η παραγωγή του κατανέμεται κυρίως σε μέλι μελιτώματος (πέυκο και έλατο) και ανθόμελο (θύμαρι και πορτοκαλιά).

Το μέλι χρειάζεται ειδική συσκευασία και συντήρηση για να διατηρήσει τις πολύτιμες ουσίες του. Η ετικέτα της συσκευασίας πρέπει να περιλαμβάνει την ονομασία του προϊόντος, το όνομα του παραγωγού, την ποσότητα, την ημερομηνία λήξης, τον αριθμό παρτίδας, τις συνθήκες διατήρησης, τη χώρα συγκομιδής και τη διατροφική δήλωση.

1.2 Σύσταση του μελιού

Το μέλι είναι μια πολύτιμη τροφή που περιέχει περίπου 200 διαφορετικές ουσίες, συμβάλλοντας στην υψηλή του θρεπτική αξία (Escuredo, Míguez, Fernández-González, & Seijo, 2013). Η σύνθεσή του εξαρτάται από τα φυτά που επισκέπτονται οι μέλισσες για να συλλέξουν νέκταρ. Τα βασικά συστατικά του μελιού περιλαμβάνουν σάκχαρα, νερό, πρωτεΐνες (συμπεριλαμβανομένων ενζύμων), οργανικά οξέα, βιταμίνες, μέταλλα, φαινολικές ενώσεις, χρωστικές και αρωματικές ουσίες.

Σάκχαρα

Τα σάκχαρα είναι η κυρίαρχη ομάδα ουσιών στο μέλι, αποτελώντας το 75% των συστατικών του. Αυτά περιλαμβάνουν μονοσακχαρίτες (γλυκόζη, φρουκτόζη),

δισακχαρίτες (σακχαρόζη, μαλτόζη) και τρισακχαρίτες (μαλτοτριόζη, μελεξιτόζη). Η περιεκτικότητα και η αναλογία αυτών των σακχάρων επηρεάζουν την ενεργειακή αξία, το ιξώδες, την υγρασία και την κρυστάλλωση του μελιού (Kamal & Klein, 2011). Η βοτανική προέλευση, η γεωγραφική περιοχή, οι κλιματικές συνθήκες, η επεξεργασία και η αποθήκευση επηρεάζουν την περιεκτικότητα σε σάκχαρα (Escuredo et al., 2014; Tornuk et al., 2013). Οι πεντόζες και οι εξόζες του μελιού μπορούν να υποστούν χημικές μεταβολές, όπως η δημιουργία φουρανίων, τα οποία αποτελούν δείκτες θερμικής επεξεργασίας και υποβάθμισης των σακχάρων. Η παρουσία αυτών των ενώσεων συνδέεται με μη ενζυματικές αντιδράσεις, όπως η αντίδραση Maillard, και η καραμελοποίηση.

Πρωτεΐνες

Το μέλι περιέχει πρωτεΐνες και αμινοξέα, των οποίων η ποσότητα και η σύνθεση ποικίλλουν ανάλογα με το είδος των μελισσών και την προέλευση του μελιού. Οι πρωτεΐνες στο μέλι προέρχονται από τη γύρη και τις εκκρίσεις των μελισσών, ενώ οι κύριες πρωτεΐνες του βασιλικού πολτού χρησιμοποιούνται ως δείκτες αυθεντικότητας του μελιού (Manzanares et al., 2014). Τα αμινοξέα αποτελούν περίπου 1% του μελιού, με την προλίνη να είναι το πιο άφθονο. Η ποσότητα της προλίνης χρησιμοποιείται ως κριτήριο για τον ωριμαντικό βαθμό του μελιού. Το μέλι περιέχει επίσης ένζυμα, όπως η ιμπερτάση και η οξειδάση της γλυκόζης, τα οποία έχουν βακτηριοκτόνο δράση (Moreira et al., 2007). Η αποθήκευση και η επεξεργασία του μελιού μπορεί να οδηγήσουν σε αντίδραση Maillard, δημιουργώντας ενώσεις που εξελίσσονται σε μελανοϊδίνες. Η συγκέντρωση αμινοξέων μπορεί να αυξηθεί αρχικά κατά την αποθήκευση, αλλά μειώνεται με το χρόνο λόγω της αντίδρασης Maillard και της δράσης των ενζύμων.

Οργανικά οξέα

Το μέλι περιέχει περίπου 20 οργανικά οξέα που συμβάλλουν στην οσμή, τη γεύση και την αντιβακτηριακή του δράση. Μερικά από αυτά τα οξέα είναι το κιτρικό, το οξικό, το μυρμηκικό, το ασπαρτικό, το βουτυρικό, το γλυκονικό, το γλουταμινικό, το γλουταρικό, το γαλακτικό, το μηλικό, το μηλονικό, το προπιονικό, το πυροσταφυλικό, το τρυγικό και το οξαλικό. Το γλυκονικό οξύ, που παράγεται από την οξείδωση της γλυκόζης μέσω της οξειδάσης της γλυκόζης, είναι το κυρίαρχο οξύ σε όλα τα είδη μελιού και η ποσότητά του εξαρτάται από το επίπεδο δραστηριότητας της οξειδάσης της γλυκόζης (Karabagias et al., 2014). Το κιτρικό οξύ επίσης απαντάται σε όλα τα

είδη μελιού και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να διαφοροποιήσει το μέλι ανθέων από το μέλι μελιτώματος.

Με την πάροδο του χρόνου και κατά τη διάρκεια της ζύμωσης, τα σάκχαρα και οι αλκοόλες του μελιού μετατρέπονται σε οξέα, αυξάνοντας τη συγκέντρωση της ελεύθερης οξύτητας στο μέλι (Cavia et al., 2007). Η ελεύθερη οξύτητα παραμένει σχεδόν σταθερή τους πρώτους 15 μήνες αποθήκευσης, αλλά αυξάνεται μετά από 20 μήνες. Η θερμική επεξεργασία του μελιού είναι σημαντική για τη διατήρηση της ασφάλειας του, αντιμετωπίζοντας τον κίνδυνο μόλυνσης και σχηματισμού πτητικών οξέων. Τα οργανικά οξέα επηρεάζουν επίσης την αισθητική των τροφίμων, συμβάλλοντας στο χρώμα και τη γεύση τους (Jurado-Sánchez, Ballesteros, & Gallego, 2011).

Μέταλλα

Το μέλι περιέχει διάφορες χημικές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων μακροστοιχείων και μικροστοιχείων, όπως κάλιο, μαγνήσιο, ασβέστιο, σίδηρο, κοβάλτιο, νικέλιο, φώσφορο, νάτριο, μαγγάνιο, ιώδιο, ψευδάργυρο, λίθιο, κάδμιο, χαλκό, σελήνιο, αρσενικό, βάριο, χρώμιο και άργυρο. Αυτά τα στοιχεία είναι σημαντικά για την ανθρώπινη διατροφή και η περιεκτικότητά του μελιού σε αυτά διαφέρει ανάλογα με τη βοτανική και γεωγραφική προέλευσή του. Σκούρα μέλια περιέχουν περισσότερα μέταλλα σε σύγκριση με ελαφριά μέλια (Alqarni et al., 2012).

Η παρουσία των μεταλλικών στοιχείων επηρεάζεται από τον τύπο του εδάφους και των φυτών από τα οποία οι μέλισσες συλλέγουν νέκταρ (Escuredo et al., 2013; Madejczyk & Baralkiewicz, 2008). Τα μακροστοιχεία, όπως κάλιο, ασβέστιο και νάτριο, καθώς και τα ιχνοστοιχεία, όπως σίδηρος, χαλκός, ψευδάργυρος και μαγγάνιο, είναι σημαντικά για τις βιολογικές λειτουργίες και δεν υποβαθμίζονται από εξωτερικές επιδράσεις (Alqarni et al., 2012).

Ωστόσο, βαρέα μέταλλα, όπως αρσενικό, μόλυβδος, υδράργυρος και κάδμιο, μπορεί να είναι τοξικά αν υπερβούν τα αποδεκτά επίπεδα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας και ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας έχουν θέσει όρια για αυτά τα στοιχεία στο μέλι για την εξασφάλιση της ασφάλειας των καταναλωτών (Ajtony et al., 2007). Η μόλυνση με μόλυβδο και κάδμιο στο μέλι είναι συχνότερη και μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα υγείας. Επομένως, ο έλεγχος των επιπέδων αυτών των μετάλλων είναι απαραίτητος για τη διασφάλιση της ποιότητας του προϊόντος.

Βιταμίνες

Το μέλι περιέχει μικρές ποσότητες βιταμινών, κυρίως του συμπλέγματος Β, όπως θειαμίνη (B1), ριβοφλαβίνη (B2), νικοτινικό οξύ (B3), παντοθενικό οξύ (B5), πυριδοξίνη (B6), βιοτίνη (B8) και φολικό οξύ (B9), οι οποίες προέρχονται από τους

κόκκους γύρης (Bonté & Desmoulière, 2013). Οι βιταμίνες αυτές συμβάλλουν στη βελτίωση του μεταβολισμού, της ανάπτυξης και της κυτταρικής λειτουργίας, λειτουργώντας ως συνένζυμα και συμπαραγοντες.

Η αντιοξειδωτική δράση των βιταμινών είναι σημαντική, με τη βιταμίνη C να μειώνει την οξείδωση αντιδρώντας με ιόντα υπεροξειδίου και οξυγόνου, και τη βιταμίνη E να απομακρύνει το οξυγόνο (Li S. et al., 2010). Το Manuka μέλι είναι γνωστό για την υψηλή περιεκτικότητά του σε βιταμίνη C, η οποία αν και εντοπίζεται σε όλα τα είδη μελιού, υπόκειται σε χημική και ενζυματική οξείδωση, επιταχυνόμενη από φως, οξυγόνο και θερμότητα (León-Ruiz, Vera, González-Porto, & Andrés, 2013).

Η επεξεργασία του μελιού μπορεί να μειώσει την περιεκτικότητα σε βιταμίνες λόγω της απομάκρυνσης σχεδόν όλης της γύρης και της οξείδωσης της βιταμίνης C από το υπεροξείδιο του υδρογόνου που παράγεται από την οξειδάση της γλυκόζης (Ciulu et al., 2011).

Φαινολικές ενώσεις

Οι φαινολικές ενώσεις είναι μια εκτεταμένη ομάδα χημικών ενώσεων με περίπου 10.000 μέλη, διακρινόμενες σε δύο κύριες υποκατηγορίες: τα μη φλαβονοειδή, όπως τα φαινολικά οξέα, και τα φλαβονοειδή, όπως οι φλαβόνες, οι φλαβανόνες, οι φλαβανόλες, οι ανθοκυανιδίνες, οι ισοφλαβόνες και οι χαλκόνες (Andersen & Markham, 2006). Τα μη φλαβονοειδή φαινολικά οξέα, που περιλαμβάνουν υδροξυκιναμικά οξέα και κατεχίνες, έχουν αντιοξειδωτικές ιδιότητες, προστατεύοντας από τις ελεύθερες ρίζες και αναστέλλοντας την οξείδωση των λιπιδίων (Pyrzynska & Biesaga, 2009).

Τα φλαβονοειδή είναι πολυφαινολικές ενώσεις με χαρακτηριστικό σκελετό φλαβανών, αποτελούμενες από 15 μόρια άνθρακα (C6-C3-C6), και περιλαμβάνουν ανθοκυανίνες, φλαβονόλες, φλαβανόνες, φλαβόνες και ισοφλαβόνες (Neilson et al., 2017). Είναι ευρέως διαδεδομένα στο φυτικό βασίλειο και αποτελούν κύρια χρωστικά συστατικά των ανθοφόρων φυτών. Στο μέλι, τα φλαβονοειδή συμβάλλουν στην αντιοξειδωτική του δράση και τον έλεγχο της οξείδωσης, ενώ προσφέρουν προστασία από την υπεριώδη ακτινοβολία, τα παθογόνα και τα φυτοφάγα ζώα (Kumar et al., 2013).

Η αντιοξειδωτική δράση των φλαβονοειδών εξαρτάται από παράγοντες όπως ο αριθμός και η θέση των υδροξυλομάδων, καθώς και η γλυκοζυλίωση, με τις αγλυκόνες να παρουσιάζουν υψηλότερη αντιοξειδωτική δραστηριότητα σε σύγκριση με τις γλυκοζυλιωμένες μορφές (Sghaier et al., 2011).

2. Φυτοφάρμακα

2.1 Τι ορίζεται φυτοφάρμακο

Ο Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) καταγράφει τα φυτοφάρμακα ως ουσίες ή μείγματα ουσιών ή βιολογικούς παράγοντες που σχεδιάστηκαν για να προλαμβάνουν, καταστρέφουν ή ελέγχουν παράσιτα. Αποτελούν συνθετικές ενώσεις που προορίζονται για χρήση σε γεωργικά προϊόντα, ξύλο, ζωοτροφές, για την καταπολέμηση ποικίλων παθογόνων παραγόντων, οι οποίοι προσβάλουν τα καλλιεργήσιμα φυτά και ελαττώνουν ή αναστέλλουν την παραγωγή των προϊόντων της φυτικής παραγωγής. Μπορούν επίσης να χορηγηθούν σε ζώα για έλεγχο παρασίτων, εντός ή πάνω στο σώμα τους.

Τα φυτοφάρμακα κατατάσσονται σε διάφορες κατηγορίες, όπως ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, νηματοκτόνα, μαλακιοκτόνα, ιχθυοκτόνα, κτηνοκτόνα, τρωκτικοκτόνα, βακτηριοκτόνα, εντομοαπωθητικά, ζωοαπωθητικά, μικροβιοκτόνα, μυκητοκτόνα κ.α. (Randall C, et al., 2014). Τα ζιζανιοκτόνα αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία, αντιπροσωπεύοντας περίπου το 50% της συνολικής χρήσης φυτοφαρμάκων παγκοσμίως.

Τα φυτοφάρμακα συνήθως χρησιμοποιούνται ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα και μπορεί να περιλαμβάνουν χημικά όπως τα καρβαμιδικά ή βιολογικούς παράγοντες όπως ιούς, βακτήρια ή μύκητες. Ο κύριος ρόλος τους είναι να αποτρέπουν, να αναστέλλουν ή να σκοτώνουν παράσιτα όπως έντομα, μύκητες, ζιζάνια, ή μικρόβια που μπορεί να προκαλούν ζημιές σε φυτά, να μεταδίδουν ασθένειες ή να αποτελούν απειλή για άλλα είδη. Επιπλέον, χρησιμοποιούνται για να επιτύχουν επιθυμητά αποτελέσματα στην ανάπτυξη των φυτών, όπως η αραίωση των καρπών και η πρόληψη πρόωρης πτώσης. Παρά τα οφέλη τους, τα φυτοφάρμακα έχουν και μειονεκτήματα, όπως η πιθανή τοξικότητα για τον άνθρωπο και άλλα είδη.

Τα φυτοφάρμακα έχουν διάφορα χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τη χρήση τους και τις επιπτώσεις τους στο περιβάλλον και την υγεία. Ας εξετάσουμε κάποια από αυτά τα χαρακτηριστικά:

1. Τοξικότητα:

Ορισμός: Η ικανότητα ενός φυτοφαρμάκου να προκαλεί επιβλαβείς επιπτώσεις σε άλλους οργανισμούς, εκτός από τον οργανισμό στόχο.

Διάκριση: Η τοξικότητα διακρίνεται σε οξεία (προκαλεί άμεσα σοβαρές βλάβες) και χρονική (προκαλεί μακροπρόθεσμες επιπτώσεις).

2. Αποτελεσματικότητα:

Ορισμός: Η ικανότητα ενός φυτοφαρμάκου να εκτελεί τον σκοπό του, δηλαδή να ελέγχει ή να εξαλείφει τον οργανισμό στόχο.

Παράγοντες: Ποικίλοι παράγοντες επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα, όπως οι συνθήκες και ο τύπος του παθογόνου.

3. Επικινδυνότητα:

Ορισμός: Το επίπεδο κινδύνου που συνδέεται με τη χρήση του φυτοφαρμάκου, λαμβάνοντας υπόψη την τοξικότητα και τις δυνητικές επιπτώσεις.

4. Συνδιαστικότητα:

Ορισμός: Η επίδραση της συνδυαστικής χρήσης διαφορετικών φυτοφαρμάκων, που μπορεί να είναι επικουρική ή ανταγωνιστική.

5. Υπολειμματική Δράση:

Ορισμός: Η ικανότητα ενός φυτοφαρμάκου να παραμένει ενεργό στο περιβάλλον για κάποιο χρονικό διάστημα μετά τη χρήση.

Είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη όλα αυτά τα χαρακτηριστικά κατά τη χρήση φυτοφαρμάκων, προκειμένου να μειωθούν οι επιπτώσεις στην υγεία και το περιβάλλον. Είναι ζωτικής σημασίας να εφαρμόζονται μέτρα ελέγχου και ρύθμισης για να διασφαλιστεί η ισορροπημένη χρήση τους, προκειμένου να προστατεύονται τα οικοσυστήματα και η υγεία των ανθρώπων.

2.2 Κατηγορίες φυτοφαρμάκων

Τα φυτοφάρμακα αναφέρονται σε μια ευρεία γκάμα χημικών και βιολογικών ουσιών που χρησιμοποιούνται για την προστασία των φυτών από ασθένειες, παράσιτα, και άλλες απειλές. Είναι σημαντικό να ταξινομούμε τα φυτοφάρμακα ανάλογα με τις ιδιότητές τους και να εξετάζουμε τις ομάδες τους. Τρεις κοινές προσεγγίσεις για την ταξινόμηση περιλαμβάνουν την προέλευση, την χημική σύσταση και τη δράση τους.

2.2.1 Προέλευση

Βοτανικά φυτοφάρμακα

Τα βοτανικά φυτοφάρμακα αποτελούνται από εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια που προέρχονται από διάφορα φυτά, όπως φλοιοί, φύλλα, ρίζες, άνθη, φρούτα, σπόροι, γαρίφαλο, ριζώματα και μίσχοι (E.S. Mizubuti, V.L. Júnior, G.A. Forbes, 2007). Κατά την παρασκευή των βοτανικών φυτοφαρμάκων, τα φυτικά μέρη ξηραίνονται και αλέθονται σε λεπτή σκόνη, ενώ στη συνέχεια εκχυλίζονται με οργανικούς διαλύτες για τη μέγιστη εκχύλιση των επιθυμητών ενώσεων. Τα εκχυλίσματα υποβάλλονται σε συμπύκνωση, διαμόρφωση και αξιολόγηση ως προς την αποτελεσματικότητά τους.

Τα βοτανικά φυτοφάρμακα, περιλαμβάνουν γη διατόμων (μικρόβια απολιθωμένου νερού), λάδι neem (εκχύλισμα ελαίου δέντρου) ή πυρεθρίνες (εκχύλισμα από χρυσάνθεμα) και ανήκουν στα λιγότερο τοξικά φυτά, ειδικά για μη στοχευόμενους οργανισμούς όπως οι επικονιαστές και τα ψάρια. Αυτό καθιστά τα βοτανικά

φυτοφάρμακα ασφαλή για τους καταναλωτές και επιδραματικά στη διαχείριση παρασίτων (N.K. Dubey, et. al., 2010).

Η βιοχημική αλληλεπίδραση μεταξύ των βοτανικών φυτοφαρμάκων και των παρασίτων είναι φυσική, αποτρέποντας την εμφάνιση αντοχής στα παράσιτα. Τα βοτανικά φυτοφάρμακα παρουσιάζουν ποικίλες μεθόδους δράσης, όπως απωθητικότητα, τοξικότητα, ρύθμιση ανάπτυξης και δομική τροποποίηση, κάνοντάς τα κατάλληλα για τη διαχείριση παρασίτων στις καλλιέργειες (R.S. Rattan, 2010). Σημαντικό είναι ότι τα βοτανικά φυτοφάρμακα δεν αφήνουν υπολείμματα στα προϊόντα και το περιβάλλον, προάγοντας έτσι τη διατήρηση του περιβάλλοντος και την ασφάλεια των καταναλωτών.

Συνθετικά φυτοφάρμακα

Τα συνθετικά φυτοφάρμακα είναι ανθρωπογενείς χημικές ουσίες που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για να σκοτώνουν ή να απωθούν τα παράσιτα. Χρησιμοποιούνται κυρίως στη γεωργία, αν και η χρήση τους δεν περιορίζεται στο χωράφι αλλά και σε άλλες βιομηχανίες ή και για οικιακή χρήση.

Ένα από τα χαρακτηριστικά των συνθετικών φυτοφαρμάκων είναι η υψηλή τους αποτελεσματικότητα στην εξάλειψη ή περιορισμό των επιβλαβών οργανισμών. Η σχεδίαση τους βασίζεται σε προηγμένες επιστημονικές γνώσεις για τις διάφορες μορφές παρασίτων, ενώ η εφαρμογή τους μπορεί να γίνει με ευκολία σε μεγάλη κλίμακα. Επιπλέον, τα συνθετικά φυτοφάρμακα μπορούν να προσφέρουν προστασία για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ενισχύοντας έτσι την απόδοση των καλλιεργειών.

Ωστόσο, η χρήση συνθετικών φυτοφαρμάκων συνδέεται με ορισμένα προβλήματα και ανησυχίες. Ένα από τα κύρια ζητήματα είναι η ανάπτυξη αντοχής των παρασίτων και των εντόμων σε αυτά τα φάρμακα, η οποία μπορεί να οδηγήσει στη μείωση της αποτελεσματικότητάς τους. Επιπλέον, υπάρχει ανησυχία για τις επιπτώσεις των χημικών στην υγεία των ανθρώπων και το περιβάλλον. Η παρουσία υπολειμμάτων συνθετικών φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και το περιβάλλον μπορεί να επηρεάσει αρνητικά την ανθρώπινη υγεία και τη βιοποικιλότητα. Σε αντίθεση με τα βοτανικά φυτοφάρμακα, τα συνθετικά φυτοφάρμακα δεν προέρχονται από φυσικές πηγές και συχνά παρουσιάζουν μεγαλύτερο περιβαλλοντικό αποτύπωμα. Παρά την αποτελεσματικότητά τους, οι γεωργοί και οι επιστήμονες συνεχίζουν να αναζητούν ισορροπημένες και βιώσιμες πρακτικές για την προστασία των φυτών, λαμβάνοντας υπόψη τις περιβαλλοντικές και υγειονομικές συνέπειες.

2.2.2 Δράση

Τα φυτοφάρμακα ταξινομούνται επιπλέον βάσει της δράσης τους στα παράσιτα ή στους εχθρούς των καλλιεργειών. Οι κυριότεροι τύποι φυτοφαρμάκων που χωρίζονται με βάση τον τρόπο δράσης τους ως προς τον στόχο είναι οι εξής:

1. Εντομοκτόνα:

- ο *Φυτοφάρμακα επαφής*: Εφαρμόζονται στο έμβιο και επηρεάζουν τα έντομα με άμεση επαφή.
- ο *Συστηματικά φυτοφάρμακα*: Απορροφώνται από τα φυτά και παρέχουν προστασία από το εσωτερικό.
- ο *Καταναλωτικά φυτοφάρμακα*: Σχεδιασμένα για να καταναλώνονται από τα έντομα με τροφή.

2. Ακαρεοκτόνα:

- ο Χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο ακάρεων, μικρών αρθρόποδων που μπορούν να προσβάλλουν φυτά.

3. Ζιζανιοκτόνα:

- ο Σχεδιάστηκαν για τον έλεγχο των ζιζανίων, που αναπτύσσονται σε καλλιέργειες και μπορούν να ανταγωνιστούν τα καλλιεργούμενα φυτά για χώρο, θρεπτικά συστατικά και νερό. Η χρήση ζιζανιοκτόνων είναι σημαντική για τη διατήρηση της παραγωγικότητας στις γεωργικές καλλιέργειες.
- ο *Μη-επιλεκτικά Ζιζανιοκτόνα*: Επιδρούν ομοιόμορφα σε πολλά ζιζάνια. Χρησιμοποιούνται όταν απαιτείται με ευρύ φάσμα δράσης.
- ο *Επιλεκτικά Ζιζανιοκτόνα*: Επηρεάζουν συγκεκριμένα είδη ζιζανίων. Χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο συγκεκριμένων προβληματικών ζιζανίων χωρίς να επηρεάζουν τα καλλιεργούμενα φυτά.

4. Μυκητοκτόνα:

- ο Χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο μυκητιασικών ασθενειών που μπορεί να επηρεάσουν τα φυτά.

5. Βακτηριοκτόνα:

- ο Χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο βακτηριακών ασθενειών που επηρεάζουν τα φυτά.

6. Τρωκτικοκτόνα:

- ο Τα τρωκτικοκτόνα είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των τρωκτικών, όπως ποντίκια και αρουραίοι, που αποτελούν προβλήματα υγείας και ασφάλειας σε πολλά περιβάλλοντα.

Επιπλέον, μερικά φυτοφάρμακα μπορεί να είναι ειδικά σχεδιασμένα για συγκεκριμένα είδη παρασίτων, ενώ άλλα ενδέχεται να έχουν ευρύτερο φάσμα δράσης. Η επιλογή του κατάλληλου τύπου φυτοφαρμάκου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων των ειδών των παρασίτων, του τύπου του φυτού, και των συνθηκών καλλιέργειας. Επίσης, η διάκριση μεταξύ ανθρωποκτόνων (που επηρεάζουν τους ανθρώπους) και μη ανθρωποκτόνων είναι σημαντική για την ασφαλή χρήση τους.

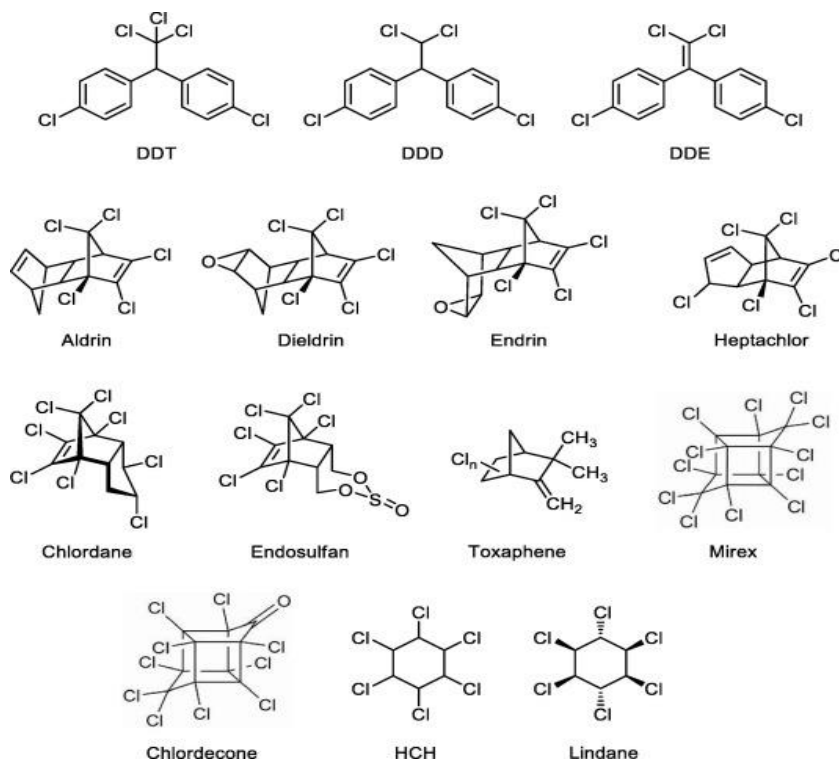
2.2.3 Χημική σύσταση

Τα φυτοφάρμακα μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις κύριες ομάδες, λαμβάνοντας υπόψη τη χημική τους σύνθεση: οργανοχλωρίδια, οργανοφωσφορικά, καρβαμιδικά και πυρεθροειδή. Η χημική ταξινόμηση παρέχει στους γεωργούς πληροφορίες για τον τρόπο εφαρμογής, τις προφυλάξεις που πρέπει να ληφθούν κατά τη διάρκεια της χρήσης και τα ποσοστά εφαρμογής. Σύγχρονα φυτοφάρμακα περιλαμβάνουν οργανικές χημικές ουσίες, είτε συνθετικής είτε φυτικής προέλευσης. Επιπλέον, ανόργανες ενώσεις μπορεί να χρησιμοποιούνται ως φυτοφάρμακα. Τα εντομοκτόνα, που αποτελούν σημαντικό κομμάτι των φυτοφαρμάκων, μπορούν να χωριστούν σε πολλές υποκατηγορίες, εξαρτώμενες από τη δράση τους στα εντόμα. Είναι σημαντικό να γίνεται κατανόηση των χημικών και φυσικών ιδιοτήτων των φυτοφαρμάκων για την ασφαλή και αποτελεσματική χρήση τους στη γεωργία και την προστασία των καλλιεργειών.

Οργανοχλωρίδια (OCPs)

Τα οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα (OCP) αποτελούν ομάδα χημικών ενώσεων με χαμηλό μοριακό βάρος, κυκλική δομή, και περιέχουν άτομα χλωρίου. Αν και ευρέως χρησιμοποιούνταν ως εντομοκτόνα και μυκητοκτόνα παγκοσμίως μέχρι τη δεκαετία του 1960, απαγορεύτηκαν στις περισσότερες ανεπτυγμένες χώρες λόγω της υψηλής τους τοξικότητας και υπολειμματικότητας στο περιβάλλον. Τα OCP βρίσκονται ευρέως στο περιβάλλον ως περιβαλλοντικοί ρύποι λόγω της λιπόφιλης φύσης τους, της χημικής σταθερότητας και της έλλειψης βιοαποδομήσιμων ιδιοτήτων. Αυτά τα χημικά παραμένουν στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα, εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα, και συσσωρεύονται στον λιπώδη ιστό των οργανισμών. Στον ανθρώπινο οργανισμό, αυτές οι ενώσεις επιδρούν συνήθως στο κεντρικό νευρικό σύστημα, επηρεάζοντας τις ενζυμικές μεμβράνες των νευρώνων και τις ηλεκτροφυσιολογικές ιδιότητες. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές στη ροή του K^+ και του Na^+ μέσω της μεμβράνης των νευρικών κυττάρων, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπτώσεις, όπως θάνατο από οξεία δηλητηρίαση και επιληπτικές κρίσεις (Narahashi, Frey, Ginsburg, & Roy, 1992).

Τα οργανοχλωρίδια χωρίζονται δομικά σε πέντε κατηγορίες, συμπεριλαμβανομένων του DDT και των αναλόγων του, του εξαχλωροκυκλοεξανίου (HCH), των κυκλοδιενίων, του τοξαφενίου και του mirex/chlordecone. Η επίμονη φύση αυτών των ουσιών σημαίνει ότι μπορούν να παραμένουν στον οργανισμό για μεγάλο χρονικό διάστημα, επιφέροντας αργά επιπτώσεις στην υγεία. Συγκεκριμένα, το DDT, ένα από τα OCP, μπορεί να διατηρηθεί στο ανθρώπινο σώμα για περισσότερα από 50 χρόνια, σύμφωνα με έρευνες (Mrema et al., 2013). Η οξεία τοξικότητα εμφανίζεται συνήθως σε υψηλές συγκεντρώσεις, αλλά η αργή απελευθέρωση από τον λιπώδη ιστό κατά τη διάρκεια σκληρών περιβαλλοντικών συνθηκών μπορεί να οδηγήσει σε κρυφή έκθεση

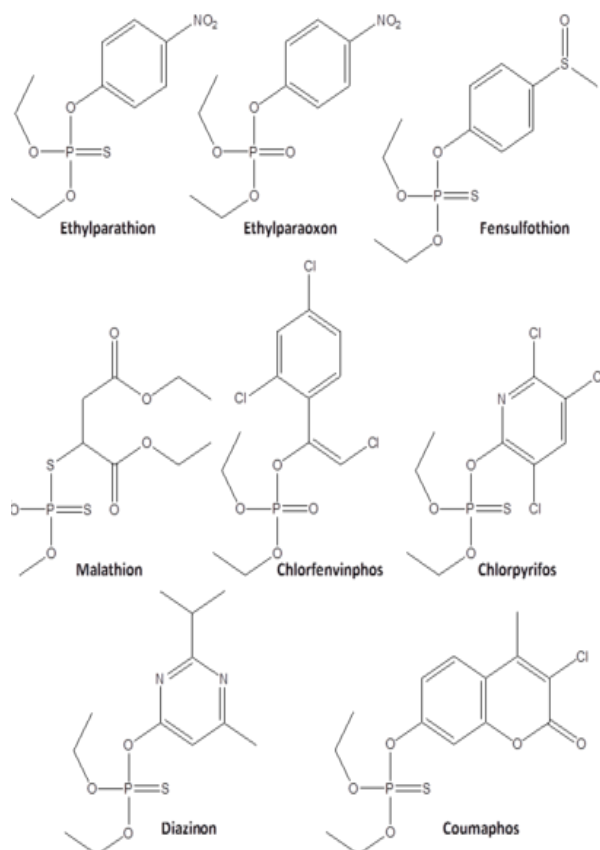


Εικόνα 1. Δομή ορισμένων οργανοχλωριδίων.

και χρόνια επίπτωση στην υγεία. Λόγω της αντοχής και της δυνατότητας μακροχρόνιας συσσώρευσής τους, πολλά από αυτά απαγορεύτηκαν από τη Σύμβαση της Στοκχόλμης.

Οργανοφωσφορικά (OPPs)

Τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα προέρχονται από εστέρες του φωσφορικού οξέος και αποτελούν έναν τύπο φυτοφαρμάκων με ιδιαίτερες χαρακτηριστικές ιδιότητες. Αυτά τα φυτοφάρμακα δρουν στον ανθρώπινο οργανισμό, επιδρώντας στο κεντρικό νευρικό σύστημα μέσω του μπλοκαρίσματος του ενζύμου ακετυλοχολίνης. Το εν λόγω ένζυμο ρυθμίζει την ποσότητα και τα επίπεδα του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολινεστεράση, το οποίο όταν διαταραχθεί οδηγεί σε ανεπιθύμητες επιπτώσεις στο νευρικό σύστημα (Fukuto, 1971). Τα συμπτώματα δηλητηρίασης από οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα είναι ποικίλα και μπορεί να περιλαμβάνουν κώμα, ζάλη, ναυτία, πονοκέφαλο, κράμπες, σπασμούς, απώλεια αντιδράσεων και, σε ακραίες περιπτώσεις, ακόμη και θάνατο.



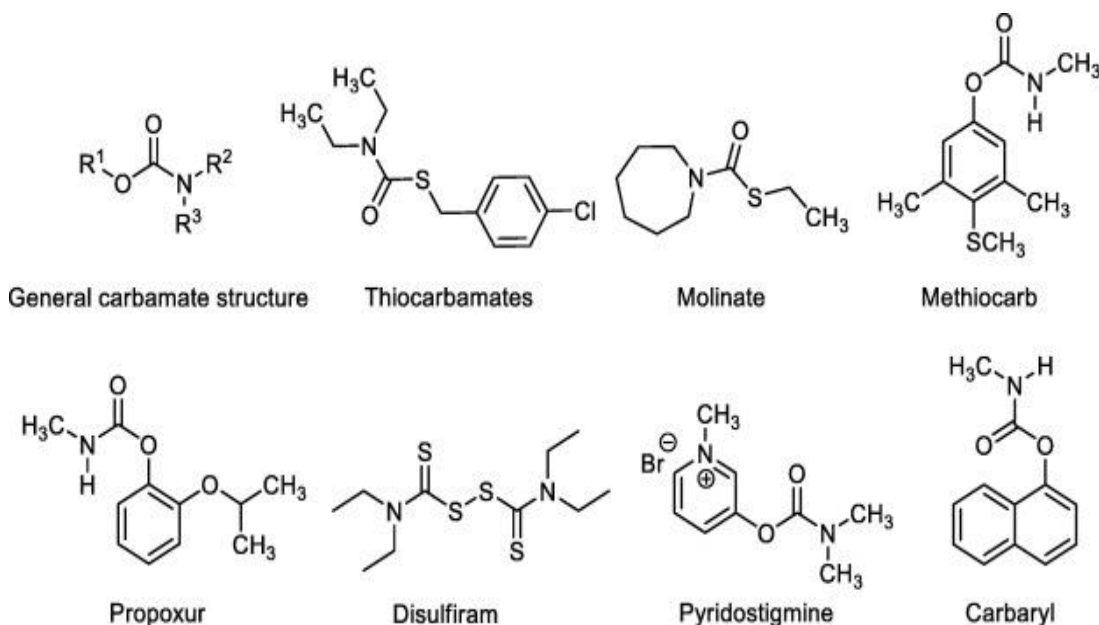
Εικόνα 2. Χημικές δομές κύριων
οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων

Η θεραπεία για τη δηλητηρίαση από οργανοφωσφορικά περιλαμβάνει τη χρήση της ατροπίνης, η οποία ανταγωνίζεται την ακετυλοχολίνη στους μускаρινικούς υποδοχείς. Η δόση αυτής της αντίδρασης ποικίλλει ανάλογα με το βαθμό της δηλητηρίασης και απαιτεί προσεκτική διαχείριση, συμπεριλαμβανομένης της παρακολούθησης των αναπνευστικών εκκρίσεων και της βρογχοδιαστολής (Robb and Baker, 2017). Παρόλο που είναι πιο εύκολο να διαλυθούν σε σύγκριση με τις οργανοχλωρικές ενώσεις, τα υπολείμματα των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων αντιπροσωπεύουν έναν από τους πιο σοβαρούς κινδύνους για το περιβάλλον και τα τρόφιμα, καθώς η τοξικότητα είναι μη αναστρέψιμη. Ως εκ τούτου, τα οργανοφωσφορικά έχουν περιοριστεί ή απαγορευτεί παγκοσμίως.

Καρβαμιδικά (Carbamates)

Τα καρβαμιδικά φυτοφάρμακα έχουν γενικά τον τύπο $RHNC(=O)OR'$ και είναι σχετικά πολικά, πολύ διαλυτά στο νερό και χημικά αντιδραστικά. Περιλαμβάνουν ορισμένες οργανικές ενώσεις εστέρων που προέρχονται από το διμεθυλο N-μεθυλοκαρβαμικό οξύ και χρησιμοποιούνται ως ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα, νηματοκτόνα και μυκητοκτόνα. Μερικά παραδείγματα καρβαμιδικών ενώσεων περιλαμβάνουν το thiobencarb, το propoxur, το molinate, το disulfiram, το methiocarb και το carbaryl, τα οποία έχουν ευρεία χρήση τόσο σε κατοικίδια όσο και σε καλλιέργειες. Η τοξικότητα αυτών των ενώσεων ποικίλλει ανάλογα με τη μοριακή τους δομή, αλλά γενικά εμφανίζουν μικρότερη διάρκεια δράσης σε σχέση με άλλες ομάδες όπως τα οργανοφωσφορικά και τα οργανοχλωρίδια (García et al., 2012). Η θεραπεία για την οξεία τοξικότητα από καρβαμιδικά είναι παρόμοια με αυτή που χρησιμοποιείται για τα οργανοφωσφορικά. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι οι καρβαμιδικές ενώσεις έχουν σύντομη διάρκεια δράσης, επομένως απαιτείται υψηλότερο επίπεδο προσοχής κατά τη χρήση ατροπίνης (Eicher, 2009). Τα συμπτώματα οξείας δηλητηρίασης από καρβαμιδικά εκδηλώνονται ποικιλοτρόπως σε διάφορα όργανα και μπορούν να περιλαμβάνουν συριγμό, δύσπνοια, αυξημένες εκκρίσεις, βήχα, πνευμονικό οίδημα,

κυάνωση, βρογχοσυστολή, ναυτία, έμετο, κοιλιακές κράμπες, διάρροια, ακράτεια, ταχυκαρδία, υπόταση, ακράτεια, καθώς και διάφορες επιδράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα, όπως ανησυχία, σύγχυση, υπνηλία, αδυναμία, σπασμοί και υποθερμία (Garrettson, 1993).

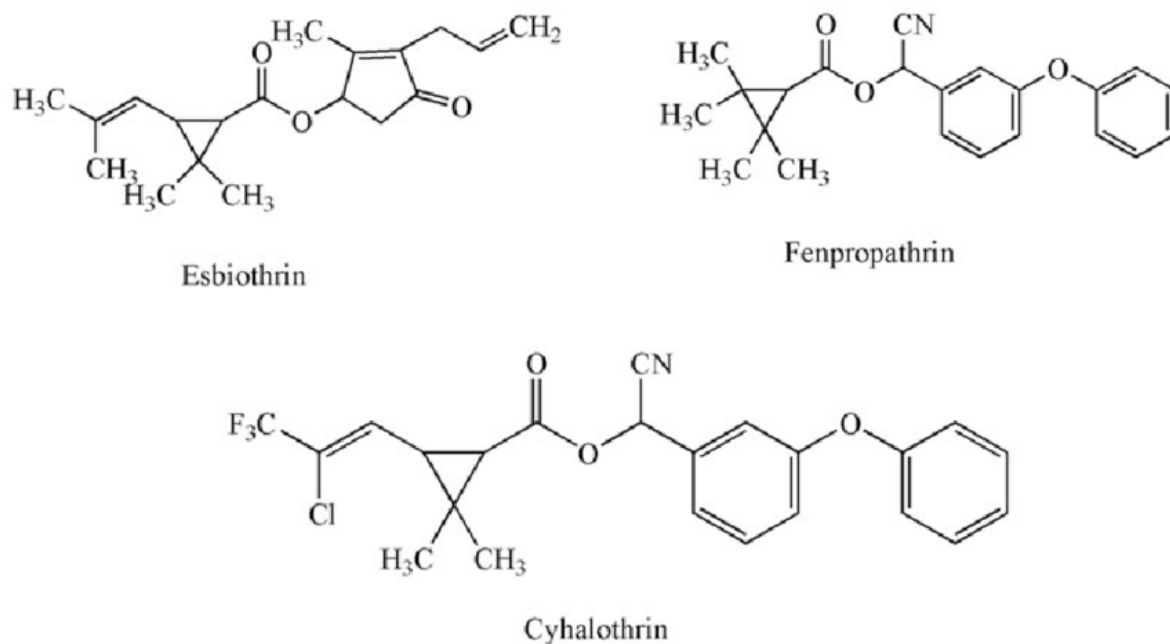


Εικόνα 3. Χημική δομή ορισμένων φυτοφαρμάκων καρβαμιδικών και θειοκαρβαμιδικών.

Πυρεθροειδή (Pyrethroids)

Τα πυρεθροειδή ανήκουν σε φυσικά εντομοκτόνα που παράγονται από τα άνθη του χρυσανθέμου, γνωστά ως πυρεθρίνες. Αυτές οι ενώσεις, που προέρχονται από εκχυλίσματα των ανθέων του φυτού *Chrysanthemum cinerariaefolium*, είναι κυρίως γνωστές για την επίδρασή τους στο κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων. Η πυρεθρίνη, για παράδειγμα, προκαλεί διακυμάνσεις στη δυναμική των καναλιών νατρίου στα νευρικά κύτταρα, οδηγώντας σε αύξηση του χρόνου ανοίγματος αυτών των καναλιών. (Kamita et al., 2005, Perry et al., 2013). Λόγω της έντονης ζήτησης για αυτά τα φυτοφάρμακα και της αυξανόμενης έλλειψης φυσικών εκχυλισμάτων από τα άνθη του χρυσανθέμου, οι επιστήμονες αναπτύσσουν συνθετικές εκδοχές τους. Τα περισσότερα πυρεθροειδή εντομοκτόνα μοιράζονται κοινά χαρακτηριστικά, όπως χαμηλή τοξικότητα για πτηνά και θηλαστικά, υψηλή τοξικότητα για έντομα και ταχεία δράση κατά των μασητικών εντόμων.

Παρόλο που αυτά τα εντομοκτόνα είναι αποτελεσματικά, πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή λόγω της τοξικότητάς τους για τα ψάρια, εάν εφαρμόζονται απευθείας στο νερό, και της περιορισμένης διαλυτότητάς τους στο νερό (Gupta and Crissman, 2013).



Εικόνα 4. Δομές τριών ειδών πυρεθροειδών

Συνολικά, υπάρχουν περισσότερα από 1000 διαφορετικά πυρεθροειδή που χρησιμοποιούνται, με λιγότερα από δώδεκα να είναι διαθέσιμα στις Ηνωμένες Πολιτείες. Χρησιμοποιούνται σε ποικίλες εφαρμογές, όπως σαμπουάν για κατοικίδια, θεραπείες κατά της ψείρας του ανθρώπου, σπρέι για κατοικίδια ζώα, απωθητικά για κουνούπια και εντομοκτόνα για επιχειρήσεις και καλλιέργειες.

Τα πυρεθροειδή μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές κατηγορίες: τα πυρεθροειδή τύπου I, τα οποία δεν περιλαμβάνουν κυανομάδα στη μοριακή τους δομή (όπως το permethrin, tetramethrin, allethrin, D-phenothrin κ.ά.), και τα πυρεθροειδή τύπου II, τα οποία περιέχουν κυανομάδα στη σύνθεσή τους (όπως το fenvalerate, deltamethrin, cypermethrin κ.ά.) (Tadeo, 2008).

Εκτός αυτών των βασικών κατηγοριών φυτοφαρμάκων, υπάρχουν και κάποιες υποκατηγορίες στις οποίες μπορούν να συγκαταλεχθούν με βάση τη χημική τους σύσταση. Οι τριαζίνες αποτελούν αρωματικές ετεροκυκλικές ενώσεις του αζώτου που δρουν κατά των ανεπιθύμητων ζιζανίων και αποτελούν φυτοφάρμακα μέτριας τοξικότητας. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το Amitraz, το Triazophos και το Chlorpyrifos. Τα φαινοξικά περιέχουν μια φαινολική ομάδα και αποτελούν ενώσεις που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο των εντόμων, επηρεάζοντας το νευρικό τους σύστημα. Σημαντικότερα παραδείγματα περιλαμβάνουν το 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) και 2,4,5-T (2,4,5-trichloro-phenoxyacetic acid). Οι ουρίνες είναι οργανικές ενώσεις που προκύπτουν μέσω της αντικατάστασης των ομάδων αμμωνίου στο μόριο της ουρίας, διακρίνονται για τη χαμηλή τους τοξικότητα και έχουν ευρεία χρήση στη γεωργία για τον έλεγχο των ζιζανίων, προκαλώντας την αναστολή της φωτοσύνθεσης στα φυτά. Τα νεονικοτινοειδή ανήκουν σε κατηγορία εντομοκτόνων

με ανάλογη δράση με τη νικοτίνη στο νευρικό σύστημα των εντόμων. Παραδείγματα περιλαμβάνουν το Imidacloprid, την Thiacloprid και την Acetamiprid.

3. Τεχνικές προσδιορισμού φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού

3.1 Προετοιμασία δείγματος

Η ανάλυση των φυτοφαρμάκων στο μέλι απαιτεί τη χρήση κατάλληλων αναλυτικών μεθόδων για να εξασφαλιστεί η ακρίβεια και η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Πολλές φορές, η ποιότητα των αποτελεσμάτων εξαρτάται από την κατάλληλη επιλογή της αναλυτικής μεθόδου (J. Vicharong, 2015). Μια αποτελεσματική μέθοδος πολλαπλών υπολειμμάτων είναι απαραίτητη για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων με γρήγορο χρονικό πλαίσιο. Κατά τη διαδικασία εκχύλισης των φυτοφαρμάκων από το μέλι, συνήθως χρησιμοποιείται οργανικό διάλυμα (Fernández et al., 2002, Porrini et al., 2003, Tsipi et al., 1999) ή διαλύτης σε στερεά φάση με πέρασμα από φυσίγγια οκταδεκυλοσιλανίου (Albero et al., 2004, Blasco et al., 2003, Martel and Zeggane, 2002, Tsipi et al., 1999) μετά από αραίωση του δείγματος μελιού με νερό. Ο καθαρισμός του δείγματος είναι απαραίτητος για τη μείωση των ορίων ανίχνευσης και για την αποφυγή παρεμβολών από τη μήτρα. Αν και ο εκτενής καθαρισμός μπορεί να οδηγήσει σε μερική απώλεια ορισμένων ενώσεων και να αυξήσει το κόστος, ο ανεπαρκής καθαρισμός μπορεί να έχει αρνητικές επιπτώσεις στην ποιότητα των δεδομένων, όπως η κάλυψη του υπολείμματος από συν-έκλυση συστατικών της μήτρας και η εμφάνιση ψευδώς θετικών αποτελεσμάτων. Οι συνήθεις παρεμβολές στα εκχυλίσματα μελισσοκομίας περιλαμβάνουν λιπίδια, χρωστικές, και υδατάνθρακες. Οι τεχνικές καθαρισμού περιλαμβάνουν χρησιμοποίηση χρωματογραφίας διείσδυσης γέλης σε Bio Beads SX3 (Dalpero et al., 2001), διαχωρισμό υγρού-υγρού (Herrera et al., 2005), εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) (Blasco et al., 2003, Fernández et al., 2002, Rissato et al., 2004), και χρωματογραφία προσρόφησης (με χρήση διοξειδίου του πυριτίου, Florisil, ενεργού άνθρακα, αλουμίνας, silica-gel/κάρβουνο) (Fernández et al., 2002). Η προετοιμασία του δείγματος εξαρτάται από τον τύπο διαχωρισμού και την μέθοδο ποσοτικοποίησης.

Η προετοιμασία του δείγματος αποτελεί ένα κρίσιμο βήμα στην συνολική αναλυτική διαδικασία, αν και είναι επίπονο και ενδεχομένως επιρρεπές σε σφάλματα, τα οποία μπορεί να διακυβεύσουν τα αποτελέσματα. Σύμφωνα με την έρευνα των Hercegonά και συνεργατών (Hercegonά et al., 2007), μια αποτελεσματική μέθοδος προετοιμασίας δείγματος για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων πρέπει να πληροί τα παρακάτω κριτήρια:

- Δοκιμή πολλαπλών υπολειμμάτων, η οποία περιλαμβάνει το μέγιστο δυνατό αριθμό φυτοφαρμάκων για να εξασφαλίσει την εκτεταμένη κάλυψη.

- Ανάκτηση κοντά στο 100%, ενισχύοντας την ακρίβεια των αποτελεσμάτων.
- Αφαίρεση παρεμβολών, η οποία μας δίνει τη δυνατότητα απομάκρυνσης πιθανών παρεμβαλλόμενων ενώσεων για βελτίωση της επιλεκτικότητας.
- Δυνατότητα αύξησης συγκέντρωσης, για αύξηση της συγκέντρωσης των αναλυτών.
- Ακρίβεια και Ανθεκτικότητα στα αποτελέσματα.

Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)

Η μέθοδος Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE) αποτελεί μια προηγμένη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τον καθαρισμό και την προετοιμασία δειγμάτων πριν από την ανάλυση και βασίζεται στον περιορισμό επιλεγμένων αναλυτών σε ροφητές, ακολουθούμενο από την εκχύλιση τους με ειδικούς διαλύτες (C. Pirard, J. Widart, et. Al., 2007). Αυτή η τεχνική συνδυάζει τη διαδικασία εξαγωγής και τον καθαρισμό σε ένα βήμα, παράγοντας καθαρά εκχυλίσματα που μπορούν να υποβληθούν σε άμεση ανάλυση με αέρια ή υγρή χρωματογραφία (G. Amendola, P. Pelosi, R. Dommarco, 2011). Τα χαρακτηριστικά της απλότητας, της ανθεκτικότητας, της ταχύτητας και της χαμηλής κατανάλωσης διαλύτη καθιστούν αυτήν την τεχνική ελκυστική εναλλακτική λύση για την ανάλυση πολύπλοκων δειγμάτων.

Η εξαγωγή των φυτοφαρμάκων από το μέλι έχει πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας διάφορους ροφητές, όπως η διβινυλοβενζολο-συν-N-βινυλοπυρρολιδόνη (D. Debayle, 2008), γη διατόμων (G. Amendola, 2011), πυριτικό μαγνήσιο (M. Garcia-Chao, 2010) και στήλες C18 (S. Bonzini, 2011). Σε μια μέθοδο που βασίζεται σε SPE, αναλύθηκαν 53 φυτοφάρμακα διαφορετικών κατηγοριών στο μέλι. Η μέθοδος ήταν γρήγορη και χρησιμοποιούσε μικρές ποσότητες διαλύτη. Το μέλι διαλύθηκε σε μείγμα μεθανόλης-νερού, φορτώθηκε σε προσροφητικό γης διατόμων και κατανεμήθηκε κατά μήκος στήλης με βάση τη βαρύτητα. Τα περισσότερα από τα συνεκχυλίσματα διατηρήθηκαν, ενώ τα φυτοφάρμακα εκλούστηκαν με διχλωρομεθάνιο και αναλύθηκαν απευθείας με αέρια και υγρή χρωματογραφία.

Η μέθοδος SPE αποδείχθηκε αποτελεσματική για την ανάλυση ακατέργαστων δειγμάτων μελιού, τα οποία λήφθηκαν απευθείας από το μελισσοκομείο. Για τον διαχωρισμό των κλασμάτων από το ακατέργαστο μέλι, εφαρμόστηκε φυγοκέντρωση. Το βέλτιστο πρωτόκολλο περιλάμβανε την ανάμειξη 1 g μελιού με 3 mL μεθανόλης-νερού (10:90, v/v), περνώντας το από στήλη πυριτικού μαγνησίου και εκλούοντας τις ενώσεις-στόχους με μεθανόλη (M. Garcia-Chao, 2010). Φυτοφάρμακα όπως το fipronil, οι μεταβολίτες του (fipronil sulfoxide, fipronil desulfinyl και fipronil carboxamide), το thiamethoxam και το imidacloprid εκχυλίστηκαν και αναλύθηκαν με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας.

Σε μια μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η SPE με προσροφητικό υλικό C18 για την εκχύλιση και καθαρισμό φυτοφαρμάκων από το μέλι. Το μέλι διαλύθηκε σε νερό, ένα βήμα που βοηθά στη μείωση του ιξώδους του μελιού και διευκολύνει την εκχύλιση των

φυτοφαρμάκων. Η στήλη SPE C18 προετοιμάζεται με διέλευση μεθανόλης και ακολουθεί έκπλυση με αποσταγμένο νερό για την εξάλειψη των οργανικών υπολειμμάτων. Το διάλυμα του δείγματος φορτώνεται στη στήλη. Τα φυτοφάρμακα προσροφώνται στο υλικό C18. Στη συνέχεια, ακολουθεί το ξέπλυμα με νερό με σκοπό την αφαίρεση των σακχάρων και άλλων υδατοδιαλυτών συστατικών του μελιού. Το εκχύλισμα συμπυκνώνεται υπό ρεύμα αζώτου για να αυξηθεί η συγκέντρωση των φυτοφαρμάκων και να βελτιωθεί η ευαισθησία της ανάλυσης. Το καθαρισμένο εκχύλισμα αναλύεται με GC-MS. Η μέθοδος έδειξε υψηλή ευαισθησία με όρια ανίχνευσης (LOD) στα 0.1 ng/g. Η ανάκτηση των φυτοφαρμάκων ήταν μεταξύ 80-110%, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία και την ακρίβεια της μεθόδου. (Blasco, C., et al. (2003)) Μια άλλη μελέτη χρησιμοποίησε την SPE με Florisil για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων από μέλι. Το μέλι διαλύθηκε σε διάλυμα ακετονιτρίλιου. Η στήλη SPE Florisil προετοιμάζεται με διέλευση ακετονιτρίλιου και ακολουθεί έκπλυση με αποσταγμένο νερό για την απομάκρυνση των οργανικών υπολειμμάτων. Το διάλυμα του δείγματος φορτώνεται στη στήλη. Μετά το ξέπλυμα με νερό, τα φυτοφάρμακα εκχυλίστηκαν με ακετονιτρίλιο και στη συνέχεια το δείγμα συμπυκνώθηκε. Το καθαρισμένο εκχύλισμα αναλύεται με LC-MS/MS. Η μέθοδος έδειξε υψηλή ευαισθησία με όρια ανίχνευσης (LOD) στα 0.05 ng/g. Η ανάκτηση των φυτοφαρμάκων ήταν μεταξύ 85-105%, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία και την ακρίβεια της μεθόδου. (Fernandez, M., et al. (2006)).

Η Στερεά Φάση Εκχύλιση (SPE) είναι μια αποδοτική και αξιόπιστη μέθοδος για την προετοιμασία δειγμάτων μελιού για την ανάλυση φυτοφαρμάκων, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια στις αναλύσεις. Η SPE προσφέρει εξαιρετικό καθαρισμό του δείγματος, μειώνοντας τις ακαθαρσίες και βελτιώνοντας την ευαισθησία και ακρίβεια της ανάλυσης. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί με διάφορους τύπους προσροφητικών υλικών ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των φυτοφαρμάκων και του δείγματος, ενώ συγκριτικά με άλλες μεθόδους, η SPE χρησιμοποιεί λιγότερους οργανικούς διαλύτες. Παρόλα αυτά, είναι αναγκαία η βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης για κάθε τύπο δείγματος και αναλυτή.

Πίνακας 1. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τις δύο μεθόδους προετοιμασίας δείγματος (SPE με C18 και SPE με Florisil) για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι.

Χαρακτηριστικό	SPE με C18	SPE με Florisil
Υλικό προσρόφησης	C18	Florisil
Διαλύτης δείγματος	Νερό	Ακετονιτρίλιο

Προεπεξεργασία	Προετοιμασία με μεθανόλη και έκπλυση με νερό	Προετοιμασία με ακετονιτρίλιο και έκπλυση με νερό
Τύπος ανάλυσης	GC-MS	LC-MS/MS
Όρια ανίχνευσης (LOD)	0.1 ng/g	0.05 ng/g
Ανάκτηση φυτοφαρμάκων	80-110%	85-105%
Αναφορά στη μελέτη	Blasco, C., et al. (2003)	Fernandez, M., et al. (2006)

QuEChERS

Το QuEChERS, που αντιπροσωπεύει τα λατινικά Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe, αποτελεί μια καινοτόμο και δημοφιλή τεχνική προετοιμασίας δειγμάτων σε διεθνές επίπεδο (E. Cieslik, A. Sadowska-Rociek, J.M.M. Ruiz, M. Surma-Zadora, 2011). Ο βασικός στόχος κατά την ανάπτυξή του ήταν η δημιουργία μιας διαδικασίας που θα είναι εφαρμόσιμη σε οποιοδήποτε εργαστήριο, με έμφαση στην απλοποίηση των διαδικασιών.

Η μέθοδος QuEChERS αντικαθιστά πολλά παραδοσιακά αναλυτικά βήματα με μια απλούστερη διαδικασία, χρησιμοποιώντας άλατα, όπως το θεικό μαγνήσιο ($MgSO_4$) και χλωριούχο νάτριο ($NaCl$), για την εκχύλιση/διαχωρισμό των ενώσεων και στερεά φάση διασποράς εκχύλισης (dSPE) για τον καθαρισμό των δειγμάτων για την απομάκρυνση ή μείωση των συν-εκχυλισμάτων από τη μήτρα (O.D. Prestes, C.A. Friggi, M.B. Adaime, R. Zanella, 2009).

Έχουν πραγματοποιηθεί τροποποιήσεις στην αρχική μέθοδο, όπως η προσθήκη τριαιθυλαμίνης σε ακετονιτρίλιο για βελτίωση της ανάλυσης ορισμένων φυτοφαρμάκων και της ακρίβειας του ποσοτικού προσδιορισμού ώστε να μειωθούν οι επιδράσεις της μήτρας. Επιπλέον, έχει γίνει προσπάθεια χρήσης προστατευτικών αναλυτών (APs), όπως αιθυλογλυκερόλη, γλυκονολακτόνη και σορβιτόλη, καθώς και βαθμονόμησης IS, για την ελαχιστοποίηση της ενίσχυσης του σήματος αναλυόμενης ουσίας που προκαλείται από τη μήτρα (Anastassiades et al. 2003; Cajka et al. 2005;

Mastovska et al. 2005; Li et al. 2012). Οι ροφητές αμινοπροπυλίου και οι ροφητές δευτεροταγών αμινών (PSA) παρέχουν πιο αποτελεσματικό καθαρισμό στη φάση συζευγμένου πυριτίου, αφαιρώντας τη μεγαλύτερη ποσότητα παρεμβολών μήτρας. Παρόλα αυτά, η αντικατάσταση του ροφητή PSA με στήλες C18 SPE έχει προταθεί για να αυξήσει τη σταθερότητα και την ανάκτηση ορισμένων ενώσεων. Αυτές οι τροποποιήσεις αντικατοπτρίζουν τη συνεχή εξέλιξη της μεθόδου QuEChERS για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι, καθιστώντας την προσαρμόσιμη σε διάφορες απαιτητικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

Παρά την ευρεία χρήση της μεθόδου QuEChERS στην ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι, παρουσιάζει ορισμένα μειονεκτήματα. Ένας περιορισμός είναι η απαιτητικότητα να έχει το δείγμα περισσότερο από 75% νερό, και ως εκ τούτου, απαιτείται αρχική διάλυση του δείγματος μελιού. Αυτό οδηγεί σε χαμηλότερη συγκέντρωση του δείγματος σε σύγκριση με άλλες τεχνικές παρασκευής δείγματος. Για την αντιμετώπιση αυτού του περιορισμού, προστέθηκε ένα βήμα συγκέντρωσης δείγματος προς εξάτμιση η οποία ήταν ικανοποιητική για την εκχύλιση, οργανοφωσφορικών, πυρεθροειδών στο μέλι (L. Wiest, et. Al., 2011). Σύμφωνα με αυτούς τους συγγραφείς, η εξάτμιση μπορεί να είναι απαραίτητη όταν το MRL είναι χαμηλότερο από το LOD.

Σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε μέλι χρησιμοποιώντας QuEChERS και LC-MS/MS, δείγμα μελιού και διαλύθηκε σε αποσταγμένο νερό και ακολούθησε προσθήκη 10 mL ακετονιτρίλιου και των αλάτων QuEChERS (4 g θειικό μαγνήσιο και 1 g χλωριούχο νάτριο). Το μίγμα φυγοκεντρήθηκε και υπέστη καθαρισμό dSPE με μεταφορά του υπερκείμενου σε ένα φιαλίδιο που περιέχει ένα μείγμα απορροφητικών υλικών (150 mg PSA και 150 mg C18). Το μίγμα ανακινείται και φυγοκεντρείται ξανά για να απομακρυνθούν οι ακαθαρσίες. Το καθαρισμένο εκχύλισμα συμπυκνώθηκε υπό ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε κινητή φάση (νερό-ακετονιτρίλιο) για ανάλυση με LC-MS/MS. Η μέθοδος QuEChERS έδειξε υψηλή ανάκτηση φυτοφαρμάκων (85-115%) και χαμηλά όρια ανίχνευσης (0.01-0.1 ng/g). Η διαδικασία ήταν γρήγορη, αποτελεσματική και ασφαλής για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι (Lehotay, S. J., et al. (2010). "Validation of a fast and easy method for the determination of pesticide residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 5884-5891).

Σε μια άλλη μελέτη πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός πολλαπλών φυτοφαρμάκων σε μέλι με QuEChERS και GC-MS. Διεκπεραιώθηκε η ίδια διαδικασία με την προηγούμενη μέθοδο, χρησιμοποιώντας το μίγμα αλάτων QuEChERS και τη στήλη dSPE για τον καθαρισμό. Το καθαρισμένο εκχύλισμα συμπυκνώθηκε και αναλύθηκε με GC-MS για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φυτοφαρμάκων. Η μέθοδος QuEChERS επέδειξε καλή ανάκτηση φυτοφαρμάκων (80-110%) και ευαισθησία, με όρια ανίχνευσης (LOD) 0.01-0.5 ng/g. Η ανάλυση με GC-MS ήταν αποτελεσματική για την ταυτοποίηση πολλαπλών φυτοφαρμάκων σε ένα ενιαίο run (Anastassiades, M., et al. (2003)). Άλλη μια μελέτη πάνω στην ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι, είναι

με συνδυασμό QuEChERS και UHPLC-MS/MS. Η προκατεργασία του δείγματος με QuEChERS είναι παρόμοια με τα προηγούμενα παραδείγματα. Το καθαρισμένο εκχύλισμα συμπυκνώνεται και αναλύεται με UHPLC-MS/MS για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των φυτοφαρμάκων. Η μέθοδος QuEChERS έδειξε υψηλή ανάκτηση φυτοφαρμάκων (85-115%) και χαμηλά όρια ανίχνευσης (LOD) 0.005-0.1 ng/g. Η χρήση UHPLC-MS/MS βελτίωσε τον διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των φυτοφαρμάκων, παρέχοντας γρήγορα και αξιόπιστα αποτελέσματα (Prestes, O. D., et al. (2009)).

Πίνακας 2. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της μεθόδου QuEChERS.

Συγγραφέας & Έτος	Μέθοδος Εκχύλισης	Αναλυτική Μέθοδος	Αποτελέσματα
Lehotay, S. J., et al. (2010)	QuEChERS	LC-MS/MS	Ανάκτηση: 85%-115%, Όρια Ανίχνευσης: 0.01-0.1 ng/g, Γρήγορη και ασφαλής μέθοδος για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι
Anastassiades, M., et al. (2003)	QuEChERS	GC-MS	Ανάκτηση: 80%-110%, Όρια Ανίχνευσης: 0.01-0.5 ng/g, Αποτελεσματική για την ταυτοποίηση πολλαπλών φυτοφαρμάκων σε ένα run
Prestes, O. D., et al. (2009)	QuEChERS	UHPLC-MS/MS	Ανάκτηση: 85%-115%, Όρια Ανίχνευσης: 0.005-0.1 ng/g, Αποτελεσματική με χρήση UHPLC-MS/MS για γρήγορη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση

Εκχύλιση υγρής φάσης (LLE)

Η LLE είναι μια από τις παλαιότερες και ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές εκχύλισης. Η αρχή της περιλαμβάνει τη μεταφορά μιας αναλυόμενης ουσίας από μια υδατική μήτρα σε έναν διαλύτη εκχύλισης που μπορεί να αναλυθεί με χρωματογραφικές τεχνικές. Η LLE αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική εξαγωγής και καθαρισμού που χρησιμοποιείται στον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων στο μέλι. Συνήθως χρησιμοποιεί τοξικούς οργανικούς διαλύτες και χαρακτηρίζεται από τη

χρήση πολλαπλών βημάτων χειρισμού δειγμάτων, πράγμα που την καθιστά ευάλωτη σε σφάλματα και μόλυνση (A.N. Anthemidis, K.I.G. Ioannou, 2009). Επιπλέον, συνήθως επιτρέπει την εξαγωγή αναλυτών που ανήκουν μόνο σε μία χημική κατηγορία (M.W. Kujawski, et. al., 2014).

Παρά τα παραπάνω μειονεκτήματα, η LLE συνεχίζει να χρησιμοποιείται στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων στο μέλι. Αυτή η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό των ενώσεων με βάση τις σχετικές διαλυτότητές τους σε δύο διαφορετικά μη αναμίξιμα υγρά, συνήθως νερό και έναν οργανικό διαλύτη. Ο διαλύτης που χρησιμοποιείται στη μέθοδο εξαγωγής υγρών-υγρών (LLE) πρέπει να είναι αμιγής με την υδατική μήτρα, προκειμένου να επιτραπεί εύκολος διαχωρισμός των δύο φάσεων. Οι αναλύτες πρέπει να είναι εύκολα διαλυτοί στο διάλυμα και να εμφανίζουν υψηλούς συντελεστές κατανομής. Συνήθεις διαλύτες περιλαμβάνουν διχλωρομεθάνιο, χλωροφόρμιο, 1-χλωροβουτάνιο, τολουόλιο, ακετονιτρίλιο και εξάνιο. Η χρήση διαφορετικών αναλογιών διαλυτών μπορεί να επηρεάσει την απόδοση της εξαγωγής. Παρεμβολές όπως οι υδατάνθρακες ή οι χρωστικές μπορεί να εξαχθούν συγχρόνως και να επηρεάσουν την ανάκτηση των επιθυμητών ενώσεων όταν χρησιμοποιείται υψηλός όγκος διαλύτη. Ωστόσο, απαιτείται προσαρμογή της μεθόδου προετοιμασίας του δείγματος ανάλογα με το φυσικοχημικό χαρακτηριστικό κάθε φυτοφαρμάκου (D. Debayle, G. Dessalces, M.F. Grenier-Loustalot, 2008).

Η LLE χρησιμοποιείται συχνά μαζί με ένα βήμα καθαρισμού σε μία στήλη εξαγωγής σε στερεά φάση (SPE) (D. Debayle, G. Dessalces, M.F. Grenier-Loustalot, 2008). Το πιο κοινώς χρησιμοποιούμενο υλικό καθαρισμού για το μέλι μετά την LLE είναι το πυριτικό μαγνήσιο, αν και χρησιμοποιούνται επίσης, το οκταδεκυλοσιλάνιο, οκτυλοσιλάνιο, silica gel, πολυδιμεθυλοσιλοξάνιο, πολυδιβινυλοβενζόλιο, μονολιθικό πυρίτιο, η γη διατόμων και η PSA. Το πυριτικό μαγνήσιο έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς λόγω της αποτελεσματικότητάς του στον καθαρισμό των δειγμάτων τροφίμων (M. Moniruzzaman, M.A.Z. et. al., 2014).

Κάποια πρωτόκολλα χρησιμοποιούν χλωριούχο νάτριο για την προώθηση της μεταφοράς των αναλυτών προς την οργανική φάση, μια διαδικασία γνωστή ως "salting out". Είναι σημαντικό να ρυθμιστεί το pH της υδατικής μήτρας, ώστε να διατηρηθεί ισορροπημένο το φορτίο των αναλυτών. Η χρήση όξινου ή βασικού pH μπορεί να βοηθήσει στην αποφυγή εκχύλισης ακαθαρσιών, όπως φωσφολιπίδια. Κατά τη διάρκεια της εκχύλισης, το μείγμα μήτρας-διαλύτη πρέπει να ανακινείται για να διασφαλιστεί η επαφή των δύο φάσεων. Η έντονη ανακίνηση μπορεί να προκαλέσει το σχηματισμό γαλακτώματος, που απαιτεί καθαρισμό. Οι διαλύτες που είναι λιγότερο πυκνοί από το νερό μπορούν να αφαιρεθούν με πιπέτα, ενώ πυκνότεροι διαλύτες μπορούν να εκκενωθούν από τον πυθμένα της διαχωριστικής χοάνης. Πολλαπλές εκχύλισεις μπορεί να απαιτηθούν για την πλήρη απομάκρυνση των αναλυτών από τη μήτρα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να χρειαστεί εκχύλιση σε πολικό διαλύτη προκειμένου να εξαλειφθούν ουδέτερες ενώσεις πριν από την ανάλυση με GC-MS.

Η LLE έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων στο μέλι. Τα φυτοφάρμακα, λόγω της χημικής τους φύσης, μπορούν να μεταφερθούν εύκολα από την υδατική φάση στην οργανική φάση, επιτρέποντας την αποτελεσματική τους συγκέντρωση και ανάλυση.

Σύμφωνα με το συγγραφέα López-Blanco, R., et al. (2014), πραγματοποιήθηκαν πειραματικές διαδικασίες για τον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων στο μέλι με χρήση της εκχύλισης υγρού-υγρού και GC-MS. Το μέλι διαλύθηκε σε υδατικό διάλυμα και ακολούθησε η εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο ως οργανικό διαλύτη. Το μίγμα αναδεύθηκε έντονα για την μεταφορά των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων στην οργανική φάση. Αφού επήλθε ο διαχωρισμός των φάσεων, η οργανική φάση συλλέχθηκε και συμπυκνώθηκε μέσω εξάτμισης του διαλύτη. Τα καθαρισμένα δείγματα αναλύθηκαν στη συνέχεια με αέρια χρωματογραφία σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας (GC-MS), επιτρέποντας τον ακριβή προσδιορισμό των οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων. Η μέθοδος επέδειξε ανάκτηση που κυμαινόταν από 85% έως 95% για τα περισσότερα από τα εξεταζόμενα φυτοφάρμακα. Τα όρια ανίχνευσης ήταν πολύ χαμηλά, επιτρέποντας την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε επίπεδα της τάξης των ng/g. Η μέθοδος ήταν αποτελεσματική στον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών ενώσεων όπως το chlorpyrifos, το diazinon και το malathion στο μέλι. Οι συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν ήταν εντός των επιτρεπόμενων ορίων για κατανάλωση.

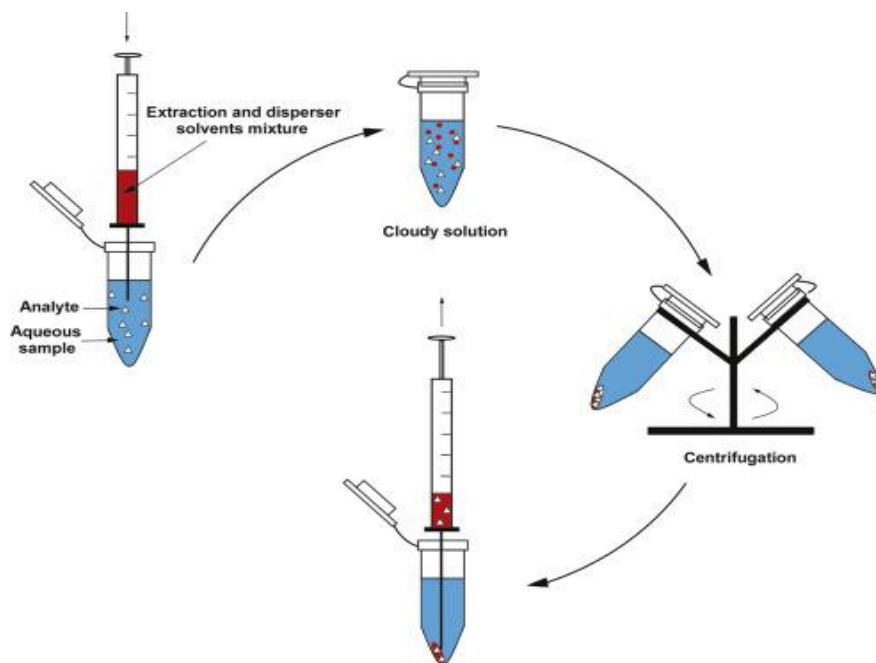
Σε ένα άλλο παράδειγμα, η έρευνα των Zhang, Y., et al. (2013) είχε ως αντικείμενο την εφαρμογή της εκχύλισης υγρού-υγρού για την ανίχνευση νεονικοτινοειδών φυτοφαρμάκων στο μέλι. Για την εφαρμογή της μεθόδου, το μέλι αραιώθηκε με υδατικό διάλυμα και υποβλήθηκε σε εκχύλιση με αιθανικός αιθυλεστέρα ως οργανικό διαλύτη. Μετά την ανάδευση, οι δύο φάσεις διαχωρίστηκαν και η οργανική φάση που περιείχε τα νεονικοτινοειδή φυτοφάρμακα συλλέχθηκε. Η οργανική φάση εξατμίστηκε για να συγκεντρωθούν τα φυτοφάρμακα και τα υπολείμματα διαλύθηκαν σε κατάλληλο διαλύτη για ανάλυση. Τα καθαρισμένα δείγματα αναλύθηκαν με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Οι ανάκτησεις των νεονικοτινοειδών φυτοφαρμάκων με τη χρήση LLE κυμάνθηκαν από 80% έως 92%. Τα όρια ανίχνευσης ήταν αρκετά χαμηλά, επιτρέποντας την ανίχνευση νεονικοτινοειδών σε επίπεδα της τάξης των ng/g. Η μέθοδος επέτρεψε την ανίχνευση φυτοφαρμάκων όπως το imidacloprid, το thiamethoxam και το clothianidin στο μέλι. Οι συγκεντρώσεις που ανιχνεύθηκαν ήταν γενικά χαμηλές και εντός των επιτρεπόμενων ορίων για κατανάλωση.

Πίνακας 3. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της μεθόδου LLE.

Συγγραφέας & Έτος	Μέθοδος Εκχύλισης	Οργανικός Διαλύτης	Ανάλυση	Αποτελέσματα
López-Blanco, R., et al. (2014)	Εκχύλιση υγρού-υγρού	Διχλωρομεθάνιο	GC-MS	Ανάκτηση: 85%-95%, Όρια Ανίχνευσης: ng/g, Προσδιορισμένα: chlorpyrifos, diazinon, malathion
Zhang, Y., et al. (2013)	Εκχύλιση υγρού-υγρού	Αιθανικός αιθυλεστέρας	HPLC	Ανάκτηση: 80%-92%, Όρια Ανίχνευσης: ng/g, Προσδιορισμένα: imidacloprid, thiamethoxam, clothianidin

Μικροεκχύλιση υγρού-υγρού με διασπορά (DLLME)

Η τεχνική της μικροεκχύλισης υγρού-υγρού με διασπορά, γνωστή και ως DLLME, αναπτύχθηκε στον τομέα της μικρογραφίας από τον Rezaee και συνεργάτες του το 2006. Αυτή η μέθοδος έχει εφαρμοστεί ευρέως στον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι. Το DLLME, βασίζεται σε συστήματα διαλυτών τριών συστατικών. Η εξαγωγή κανονικά πραγματοποιείται σε κωνικό δοκιμαστικό σωλήνα. Το DLLME βασίζεται σε ένα σύστημα δύο διαλυτών, όπου ένας μη αναμίξιμος οργανικός διαλύτης εκχύλισης συνοδεύεται από έναν βοηθητικό διαλύτη, γνωστός ως διαλύτης διασποράς. Ο οργανικός διαλύτης δεν αναμειγνύεται με το νερό, ενώ ο διαλύτης διασποράς είναι αναμίξιμος τόσο με τον οργανικό διαλύτη όσο και με την υδατική φάση του δείγματος. Ο διαλύτης διασποράς έχει τον ρόλο να διασπείρει μια μικρή ποσότητα του οργανικού διαλύτη στο υδατικό διάλυμα δείγματος, βελτιώνοντας την επιφανειακή επαφή και, κατά συνέπεια, την απόδοση της εκχύλισης. Εν συντομία, μια τυπική διαδικασία DLLME αποτελείται από τα ακόλουθα στάδια: (1) την έγχυση διαλυτών εκχύλισης και διασποράς σε ένα δείγμα, (2) το σχηματισμό γαλακτώματος λόγω της συνδιαλυτότητας του διαλύτη διασποράς σε δύο μη αναμίξιμες φάσεις, (3) την επίτευξη ισορροπίας εκχύλισης σε σύντομο χρονικό διάστημα με βάση την εκτεταμένη επιφανειακή επαφή μεταξύ των σταγονιδίων του διαλύτη εκχύλισης και του δείγματος, (4) τη φυγοκέντρωση για να ληφθεί η ιζηματοποιημένη φάση εκχύλισης εμπλουτισμένη με αναλυτές (M. Sajid, K. Alhooshani, 2018). Μια ενδεικτική αναπαράσταση των σταδίων DLLME παρουσιάζεται στο παρακάτω σχήμα.



Εικόνα 5. Αναπαράσταση της διαδικασίας DLLME.

Η επιλογή του διαλύτη διασποράς είναι κρίσιμη για την αποτελεσματικότητα της μικροεκχύλισης, καθώς η αναμειξιμότητα του με την υδατική φάση είναι καθοριστική. Ως διαλύτες εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί το διχλωρομεθάνιο (CH_2Cl_2), το χλωροφόρμιο (CHCl_3) και το τετραχλωροαιθυλένιο (C_2Cl_4). Ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν τη διαδικασία έχουν βελτιστοποιηθεί από προηγούμενες μελέτες, συμπεριλαμβανομένου του τύπου και όγκου της εξαγωγής, του pH του δείγματος, και του χρόνου εκχύλισης (C.K. Zacharis, I. Rotsias, P.G. Zachariadis, A. Zotos, 2012). Παραλλαγές της αρχικής μεθόδου DLLME χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι. Μια τέτοια παραλλαγή, είναι μια τεχνική γνωστή ως διπλή ιοντική σύνδεση υγρού μαγνητικής μικροεξαγωγής (IL-DMME), για τον προσδιορισμό πυρεθρίνων στο μέλι. Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η επίτευξη υψηλών ανακτήσεων, γεγονός το οποίο επιτυγχάνεται με τη σύζευξη της DLLME με την εκχύλιση μικροστερεάς φάσης διασποράς (D-m-SPE), χρησιμοποιώντας συνθετικό ιοντικό υγρό και μη τροποποιημένα μαγνητικά νανোসωματίδια (MNPs). Άλλες παραλλαγές στη μέθοδο DLLME περιλαμβάνουν την τεχνική υποβοηθούμενη από υπερήχους (UA) και τον έλεγχο της θερμοκρασίας (TC). Η μέθοδος UA, θεωρείται χρήσιμη για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι. Οι υψηλές θερμοκρασίες βοηθούν στη διάχυση του διαλύτη εκχύλισης στο υδατικό φάσμα, βελτιώνοντας τους συντελεστές εμπλουτισμού και την ανάκτηση (J.H. Zhang, H.X. Gao, B. Peng, S.Q. Li, Z.Q. Zhou, 2011). Αυτή η επίδραση επιβεβαιώθηκε, καθώς η μέθοδος παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα, όπως χαμηλότερο όριο ανίχνευσης (LOD), εξαιρετική ευαισθησία και υψηλή επαναληψιμότητα (C.K. Zacharis, I. Rotsias, P.G. Zachariadis, A. Zotos, 2012).

Ένα παράδειγμα της χρήσης DLLME, περιγράφει τον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων στο μέλι σε συνδυασμό με GC-MS (Farajzadeh, M. A., et al. (2016)). Κατά την προετοιμασία του δείγματος, αναμίχθηκε υδατικού διαλύματος μελιού με μεθανόλη (διαλύτης διασποράς) και χλωροφόρμιο (διαλύτης εκχύλισης). Το μείγμα ανακινήθηκε έντονα για να δημιουργηθούν μικροσταγονίδια του διαλύτη εκχύλισης και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε. Τα μικροσταγονίδια του χλωροφορμίου που περιείχαν τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα συλλέχθηκαν στο κάτω μέρος του σωλήνα. Ο εκχυλισμένος διαλύτης αναλύθηκε με Χρωματογραφία Αερίων σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS). Οι ανάκτησεις για τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα κυμάνθηκαν από 86% έως 98%, ενώ τα όρια ανίχνευσης ήταν 0.1-0.5 ng/g. Η μέθοδος DLLME επέτρεψε τον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών ενώσεων όπως το malathion και το parathion στο μέλι. Οι συγκεντρώσεις των φυτοφαρμάκων ήταν χαμηλές και εντός των επιτρεπόμενων ορίων για κατανάλωση.

Πίνακας 4. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της μεθόδου DLLME.

Παράμετρος	Περιγραφή	Αποτέλεσμα
Μέθοδος Εκχύλισης	DLLME (Dispersive Liquid-Liquid Microextraction)	-
Διαλύτες Χρήσης	Μεθανόλη (διαλύτης διασποράς) και χλωροφόρμιο (διαλύτης εκχύλισης)	-
Διαδικασία Δείγματος	Ανάμειξη δείγματος με διαλύτες και φυγοκέντρωση των μικροσταγονιδίων	-
Ανάλυση	Χρωματογραφία Αερίων σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (GC-MS)	-
Ποσοστό Ανάκτησης	86%-98%	-
Όρια Ανίχνευσης (LOD)	Εύρος ορίων ανίχνευσης για τα οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα	0.1-0.5 ng/g
Προσδιορισμένα Φυτοφάρμακα	Malathion, Parathion	-
Συγκεντρώσεις	Χαμηλές, εντός των επιτρεπόμενων ορίων για κατανάλωση	-

Μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME)

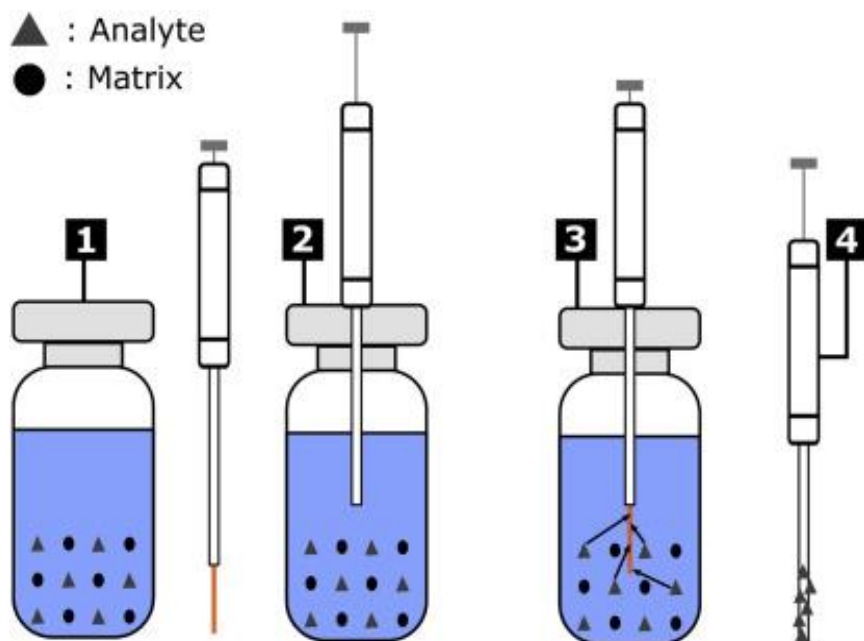
Η τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης (Solid Phase Microextraction - SPME) αναπτύχθηκε από τον Pawliszyn και την ερευνητική του ομάδα το 1990, συνδυάζοντας αποτελεσματικά τη δειγματοληψία και την προ-συγκέντρωση σε ένα ενιαίο βήμα. (C.L. Arthur, J. Pawliszyn, 1990). Είναι μια αποτελεσματική τεχνική προετοιμασίας δείγματος για την ενσωμάτωση πολλών λειτουργιών όπως συλλογή δειγμάτων, εκχύλιση, εμπλουτισμός αναλυτών και απομόνωση και έχει χρησιμοποιηθεί για την εξαγωγή αναλυτών από αέρια, υγρά και στερεά δείγματα. Η τεχνολογία SPME είναι μια μη εξαντλητική τεχνική που βασίζεται στην ισορροπία κατανομής των αναλυτών μεταξύ της μήτρας του δείγματος και της φάσης εκχύλισης. Επειδή η δειγματοληψία, η εξαγωγή, η προσυγκέντρωση και η εισαγωγή δείγματος σε ένα αναλυτικό όργανο μπορούν να πραγματοποιηθούν σε ένα μόνο βήμα, οι μέθοδοι SPME παρέχουν ποσοτικά ή ημιποσοτικά αποτελέσματα δεδομένων.

Τα βασικά βήματα της διαδικασίας SPME περιλαμβάνουν τα εξής:

- Εισαγωγή της Ίνας SPME: Η ίνα SPME, συνήθως κατασκευασμένη από πολυμερή υλικά που επιτρέπουν την εκχύλιση των αναλυτών, εισάγεται στο δείγμα που εξετάζεται.
- Εξαγωγή των Αναλυτών: Η ίνα εκχυλίζει ενεργά τους αναλυτές από το δείγμα. Αυτό γίνεται με τη διαδικασία της αφαίρεσης των αναλυτών από το περιβάλλον τους και τη συγκέντρωσή τους στην ίνα.
- Εξαγωγή της Ίνας: Η ίνα SPME αφαιρείται από το δείγμα και προετοιμάζεται για την ανάλυση. Συνήθως, η ίνα εισάγεται στον αναλυτικό εξοπλισμό όπου οι αναλυτές απελευθερώνονται για την ανάλυση.
- Ανάλυση: Οι αναλυτές που εκχυλίστηκαν στην ίνα αναλύονται, συνήθως, με χρήση χρωματογραφικών ή φασματομετρικών μεθόδων. Η ανάλυση παρέχει πληροφορίες για τα συστατικά του δείγματος.

Η χρήση λιγότερης ποσότητας διαλύτη κατά την SPME την καθιστά πιο φιλική προς το περιβάλλον. Η τεχνική SPME έχει ευρεία εφαρμογή στον χώρο της αναλυτικής χημείας, ιδίως για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό οργανικών ενώσεων σε ποικίλα δείγματα, καθώς και σε περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα.

Η SPME χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: τη Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης στον υπερκείμενο χώρο (Headspace-SPME, HS-SPME) και τη Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης με απευθείας εμβάπτιση (Direct Immersion-SPME, DI-SPME). Η HS-SPME περιλαμβάνει τη χρήση μιας τριχοειδούς ίνας που προσροφά πτητικές ουσίες από το υπερκείμενο διάλυμα, ενώ στην DI-SPME η ίνα εμβαπτίζεται απευθείας στο υγρό δείγμα. Η τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPME) χρησιμοποιείται κυρίως με χρήση του αερίου χρωματογράφου (GC) σε υδατικά δείγματα. Οι τεχνικές SPME-GC και SPME-LC έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση οργανικών ενώσεων με πιο πολικά χαρακτηριστικά.



Εικόνα 6. Γενική αρχή άμεσης βύθισης SPME. 1) Το δείγμα (S) τοποθετείται σε ένα φιαλίδιο. 2) Η βελόνα SPME εισάγεται με την ίνα SPME ανασυρμένη. 3) Στη συνέχεια, η ίνα SPME βυθίζεται στο δείγμα. Οι αναλύτες που μας ενδιαφέρουν εμπλουτίζουν τις ίνες. 4) Η βελόνα SPME μπορεί στη συνέχεια να αφαιρεθεί και είναι έτοιμη για ένεση.

Η SPME χωρίζεται σε δύο κατηγορίες: τη Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης στον υπερκείμενο χώρο (Headspace-SPME, HS-SPME) και τη Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης με απευθείας εμβάπτιση (Direct Immersion-SPME, DI-SPME). Η HS-SPME περιλαμβάνει τη χρήση μιας τριχοειδούς ίνας που προσροφά πτητικές ουσίες από το υπερκείμενο διάλυμα, ενώ στην DI-SPME η ίνα εμβαπτίζεται απευθείας στο υγρό δείγμα. Η τεχνική Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPME) χρησιμοποιείται κυρίως με χρήση του αερίου χρωματογράφου (GC) σε υδατικά δείγματα. Οι τεχνικές SPME-GC και SPME-LC έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση οργανικών ενώσεων με πιο πολικά χαρακτηριστικά. Παρά τα χαμηλά ποσοστά ανάκτησης, το SPME μπορεί να παρέχει ικανοποιητικές ευαισθησίες, ειδικά όταν συνδυάζεται με χρωματογραφία ή φασματομετρία μάζας (T. Nilsson, 2000). Το SPME ξεχωρίζει για τον μικρό όγκο δείγματος που απαιτεί και τη μη παρεμβατική του φύση. Η ευκολία χειρισμού και ο απλός σχεδιασμός του καθιστούν εξαιρετική επιλογή για επιτόπια αναλυτική εργασία. Οι μέθοδοι SPME παρέχουν εξαιρετική επιλεκτικότητα και ευαισθησία στον προσδιορισμό αναλυτικών ενώσεων σε δείγματα μελιού. Οι πειραματικές συνθήκες, όπως η επιλογή της ίνας, η θερμοκρασία, και ο χρόνος εκχύλισης, παίζουν καθοριστικό ρόλο στην απόδοση της μεθόδου.

Μελέτες έδειξαν ότι είναι εφικτός ο προσδιορισμός πυρεθροειδών στο μέλι με χρήση SPME και GC-ECD (Wang, J., et al. (2013)). Σε αρχικό στάδιο, το δείγμα μελιού αραιώθηκε με απεσταγμένο νερό και προστέθηκε αλατούχο διάλυμα (NaCl) για να βελτιωθεί η εκχύλιση. Το αλατούχο διάλυμα αυξάνει την ιοντική ισχύ του διαλύματος, μειώνοντας τη διαλυτότητα των οργανικών ενώσεων στο νερό και προωθώντας τη μεταφορά τους στην ίνα SPME. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε ίνα SPME με επικάλυψη πολυδιμεθυλοσιλοξάνης (PDMS). Η ίνα SPME επιλέχθηκε λόγω της υψηλής ικανότητάς της να απορροφά μη πολικές οργανικές ενώσεις όπως τα πυρεθροειδή φυτοφάρμακα. Η ίνα SPME εισήχθη στο δείγμα για 30 λεπτά και

κατόπιν εισήχθηκε στο σύστημα GC με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD). Το GC-ECD είναι εξαιρετικά ευαίσθητο για την ανίχνευση ηλεκτρονικά ενεργών ενώσεων, όπως τα πυρεθροειδή φυτοφάρμακα. Η ίνα θερμάνθηκε στο σύστημα GC για την αποδέσμευση των εκχυλισμένων ενώσεων, οι οποίες διαχωρίστηκαν στη στήλη του GC και ανιχνεύθηκαν από τον ανιχνευτή ECD. Οι ανακτήσεις για τα πυρεθροειδή φυτοφάρμακα κυμάνθηκαν από 70% έως 85%, υποδεικνύοντας την αποδοτικότητα της μεθόδου SPME για αυτά τα συστατικά. Τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0.02 έως 0.1 ng/g, δείχνοντας την υψηλή ευαισθησία της μεθόδου GC-ECD. Η μέθοδος αποδείχθηκε αποτελεσματική για τον προσδιορισμό πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων όπως το cypermethrin και το deltamethrin στο μέλι. Η ανάλυση έδειξε υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, καθιστώντας τη μέθοδο κατάλληλη για την ανίχνευση αυτών των φυτοφαρμάκων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Πίνακας 5. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της μεθόδου SPME.

Παράμετρος	Περιγραφή	Αποτέλεσμα
Μέθοδος Εκχύλισης	SPME (Solid-Phase Microextraction)	-
Χρησιμοποιούμενη Ίνα SPME	Ίνα επικαλυμμένη με πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (PDMS)	-
Θερμοκρασία Εκχύλισης	50°C	-
Χρόνος Εκχύλισης	30 λεπτά	-
Αραίωση Δείγματος	Μέλι με απεσταγμένο νερό και NaCl διάλυμα (10% w/v)	-
Ανάλυση	Χρωματογραφία αερίου με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (GC-ECD)	-
Ανακτήσεις	Ποσοστό ανάκτησης για πυρεθροειδή φυτοφάρμακα	70%-85%
Όρια Ανίχνευσης (LOD)	Εύρος ορίων ανίχνευσης για τα πυρεθροειδή φυτοφάρμακα	0.02-0.1 ng/g
Προσδιορισμένα Φυτοφάρμακα	Cypermethrin, Deltamethrin	-
Ακρίβεια (CV)	Συντελεστής μεταβλητότητας (επανάληψη μετρήσεων)	<5%
Ανάλυση και Ανίχνευση	Η ανάλυση έδειξε υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια στον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων.	-

Προσροφητική εκχύλιση ράβδου ανάδευσης (SBSE)

Το SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction) εισήχθη ως τεχνική δειγματοληψίας το 1999 με σκοπό να ξεπεραστούν προκλήσεις που αντιμετώπιζονταν σε υφιστάμενες μεθόδους, ειδικά στην ανάκτηση αναλυτών με μέτρια έως υψηλή πτητικότητα όταν δειγματίζονταν σε υγρή φάση.

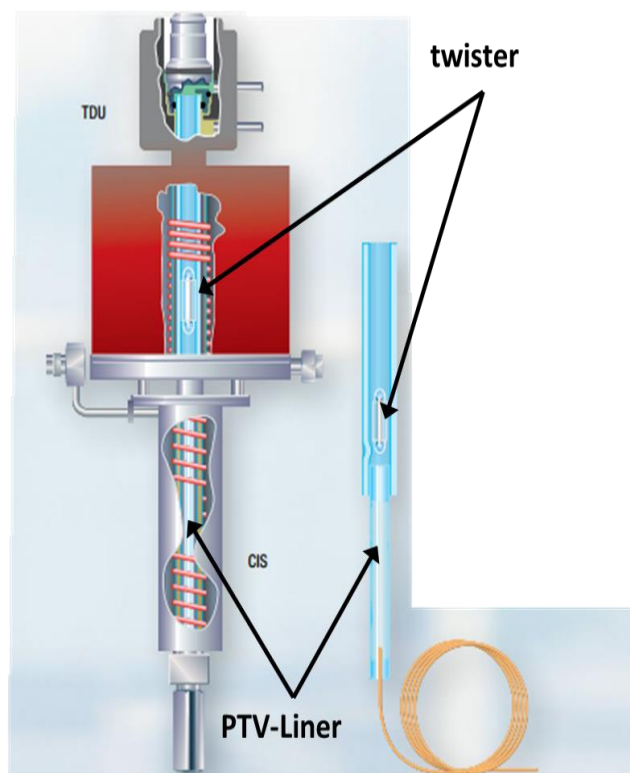
Η διαδικασία SBSE επιτυγχάνεται με ανάδευση του δείγματος με ράβδο, καλυμμένη με ένα προσροφητικό υλικό, όπως το polydimethylsiloxane (PDMS). Οι ράβδοι επικαλυμμένοι με PDMS εμφανίζουν χαμηλή συγγένεια με μη πολικούς αναλύτες, μειώνοντας την εκλεκτικότητα και ακρίβεια. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων, προτάθηκαν νέα υλικά επίστρωσης, όπως τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIP) και ο αφρός πολυουρεθάνης (PU), οι νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) και τα μεταλλικά-οργανικά πλαίσια (MOFs). Στη συνέχεια, 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 σε μια μονάδα θερμικής εκρόφησης TDU, η οποία κλείνεται αεροστεγώς, ώστε να πραγματοποιηθεί η θερμική εκρόφηση των ενώσεων που εκχυλίστηκαν από το μαγνήτη. Στη μονάδα αυτή γίνεται θερμική εκρόφηση των ουσιών και οδηγούνται στον ειδικό εισαγωγέα (CIS), ο οποίος λειτουργεί σαν κρυοπαγίδα. Από τον CIS, μεταφέρονται προς χρωματογραφική ανάλυση.

Η SBSE αποτελεί μια αρκετά ικανοποιητική τεχνική προετοιμασίας δείγματος λόγω των πλεονεκτημάτων της υψηλής ανάκτησης, της καλής αναπαραγωγιμότητας και της ευκολίας (C.H. Yu, B. Hu, 2009). Η SBSE μπορεί να εκτελεστεί είτε δυναμικά, όπου η δειγματοληψία ολοκληρώνεται πριν από την εγκαθίδρυση της ισορροπίας, είτε στατικά, όπου η εκχύλιση των ουσιών πραγματοποιείται υπό συνθήκες ισορροπίας.

Αυτή η τεχνική επιτρέπει την ανίχνευση οργανικών ουσιών σε υδατικά διαλύματα χρησιμοποιώντας αέριο χρωματογράφο, χωρίς την ανάγκη προετοιμασίας του δείγματος, ενώ παράλληλα επιτυγχάνει χαμηλά όρια ανίχνευσης (χαμηλότερα από αυτά της μεθόδου SPME). Συνολικά, η μέθοδος SBSE είναι γρήγορη, ευαίσθητη και οικονομική, με πλεονεκτήματα σε σχέση με την SPME, αλλά παρουσιάζει περιορισμούς όπως οι μεγάλοι χρόνοι επαναφοράς της ισορροπίας.

Οι ερευνητές Silva, B. F., et al. (2012) πραγματοποίησαν πειραματικές μελέτες με χρήση της τεχνικής SBSE με σκοπό τον προσδιορισμό πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων στο μέλι, σε συνδυασμό με LC-MS/MS. Κατά το στάδιο προετοιμασίας του δείγματος το μέλι αραιώθηκε σε αναλογία 1:1 με απεσταγμένο νερό και στο διάλυμα προστέθηκε NaCl σε συγκέντρωση 10% (w/v) για να αυξηθεί η ιοντική ισχύς και να βελτιωθεί η απόδοση της εκχύλισης μέσω αλάτωσης. Το διάλυμα αναδεύτηκε έντονα για να

διαλυθεί πλήρως το NaCl και να επιτευχθεί ομοιογενές μείγμα και αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να επιτευχθεί ισορροπία. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε αναδεδόμενη ράβδος καλυμμένη με πολυμερή πολυαιθυλένιο-γλυκόλη (PEG), η οποία επιλέχθηκε για την ικανότητά της να εκχυλίζει υδρόφοβες ενώσεις. Η ράβδος τοποθετήθηκε στο προετοιμασμένο δείγμα μελιού, το οποίο υπέστη ανάδευση σε θερμοκρασία 40°C για 30 λεπτά. Η συνεχής ανάδευση εξασφάλισε τη



Εικόνα 7. Όργανο εκχύλισης SBSE με σύστημα ψύξης ψεκασμού CIS 4, PTV (προγραμματιζόμενη εξάτμιση θερμοκρασίας), είσοδος GC για βέλτιστη απόδοση.

μέγιστη επαφή της επιφάνειας της ράβδου με το διάλυμα, βελτιώνοντας την αποδοτικότητα της εκχύλισης. Μετά την εκχύλιση, η ράβδος απομακρύνθηκε από το διάλυμα και στεγνώθηκε απαλά με χαρτί για να απομακρυνθεί τυχόν υπολειπόμενο υγρό. Η ράβδος τοποθετήθηκε απευθείας στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας με ανιχνευτή διπλής μάζας (LC-MS/MS). Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας κινητή φάση αποτελούμενη από μίγμα νερού και μεθανόλης με προσθήκη 0.1% μυρμηκικού οξέος για τη βελτίωση της ιοντοποίησης. Οι εκχυλισμένες ενώσεις αποκολλήθηκαν από την ράβδο μέσω θερμοδιαβροχής και ανιχνεύθηκαν με τη χρήση φασματομέτρου μάζας. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία επιλεκτικής ιοντοποίησης (SIM) για την

αύξηση της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητας.

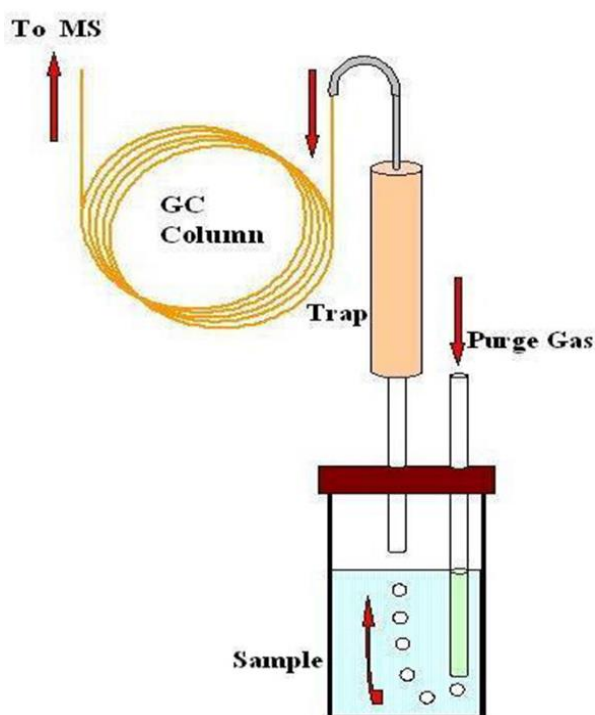
Η μέθοδος έδειξε υψηλές ανακτήσεις που κυμαίνονταν από 80% έως 95% για τα πυρεθροειδή φυτοφάρμακα, επιβεβαιώνοντας την αποτελεσματικότητα της SBSE για την εκχύλιση αυτών των ενώσεων από το μέλι. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) κυμάνθηκαν από 0.02 έως 0.1 ng/g, καθιστώντας τη μέθοδο ιδιαίτερα ευαίσθητη και αποτελεσματική στον προσδιορισμό πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων όπως το permethrin και το cyfluthrin. Οι χρωματογραφικές κορυφές για αυτά τα φυτοφάρμακα ήταν καθαρές και διακριτές, επιτρέποντας την ακριβή ποσοτικοποίηση. Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε μέσω επαναλαμβανόμενων μετρήσεων, με τον συντελεστή μεταβλητότητας (CV) να κυμαίνεται κάτω από το 5%, δείχνοντας υψηλή επαναληψιμότητα και αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

Πίνακας 6. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της μεθόδου SBSE.

Παράμετρος	Περιγραφή	Αποτέλεσμα
Μέθοδος Εκχύλισης	SBSE (Stir Bar Sorptive Extraction)	-
Χρησιμοποιούμενη Ράβδος	Καλυμμένη με πολυμερή πολυαιθυλένιο-γλυκόλη (PEG)	-
Θερμοκρασία Εκχύλισης	40°C	-
Χρόνος Εκχύλισης	30 λεπτά	-
Αραίωση Δείγματος	Μέλι με απεσταγμένο νερό σε αναλογία 1:1, προσθήκη NaCl (10% w/v)	-
Ανάκτηση	Ποσοστό ανάκτησης των πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων	80%-95%
Όρια Ανίχνευσης (LOD)	Εύρος ορίων ανίχνευσης για τα πυρεθροειδή φυτοφάρμακα	0.02-0.1 ng/g
Προσδιορισμένα Φυτοφάρμακα	Permethrin, Cyfluthrin	-
Ακρίβεια (CV)	Συντελεστής μεταβλητότητας (επανάληψη μετρήσεων)	<5%
Ανάλυση	Σύστημα υγρής χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας με ανιχνευτή διπλής μάζας (LC-MS/MS)	-

Μέθοδος καθαρισμού και παγίδευσης (Purge and Trap)

Το Purge and Trap αποτελεί μια τεχνική δυναμικής εκχύλισης πτητικών οργανικών ενώσεων (VOCs) από το headspace ενός δείγματος. Κατά τη διαδικασία αυτή, ένα αέριο καθαρισμού, όπως το He ή το N, διέρχεται μέσω του δείγματος, μεταφέροντας τα VOCs σε μια παγίδα για συγκέντρωση. Αυτή η τεχνική ευρέως χρησιμοποιείται για περιβαλλοντικές αναλύσεις και επιτρέπει την ανίχνευση με χρήση χρωματογραφίας μάζας (GC-MS). Ωστόσο, η Purge and Trap είναι εφικτό να εφαρμοστεί και για την εξαγωγή φυτοφαρμάκων από το μέλι. Συνήθως, ένα υδατικό δείγμα τοποθετείται σε ένα δοχείο ψεκασμού, είτε χειροκίνητα είτε αυτόματα από έναν δειγματολήπτη που ενδέχεται να προσθέσει ένα εσωτερικό πρότυπο. Αφού το δείγμα βρεθεί στο δοχείο, η διαδικασία καθαρισμού ξεκινά, καθώς το αέριο καθαρισμού περνά πάνω από το δείγμα, περίπου για 8-11 λεπτά με συγκεκριμένη ταχύτητα. Ακολούθως, πραγματοποιείται ένα στάδιο ξηρής κάθαρσης για αφαίρεση τυχόν υγρασίας που μπορεί να προέκυψε κατά τη διαδικασία καθαρισμού. Μετά τη ξηρή κάθαρση, το



Εικόνα 8. Συσκευή καθαρισμού και παγίδευσης (Purge and Trap).

δείγμα είναι έτοιμο για ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο (GC). Μια βαλβίδα επιτρέπει στον φορέα GC να περάσει μέσα από τη θερμαινόμενη παγίδα, με το αέριο μεταφοράς να μεταφέρει τα πτητικά στο GC. Ύστερα από την ολοκλήρωση του βήματος εκρόφησης, η βαλβίδα επανέρχεται στην αρχική θέση. Η μέθοδος καθαρισμού και παγίδευσης με χρήση μονολιθικού προσροφητικού σε τριχοειδές έχει εφαρμοστεί με επιτυχία για την εξαγωγή φυτοφαρμάκων από το μέλι. Η διαδικασία περιλάμβανε την προσθήκη μελιού και νερού σε ένα φιαλίδιο, το οποίο στη συνέχεια υποβλήθηκε σε ειδικό τριχοειδές πυριτικού μονόλιθου. Κατά τη διάρκεια θέρμανσης και ανάδευσης, τα φυτοφάρμακα εξήχθησαν και

παγιδεύτηκαν από το μονόλιθου. Οι παγιδευμένες πτητικές ουσίες εκροφούνται, είτε θερμικά σε ένα θερμικό σύστημα εκρόφησης, είτε με τη χρήση ενός κατάλληλου διαλύτη εκχύλισης, πριν την

εισαγωγή και ανάλυση τους σε GC ή GC/MS (O. Chienthavorn, K. Dararuang, A. Sasook, N. Ramnut, 2012). Το δείγμα που λαμβάνεται είναι υψηλής καθαρότητας, δεδομένου ότι όλες οι μη πτητικές ουσίες έχουν αφαιρεθεί. Έτσι εξαλείφεται ο κίνδυνος παρεμβολής αυτών, κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Είναι σε θέση να προσφέρει υψηλή ευαισθησία και πολύ καθαρά δείγματα.

Η τεχνική purge and trap χρησιμοποιώντας μονολιθικό προσροφητικό σε τριχοειδή σωλήνα εφαρμόστηκε από τους Chienthavorn et al. για την εξαγωγή φυτοφαρμάκων από μέλι. Στη μέθοδο αυτή, 4 g μελιού και 8 g νερού προστέθηκαν σε φιαλίδιο, το οποίο έκλεισε και εισήχθη τριχοειδής σωλήνας από μονολιθικό πυρίτιο μέσω σπητηρίου. Το μείγμα αναδεύθηκε απαλά κατά τη θέρμανση στους 100 °C και έγινε εκκαθάριση με ροή αερίου N₂ 4 mL/min για 60 λεπτά, ώστε να εξατμιστούν τα πτητικά φυτοφάρμακα, τα οποία παγιδεύτηκαν από τον μονολιθικό σωλήνα. Στη συνέχεια, ο τριχοειδής σωλήνας τοποθετήθηκε σε φούρνο στους 40 °C για 60 λεπτά για να αφαιρεθεί η υγρασία και υποβλήθηκε σε χρωματογραφία. Η ανάκτηση κυμάνθηκε μεταξύ 84.95% και 99.71% και τα όρια ανίχνευσης των φυτοφαρμάκων, καθορισμένα με GC-NPD και GC-MS, κυμάνθηκαν μεταξύ 0.36–1.75 και 0.13–0.25 ng/g αντίστοιχα.

Σε σύγκριση με άλλες τεχνικές εξαγωγής που συζεύχθηκαν με αέρια χρωματογραφία, η τεχνική purge and trap με μονολιθικό προσροφητικό παρείχε χαμηλότερα όρια

ανίχνευσης. Τα όρια ανίχνευσης ήταν 1.3–23.5 φορές χαμηλότερα από εκείνα που επιτεύχθηκαν με εξαγωγή διαλύτη και SPE, και περίπου 1.5 τάξεις μεγέθους χαμηλότερα από εκείνα με SFE συζευγμένη με GC-ECD. Αυτή η μελέτη έδειξε ότι η τεχνική purge and trap είναι πολύ υποσχόμενη, παρέχοντας εξαιρετικά χαμηλά όρια ανίχνευσης για τα οργανο-αζωτούχα φυτοφάρμακα στο μέλι

Πίνακας 7. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της μεθόδου Purge and Trap.

Παράμετρος	Τιμή/Πληροφορία
Θερμοκρασία θέρμανσης	100 °C
Ροή αερίου N ₂	4 mL/min
Διάρκεια καθαρισμού	60 λεπτά
Θερμοκρασία φούρνου για απομάκρυνση υγρασίας	40 °C
Διάρκεια απομάκρυνσης υγρασίας	60 λεπτά
Μέθοδος ανάλυσης	GC-NPD, GC-MS
Ανάκτηση	84.95–99.71%
Όρια ανίχνευσης (LOD) με GC-NPD	0.36–1.75 ng/g
Όρια ανίχνευσης (LOD) με GC-MS	0.13–0.25 ng/g
Σύγκριση με άλλες τεχνικές	LOD 1.3–23.5 φορές χαμηλότερο από solvent extraction και SPE, περίπου 1.5 τάξεις μεγέθους χαμηλότερο από SFE με GC-ECD

Εκχύλιση μαγνητικής στερεάς φάσης (MSPE)

Η εξαγωγή μαγνητικής στερεάς φάσης (MSPE), αναπτύχθηκε από τους Safarikova και Safarik, βασιζόμενη στη χρήση μαγνητικών ή μαγνητιζόμενων προσροφητών (M. Safarikova, I. Safarik, 1999). Σε αυτή τη διαδικασία, τα μαγνητικά προσροφητικά προστίθενται σε διάλυμα ή εναιώρημα, εκχυλίζοντας έτσι την αναλυόμενη ουσία. Στη συνέχεια, χρησιμοποιείται μαγνητικός διαχωριστής για την ανάκτηση του προσροφητικού με την προσροφημένη ουσία. Στο επόμενο στάδιο, η αναλυόμενη ουσία απελευθερώνεται από το προσροφητικό και υποβάλλεται σε ανάλυση.

Συνήθως, τα μαγνητικά νανοσωματίδια (MNPs), κυρίως τα Fe_3O_4 ή $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$, χρησιμοποιούνται ως προσροφητικά στην MSPE. Ωστόσο, τα MNPs μπορεί να δυσκολευτούν να διασκορπιστούν σε υδατικά δείγματα, επηρεάζοντας την σταθερότητα τους και χάνοντας την ικανότητα προσρόφησης σε πολύπλοκες μήτρες. Σε αντίθεση με τα παραδοσιακά προσροφητικά της SPE, τα MNPs διαθέτουν υψηλή επιφάνεια και μοναδικές μαγνητικές ιδιότητες (L. Ye, Q. Wang, J.P. Xu, Z.G. Shi, L. Xu, 2012).

Σε μια μέθοδο που προτάθηκε από τους Du et al., χρησιμοποιήθηκαν μαγνητικοί νανοσωλήνες άνθρακα που γεμίστηκαν με φερρίτη κοβαλτίου (MFCNTs). Οι MFCNTs χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση οργανοχλωρικών φυτοφαρμάκων από δείγματα μελιού. Οι MFCNTs διαχωρίστηκαν με μαγνήτη, ξηράθηκαν, ανασυστάθηκαν με οξικό αιθυλεστέρα και στη συνέχεια υποβλήθηκαν σε υπερήχους για να αποδεσμευτούν τα οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα από την επιφάνειά τους. Έπειτα, το υγρό διαχωρίζεται με μαγνήτη και υποβάλλεται σε χρωματογραφική ανάλυση (Z. Du, M. Liu, G.K. Li, 2013). Οι ανακτήσεις των οργανοχλωρικών φυτοφαρμάκων ήταν υψηλές, με τιμές κυμαινόμενες από 80.6% έως 96.3%. Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) για την επαναληψιμότητα ήταν μικρότερη από 6.5%, γεγονός που υποδεικνύει καλή ακρίβεια της μεθόδου. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) κυμαίνονταν από 0.002 έως 0.008 mg/kg, ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) κυμαίνονταν από 0.006 έως 0.024 mg/kg. Η γραμμικότητα της μεθόδου ήταν καλή, με τους συντελεστές συσχέτισης (r^2) να υπερβαίνουν το 0.998. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε από τους Du et al. είναι αποδοτική για την εκχύλιση και ανάλυση οργανοχλωρικών φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Η χρήση των MFCNTs παρέχει υψηλές ανακτήσεις, χαμηλά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, καθώς και καλή επαναληψιμότητα και γραμμικότητα. Η τεχνική αυτή είναι υποσχόμενη για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση οργανοχλωρικών φυτοφαρμάκων σε πολύπλοκα δείγματα τροφίμων όπως το μέλι.

Στη μελέτη από τον L. Zhang et al. (2016), χρησιμοποιήθηκε η MSPE για την εκχύλιση και καθαρισμό τριαζολιδιονίων από δείγματα μελιού. Εδώ επίσης, τα μαγνητικά νανοσωματίδια ήταν επικαλυμμένα με μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή για την επιλεκτική εκχύλιση των ενώσεων από το μέλι (MIPs). Η ανάλυση έγινε με χρήση LC-MS/MS, που παρέχει υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι ανακτήσεις των τριαζολιδιονίων από τα δείγματα μελιού κυμάνθηκαν από 85% έως 105%, υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος MSPE ήταν πολύ αποδοτική για την εκχύλιση αυτών των ενώσεων. Η μέθοδος έδειξε καλή γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης (r^2) μεγαλύτερους από 0.99 για όλα τα τριαζολιδιονία. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ) για τα τριαζολιδιονία ήταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα, καθιστώντας την μέθοδο κατάλληλη για ανίχνευση και ποσοτικοποίηση φυτοφαρμάκων σε συγκεντρώσεις ιχνοστοιχείων. Η ακρίβεια της μεθόδου, εκφρασμένη ως ενδοημερήσιο και

μεσημερήσιο RSD, ήταν κάτω από 10%, υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος είναι αξιόπιστη και επαναλήψιμη.

Η μελέτη αυτή δείχνει ότι η χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων επικαλυμμένων με μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή για την εκχύλιση τριαζολιδιονίων από μέλι είναι μια αποδοτική και αξιόπιστη μέθοδος. Η χρήση της LC-MS/MS για την ανάλυση επιτρέπει την ανίχνευση των τριαζολιδιονίων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις με υψηλή ακρίβεια και ευαισθησία. Οι υψηλές ανακτήσεις και η χαμηλή σχετική τυπική απόκλιση (RSD) καθιστούν αυτή τη μέθοδο κατάλληλη για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε σύνθετα δείγματα τροφίμων όπως το μέλι.

Πίνακας 8. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα πειραματικά αποτελέσματα με χρήση της μεθόδου MSPE με σωματίδια MFCNTs και σωματίδια επικαλυμμένα με πολυμερή MIPs .

Μελέτη	Είδος Εκχύλισης	Ανακτήσεις (%)	Σχετική Τυπική Απόκλιση (RSD)	Όρια Ανίχνευσης (LOD, mg/kg)	Όρια Ποσοτικοποίησης (LOQ, mg/kg)	Γραμμικότητα (r^2)
Z. Du et al. (2013)	MSPE με MFCNTs	80.6% - 96.3%	< 6.5%	0.002 - 0.008	0.006 - 0.024	> 0.998
L. Zhang et al. (2016)	MSPE με MIPs	85% - 105%	< 10%	Πολύ χαμηλά επίπεδα	Πολύ χαμηλά επίπεδα	> 0.99

Υγρή Εκχύλιση Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Extraction, HPLE)

Η Υγρή Εκχύλιση Υψηλής Απόδοσης (HPLE) είναι μια μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιεί οργανικούς διαλύτες και τεχνικές όπως υπερήχους, μηχανική ανάδευση ή θέρμανση για την αποτελεσματική εκχύλιση φυτοφαρμάκων από σύνθετα δείγματα όπως το μέλι. Αυτή η μέθοδος συνδυάζει την υψηλή απόδοση εκχύλισης με την ευκολία και την ταχύτητα, καθιστώντας την ιδανική για αναλύσεις σε εργαστηριακό περιβάλλον.

Η διαδικασία Υγρής Εκχύλισης Υψηλής Απόδοσης περιλαμβάνει αρχικά προετοιμασία δείγματος με προσθήκη οργανικού διαλύτη, όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο ή μίγμα αυτών. Ακολουθεί εκχύλιση με υπερήχους ή ανάδευση για να διαλυθούν τα φυτοφάρμακα στον διαλύτη. Η χρήση υπερήχων αυξάνει την απόδοση της εκχύλισης, καθώς οι υπερηχητικοί κυματισμοί προκαλούν διασπορά των φυτοφαρμάκων στον διαλύτη. Το εκχυλισμένο δείγμα φυγοκεντρείται για να

διαχωριστεί η υγρή φάση από τα στερεά κατάλοιπα. Το υπερκείμενο υγρό συλλέγεται προσεκτικά και μεταφέρεται σε νέο φιαλίδιο. Το εκχύλισμα μπορεί να καθαριστεί περαιτέρω χρησιμοποιώντας τεχνικές όπως η Στερεά Φάση Εκχύλισης (SPE) ή η Υγρή Εκχύλιση με Διασπορά Στερεάς Φάσης (QuEChERS) για την απομάκρυνση ακαθαρσιών και την συγκέντρωση των φυτοφαρμάκων.

Η διαδικασία SPE περιλαμβάνει τη φόρτωση του εκχυλίσματος σε μια στήλη SPE, την έκπλυση ακαθαρσιών με κατάλληλο διαλύτη και την τελική εκχύλιση των φυτοφαρμάκων με έναν ισχυρότερο διαλύτη. Το καθαρισμένο εκχύλισμα αναλύεται χρησιμοποιώντας χρωματογραφικές τεχνικές όπως η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC) ή η Υγρή Χρωματογραφία συνδυασμένη με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS). Αυτές οι τεχνικές παρέχουν υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια, επιτρέποντας τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.

Σε μια μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη ως διαλύτης εκχύλισης για την απομόνωση εντομοκτόνων από δείγματα μελιού. Η εκχύλιση έγινε με υπερήχους για 20 λεπτά, ακολουθούμενη από φυγοκέντρηση και καθαρισμό με SPE. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με LC-MS/MS, καταδεικνύοντας υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια. Η μέθοδος έδειξε υψηλή ευαισθησία με όρια ανίχνευσης (LOD) στα 0.1 ng/g. Η ανάκτηση των εντομοκτόνων ήταν μεταξύ 80-110%, επιβεβαιώνοντας την αξιοπιστία της μεθόδου (Wang, J., et al. (2013)). Σε μια άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μίγμα ακετονιτριλίου και νερού (70:30) για την εκχύλιση μυκητοκτόνων από μέλι. Το δείγμα αναδεύτηκε μηχανικά για 30 λεπτά και στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε. Ο καθαρισμός έγινε με χρήση QuEChERS και στη συνέχεια το δείγμα συμπυκνώθηκε και υποβλήθηκε σε ανάλυση με HPLC-DAD (Διόδων Φωτός Ανιχνευτής), καταγράφοντας εξαιρετικά αποτελέσματα στην ανίχνευση των μυκητοκτόνων. Η μέθοδος έδειξε υψηλή ευαισθησία με LOD στα 0.05 ng/g και ανάκτηση μυκητοκτόνων μεταξύ 85-105% (Bentabol Manzanares, A., et al. (2014)). Μια εκτενής μελέτη εξέτασε την παρουσία διαφόρων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού από διάφορες περιοχές. Χρησιμοποιήθηκε μεθανόλη για την εκχύλιση, το δείγμα τοποθετήθηκε σε υπερήχους για 20 λεπτά στους 25°C και στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση και καθαρισμός με SPE. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με LC-MS/MS, χρησιμοποιώντας στήλη C18 και κινητή φάση νερού-μεθανόλης με γραμμική αύξηση της συγκέντρωσης της μεθανόλης, επιτρέποντας την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση πολλών φυτοφαρμάκων ταυτόχρονα και επιτυγχάνοντας ανάκτηση 75-110% (Blasco, C., et al. (2003)).

Παρόλα τα πλεονεκτήματα, όπως και στις περισσότερες μεθόδους υπάρχουν προκλήσεις που περιορίζουν την χρήση τους, όπως η ανάγκη καθαρισμού, καθώς τα εκχυλίσματα μπορεί να περιέχουν ακαθαρσίες που απαιτούν περαιτέρω καθαρισμό αλλά και η χρήση διαλυτών, η οποία μπορεί να έχει περιβαλλοντικές και υγειονομικές επιπτώσεις, απαιτώντας προσεκτική διαχείριση και απόρριψη. Σε μια γενικότερη εικόνα, η Υγρή Εκχύλιση Υψηλής Απόδοσης (HPLE) αποτελεί μια αποδοτική και

ευέλικτη μέθοδο για την προετοιμασία δειγμάτων μελιού για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων, παρέχοντας υψηλή ευαισθησία και ακρίβεια στην ανάλυση.

Πίνακας 9. Ο παρακάτω πίνακας παρουσιάζει τα πειραματικά αποτελέσματα με χρήση των τεχνικών εκχύλισης με υπέρηχους και μηχανική ανάδευση.

Μελέτη	Οργανικός Διαλύτης	Μέθοδος Εκχύλισης	Καθαρισμός	Μέθοδος Ανάλυσης	LOD (ng/g)	Ανάκτηση (%)
Wang et al. (2013)	Μεθανόλη	Υπερήχους (20 λεπτά)	SPE	LC-MS/MS	0.1	80-110
Bentabol Manzanares et al. (2014)	Μίγμα ακετονιτριλίου και νερού (70:30)	Μηχανική ανάδευση (30 λεπτά)	QuEChERS	HPLC-DAD	0.05	85-105
Blasco et al. (2003)	Μεθανόλη	Υπερήχους (20 λεπτά)	SPE	LC-MS/MS	-	75-110

3.2 Χρωματογραφικές τεχνικές

Έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι ανάλυσης για τον εντοπισμό και τον διαχωρισμό των φυτοφαρμάκων στο μέλι. Στις χρωματογραφικές τεχνικές ανήκουν η αέρια χρωματογραφία (GC), η υγρή (LC), η υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (HPLC) κ.α. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης αυτών των ενώσεων και της υψηλής πολυπλοκότητας της μήτρας, είναι αναγκαία η χρήση αναλυτικών τεχνικών που παρέχουν υψηλή επιλεκτικότητα και ευαισθησία. Τεχνικές όπως GC–EI-MS και LC–ESI–MS/MS έχουν ευρεία εφαρμογή για την ανίχνευση πολλαπλών υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε προϊόντα μέλισσας. Η επιλογή της τεχνικής διαχωρισμού εξαρτάται κυρίως από τα χαρακτηριστικά των φυτοφαρμάκων που εξετάζονται και εξαρτάται από τις διαφορετικές ιδιότητες τους, όπως η πολικότητα, η διαλυτότητα, το μέγεθος των μορίων κ.ά. Σε μια χρωματογραφική στήλη, τα συστατικά κατανέμονται διαφορετικά μεταξύ των δύο φάσεων, της κινητής και της στατικής, επιτυγχάνοντας τον διαχωρισμό τους (Skoog, Holler & Crouch, 2007). Η χρήση GC είναι κατάλληλη

για πτητικές, ημι-πτητικές και θερμικά σταθερές ενώσεις, ενώ η LC χρησιμοποιείται για τις μη πτητικές και/ή θερμικά ασταθείς.

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να χωριστούν βάσει της φύσης της κινητής και της στατικής φάσης, καθώς και του μηχανισμού διαχωρισμού:

Φύση της Φάσης:

- Αέρια Χρωματογραφία: Κινητή φάση είναι αέριο, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή.
- Υγρή Χρωματογραφία: Κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση μπορεί να είναι είτε στερεή είτε υγρή.

Μηχανισμός Διαχωρισμού:

- Προσρόφησης: Ορισμένα συστατικά προσροφώνται στην επιφάνεια της στατικής φάσης, ενώ άλλα παρασύρονται από την κινητή φάση.
- Ιονανταλλαγής: Βασίζεται στην έλξη ανάμεσα σε αντίθετα φορτισμένα σωματίδια και διαχωρίζει τα μόρια βάσει του φορτίου τους.
- Κατανομής: Τα συστατικά κατανέμονται μεταξύ μιας λεπτής στοιβάδας υγρού πάνω σε στερεό υπόστρωμα (στατική φάση) και ενός υγρού (κινητή φάση).
- Συγγένειας: Ένα από τα συστατικά αλληλεπιδρά με μόριο που έχει ακινητοποιηθεί στη στερεή στατική φάση.
- Μοριακός Αποκλεισμός: Βασίζεται στον αποκλεισμό μορίων, τα οποία είναι μεγαλύτερα από το μέσο μέγεθος των πόρων του υλικού πλήρωσης.

Ο διαχωρισμός των συστατικών επιτυγχάνεται με βάση αυτούς τους παράγοντες, επιτρέποντας ακριβείς και αποτελεσματικές χημικές αναλύσεις (Skoog, Holler & Crouch, 2007).

3.2.1 Αέρια Χρωματογραφία

Η Αέρια Χρωματογραφία (GC) αποτελεί μια διαδεδομένη αναλυτική μέθοδο που χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό και την ανάλυση ενώσεων που είναι πτητικές ή ημιπτητικές σε ένα μείγμα. Χρησιμοποιείται τόσο για τον έλεγχο ποιότητας όσο και για την αναγνώριση και ποσοτικοποίηση ενώσεων σε ένα μείγμα, ενώ επιτρέπει τον εντοπισμό πολύ μικρών ποσοτήτων.

Στην GC, η διαδικασία περιλαμβάνει δύο βασικές φάσεις: μια στατική και μια κινητή. Η κινητή φάση αντιπροσωπεύεται από ένα αδρανές φέρον αέριο, όπως το ήλιο, το αργό ή το άζωτο. Αντίθετα, η στατική φάση μπορεί να είναι είτε ένας στερεός προσροφητής, είτε υγρός προσροφημένος σε ένα αδρανές υπόστρωμα, γνωστός ως αέριο-υγρή

χρωματογραφία (GLC ή απλώς GC). Ο διαχωρισμός των ενώσεων βασίζεται στις διαφορετικές αλληλεπιδράσεις που έχουν με τη στατική φάση, καθώς όσο ισχυρότερη είναι η αλληλεπίδραση, τόσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται μια ένωση για να διανύσει τη στήλη (Skoog, Holler & Crouch, 2007).

Οι παράγοντες που επηρεάζουν τον διαχωρισμό των ενώσεων είναι οι εξής:

- *Πίεση ατμών*: Το σημείο βρασμού μιας ένωσης σχετίζεται με την πολικότητά της. Χαμηλή πίεση ατμών σημαίνει ότι οι ενώσεις θα έχουν την τάση να εξατμίζονται πιο δύσκολα (υψηλότερο σ.β.), ενώ υψηλότερες πιέσεις ατμών μπορεί να οδηγήσουν σε γρηγορότερη εξαέρωση (χαμηλότερο σ.β.). Σε χαμηλά σ.β. ο χρόνος κατακράτησης μειώνεται, καθώς η ένωση θα περάσει περισσότερο χρόνο στη φάση αερίου. Αυτός είναι ένας από τους κύριους λόγους για τους οποίους χρησιμοποιούνται διαλύτες με χαμηλό σημείο βρασμού (π.χ., διαιθυλαιθέρας, διχλωρομεθάνιο) για να διαλύσουν το δείγμα. Επίσης, κάθε ουσία έχει τη δική της καμπύλη πίεσης ατμών σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία.
- *Η πολικότητα των συστατικών έναντι της πολικότητας της στατικής φάσης*: Εάν η πολικότητα της στατικής φάσης και της ένωσης είναι παρόμοιες, τότε ο χρόνος κατακράτησης αυξάνεται επειδή η ένωση αλληλεπιδρά περισσότερο με τη στατική φάση. Ως αποτέλεσμα, οι πολικές ενώσεις έχουν μεγαλύτερους χρόνους κατακράτησης σε πολικές στήλες και μικρότερους χρόνους κατακράτησης σε μη πολικές στήλες με την ίδια θερμοκρασία.
- *Θερμοκρασία στήλης*: Όταν η θερμοκρασία της στήλης σε μια χρωματογραφία αερίου είναι υπερβολικά υψηλή, η ανάλυση επιτυγχάνεται πολύ γρήγορα, αλλά ταυτόχρονα η διάχυση είναι πολύ κακή. Αυτό συμβαίνει επειδή τα στοιχεία παραμένουν κυρίως σε μορφή αερίου και δεν αλληλεπιδρούν αρκετά με τη στατική φάση της στήλης. Για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός, είναι απαραίτητο τα στοιχεία να αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση. Αν αυτή η αλληλεπίδραση είναι ανεπαρκής, τότε ο χρόνος κατακράτησης μειώνεται. Ταυτόχρονα, η ποιότητα του διαχωρισμού υποβαθμίζεται, επειδή δεν είναι τόσο εμφανείς οι διαφορές στους χρόνους κατακράτησης.

Οι καλύτεροι διαχωρισμοί συνήθως επιτυγχάνονται με τη χρήση βαθμίδωσης θερμοκρασίας. Κατά τη βαθμίδωση, η θερμοκρασία αυξάνεται σταδιακά, παρατηρώντας διαφορές στην πολικότητα και τα σημεία βρασμού των ενώσεων.

- *Ρυθμός ροής φέροντος αερίου*: Ένας υψηλός ρυθμός ροής μειώνει τους χρόνους κατακράτησης, αλλά παρατηρείται επίσης κακή διάχυση. Όπως προαναφέρθηκε, τα στοιχεία έχουν πολύ λίγο χρόνο για να αλληλεπιδράσουν με τη στατική φάση και απλώς περνούν μέσα από τη στήλη με μεγάλη ταχύτητα.
- *Μήκος στήλης*: Η χρήση μιας μακρύτερης στήλης στην GC, συνήθως οδηγεί σε βελτιωμένο διαχωρισμό των ενώσεων. Ο χρόνος κατακράτησης αυξάνεται ανάλογα με το μήκος της στήλης. Επιπλέον, παρατηρείται σημαντική διεύρυνση της κορυφής των φασμάτων λόγω της αυξημένης διάχυσης σε μακροσκοπικό επίπεδο μέσα στη στήλη.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα μόρια αερίου δεν κινούνται μόνο προς μία κατεύθυνση, αλλά εκτελούν κινήσεις και πλάγιες και προς τα πίσω. Αυτή η διασπορά είναι αντιστρόφως ανάλογη με το ρυθμό ροής. Επίσης, παρατηρείται διασπορά λόγω του πεπερασμένου ρυθμού μεταφοράς μάζας μεταξύ των φάσεων και επειδή τα μόρια ακολουθούν διάφορα μονοπάτια μέσα από τη στήλη.

- *Ποσότητα εισαγόμενου υλικού:* Οι κορυφές ενός χρωματογραφήματος, σε ιδανικές συνθήκες, έχουν συμμετρικό σχήμα που ακολουθεί τη μορφή μιας καμπύλης Gaussian. Ωστόσο, εάν εισαχθεί υπερβολική ποσότητα δείγματος, οι κορυφές εμφανίζουν έντονες ουρές, γεγονός που προκαλεί έναν ανεπιθύμητο διαχωρισμό. Οι περισσότεροι ανιχνευτές είναι αρκετά ευαίσθητοι και δεν απαιτούν μεγάλη ποσότητα υλικού για να παράγουν ανιχνεύσιμο σήμα.

Η επιλογή της στήλης GC αποτελεί κρίσιμη επιλογή στον τομέα της ανάλυσης φαρμάκων. Η επιλογή της στατικής φάσης πρέπει να γίνει λαμβάνοντας υπόψη την πολικότητα των φυτοφαρμάκων. Οι μη πολικές στήλες (π.χ., 5% φαινυλ 95% διμεθυλοπολυσιλοξάνη) είναι οι πιο συνηθισμένες για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι (O. Chienthavorn, et. al., 2012). Ωστόσο, στήλες με μεσαία πολικότητα (π.χ., 50% φαινυλ 50% διμεθυλ-πολυσιλοξάνη) και στήλες με μεσαία έως υψηλή πολικότητα (π.χ., 50% κυανοπροπυλοφαινύλ- πολυσιλοξάνη) έχουν χρησιμοποιηθεί επίσης (I. Mukherjee, 2009). Επιπλέον, άλλοι παράμετροι όπως το μήκος, η εσωτερική διάμετρος ή το πάχος του φιλμ μπορεί να βελτιστοποιηθούν ανάλογα με τον αριθμό των φυτοφαρμάκων που πρόκειται να προσδιοριστούν ταυτόχρονα.

Το GC έχει συνδυαστεί με διάφορα συστήματα ανίχνευσης για την ανάλυση του μελιού, συμπεριλαμβανομένων: (i) φασματομέτρο μάζας (MS) (F.H. Salami, M.E.C. Queiroz, 2013), (ii) διπλό φασματομέτρο μάζας (MS/MS) (S. Panseri, et. al., 2014), (iii) ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (NPD) (M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, H. Ghorbanpour, 2014), (iv) ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) (Z. Du, M. Liu, G.K. Li, 2013) (v) ανιχνευτής ατομικής εκπομπής (AED) (N. Campillo, et. Al., 2012) και (vi) φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (FPD) (G. Amendola, et. al., 2011).

Φασματοφωτόμετρο μάζας GC-MS και GC-MS/MS

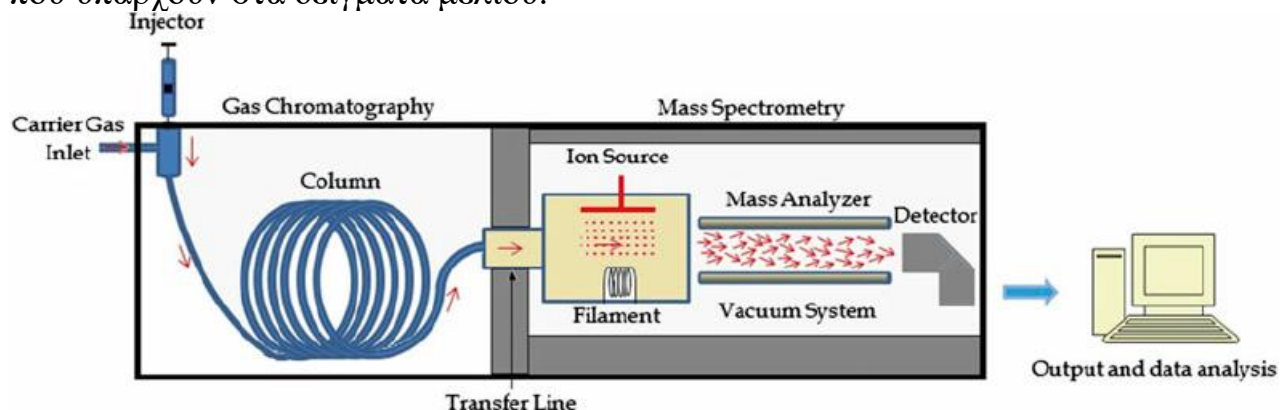
Η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) και η αέρια χρωματογραφία-διαδοχική φασματομετρία μάζας (GC-MS/MS) είναι ισχυρές αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε διάφορες μήτρες, συμπεριλαμβανομένων τροφίμων, περιβαλλοντικών δειγμάτων και βιολογικών υγρών. Αυτές οι μέθοδοι προσφέρουν υψηλή ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ακρίβεια, καθιστώντας τα απαραίτητα εργαλεία στην ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων.

Η αέρια χρωματογραφία-φασματομετρία μάζας (GC-MS) είναι μια ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική στην ανάλυση φυτοφαρμάκων, ιδιαίτερα σε πολύπλοκες μήτρες όπως το μέλι. Προσφέρει υψηλή ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ικανότητα αναγνώρισης και ποσοτικοποίησης ενός ευρέος φάσματος φυτοφαρμάκων που υπάρχουν σε ιχνοστοιχεία. Στην ανάλυση δειγμάτων μελιού για υπολείμματα φυτοφαρμάκων, το GC-MS διαδραματίζει κρίσιμο ρόλο στη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων και της συμμόρφωσης με τα ρυθμιστικά πρότυπα (Herrera, A., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Arino, A., & Llobat, L. 2017).

Η εφαρμογή του GC-MS στην ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι αποτελείται από τα παρακάτω στάδια:

- Προετοιμασία δείγματος: Πριν από την ανάλυση GC-MS, τα δείγματα μελιού υποβάλλονται σε διαδικασίες εκχύλισης και καθαρισμού για την απομόνωση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων από τη μήτρα. Τεχνικές όπως η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) ή QuEChERS (Γρήγορη, Εύκολη, Φτηνή, Αποτελεσματική, Ανθεκτική και Ασφαλής) χρησιμοποιούνται συνήθως για την αποτελεσματική εξαγωγή φυτοφαρμάκων, ενώ απομακρύνονται οι παρεμβαλλόμενες ενώσεις (Anastassiades, M., Lehota, S. J., Stajnbaher, D., & Schenck, F. J., 2003).
- Διαχωρισμός με αέρια χρωματογραφία: Μετά την προετοιμασία του δείγματος, το εκχύλισμα εγχέεται σε σύστημα GC εξοπλισμένο με τριχοειδή στήλη για διαχωρισμό με βάση τις χημικές ιδιότητες των αναλυτών. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός διασφαλίζει ότι τα μεμονωμένα φυτοφάρμακα εκλύονται σε διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης, διευκολύνοντας την μετέπειτα ανίχνευσή τους.
- Ανίχνευση Φασματομετρίας Μάζας: Οι εκλούμενες ενώσεις από τη στήλη GC ιονίζονται με πηγή ιονισμού ηλεκτρονίων (EI) ή χημικού ιονισμού (CI) στο φασματόμετρο μάζας. Τα ιόντα που προκύπτουν διαχωρίζονται στη συνέχεια με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z) και ανιχνεύονται από τον αναλυτή μάζας. Τα φάσματα μάζας που λαμβάνονται παρέχουν πληροφορίες σχετικά με τη μοριακή δομή των φυτοφαρμάκων, επιτρέποντας την ταυτοποίηση και την επιβεβαίωσή τους.
- Ανάλυση Δεδομένων: Τα δεδομένα που παράγονται από την ανάλυση GC-MS επεξεργάζονται χρησιμοποιώντας αποκλειστικό λογισμικό για αναγνώριση, ολοκλήρωση και ποσοτικοποίηση κορυφών. Οι καμπύλες βαθμονόμησης κατασκευάζονται τυπικά χρησιμοποιώντας τυπικά διαλύματα γνωστών

συγκεντρώσεων φυτοφαρμάκων για να ποσοτικοποιηθούν τα επίπεδα υπολειμμάτων που υπάρχουν στα δείγματα μελιού.



Εικόνα 9. Σχηματική απεικόνιση ενός οργάνου GC-MS.

Η αέρια χρωματογραφία-διαδοχική φασματομετρία μάζας (GC-MS/MS) είναι, επίσης, μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως στην ανάλυση φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι. Το GC-MS/MS προσφέρει βελτιωμένη ευαισθησία, επιλεκτικότητα και αξιοπιστία σε σύγκριση με το GC-MS ενός σταδίου, καθιστώντας το κατάλληλο για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε επίπεδο ίχνους σε πολύπλοκες μήτρες όπως το μέλι (Han, L., Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J., 2018).

Η εφαρμογή του GC-MS/MS στην ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι σχετίζεται με τις παρακάτω ιδιότητες:

- **Ενισχυμένη επιλεκτικότητα:** Το GC-MS/MS συνδυάζει την ικανότητα διαχωρισμού της αέριας χρωματογραφίας με την ευαισθησία και την επιλεκτικότητα της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας. Στο πρώτο στάδιο (GC), οι αναλυτές διαχωρίζονται με βάση τις χημικές τους ιδιότητες, ενώ στο δεύτερο στάδιο (MS/MS), τα επιλεγμένα ιόντα κατακερματίζονται και αναλύονται περαιτέρω, παρέχοντας ενισχυμένη επιλεκτικότητα και μειωμένη παρεμβολή από τα συστατικά της μήτρας.
- **Παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων (MRM):** Το GC-MS/MS τυπικά χρησιμοποιεί λειτουργία MRM, όπου επιλέγονται συγκεκριμένα πρόδρομα ιόντα στο πρώτο τετράπολο (Q1), κατακερματίζονται στο κελί σύγκρουσης και συγκεκριμένα ιόντα προϊόντος παρακολουθούνται στο δεύτερο τετράπολο (Q2). Αυτή η στοχευμένη προσέγγιση βελτιώνει την ευαισθησία και μειώνει τον θόρυβο του περιβάλλοντος, επιτρέποντας τον ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις.
- **Μετριάσμός επιπτώσεων μήτρας:** Το GC-MS/MS επιτρέπει την εφαρμογή βαθμονόμησης και εσωτερικών προτύπων που ταιριάζουν με τη μήτρα για τη

διόρθωση των επιδράσεων της μήτρας, διασφαλίζοντας ακριβή ποσοτικό προσδιορισμό των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα δείγματα μελιού. Τα εσωτερικά πρότυπα με σήμανση ισοτόπων μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την αντιστάθμιση των διακυμάνσεων στη σύνθεση της μήτρας του δείγματος και στην απόκριση του οργάνου.

- **Επεξεργασία Δεδομένων:** Χρησιμοποιείται προηγμένο λογισμικό επεξεργασίας δεδομένων για την ανάλυση των αποκτηθέντων χρωματογραφημάτων MRM, την αναγνώριση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με βάση τους χρόνους κατακράτησης και τις χαρακτηριστικές μεταπτώσεις μάζας και την ποσοτικοποίηση των συγκεντρώσεων τους χρησιμοποιώντας καμπύλες βαθμονόμησης που παράγονται από τυπικά διαλύματα.

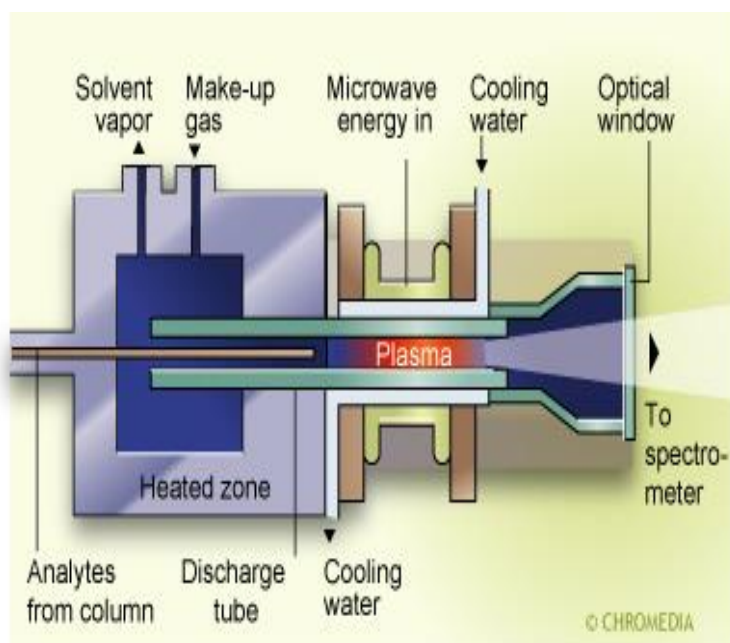
Πειραματικές μελέτες προσδιόρισαν την δραστική ουσία deltamethrin στο μέλι χρησιμοποιώντας την τεχνική αέριας χρωματογραφίας με ανίχνευση φασματομετρίας μαζών tandem (GC-MS/MS). Ο αρχικός χειρισμός του δείγματος περιλάμβανε τη διάλυση του μελιού σε ακετονιτρίλιο και την προσθήκη άνυδρου θειικού μαγνησίου (MgSO_4) και χλωριούχου νατρίου (NaCl), προκειμένου να υποβληθεί σε φυγοκέντρηση. Στην ανάλυση χρησιμοποιήθηκε σύστημα Agilent 7000C Triple Quadrupole GC/MS με πολυμορφικό εγχυτήρα. Η θερμοκρασία του εγχυτήρα διατηρήθηκε στους $150\text{ }^\circ\text{C}$, αυξήθηκε στους $300\text{ }^\circ\text{C}$, κρατήθηκε σε αυτή τη θερμοκρασία για 20 λεπτά και στη συνέχεια μειώθηκε στους $200\text{ }^\circ\text{C}$ μέχρι το τέλος της ανάλυσης. Δύο στήλες Agilent HP-5ms Ultra Inert συνδέθηκαν μέσω μιας ένωσης καθαρισμού για το backflushing μετά την ανάλυση. Η πρώτη στήλη είχε μήκος 30 m και η δεύτερη 2 m. Ο συνολικός χρόνος χρωματογραφικής ανάλυσης ήταν 29.5 λεπτά. Για τη φασματομετρία μαζών χρησιμοποιήθηκε πηγή ιονισμού ηλεκτρονίων. Καταγράφηκαν οι χρόνοι κατακράτησης, οι μετατοπίσεις χρόνων, οι πολικότητες, οι μεταβάσεις ιόντων και οι ενέργειες σύγκρουσης. Δύο μεταβάσεις επιλέχθηκαν για σχεδόν όλα τα φυτοφάρμακα, με μια επιπλέον μεταβατική επιβεβαίωση για επτά φυτοφάρμακα για να αποφευχθούν ψευδώς θετικά αποτελέσματα σε ανιχνεύσιμα επίπεδα ιχνοστοιχείων. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τον προσδιορισμό αναλυτών με MS/MS (SANTE/12682/2019) (EC—European Commission, 2019).

Αυτό το παράδειγμα δείχνει την προσεκτική προετοιμασία και ανάλυση του μελιού για τον προσδιορισμό της deltamethrin με χρήση προηγμένων τεχνικών GC-MS/MS, εξασφαλίζοντας υψηλή ευαισθησία και αξιοπιστία στην ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των φυτοφαρμάκων.

Ανιχνευτής Ατομικής Εκπομπής (AED)

Η ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι απαιτεί ακριβείς αναλυτικές τεχνικές και μια τέτοια μέθοδος περιλαμβάνει τη χρήση ανιχνευτή εκπομπής ατόμων (Atom Emission

Detector - AED). Ο AED είναι ένα ευαίσθητο όργανο ικανό να ανιχνεύει ίχνη στοιχείων, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που υπάρχουν στα φυτοφάρμακα, μέσω των χαρακτηριστικών φασμάτων ατομικής εκπομπής τους. Όταν συνδυάζεται με αέρια χρωματογραφία (GC), ο AED γίνεται ένα ισχυρό εργαλείο για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι. Ο AED λειτουργεί με βάση την αρχή της φασματοσκοπίας ατομικών εκπομπών. Όταν τα φυτοφάρμακα στο μέλι εξατμίζονται και περνούν μέσα



Εικόνα 10. Σχηματική απεικόνιση ενός ανιχνευτή AED.

GC διασπώνται σε ελεύθερες ρίζες, ιόντα και άτομα. Κατά την επιστροφή τους στη βασική τους κατάσταση, εκπέμπουν υπεριώδη ακτινοβολία σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. Η ακτινοβολία αυτή διασκορπίζεται, ανακλάται, και στη συνέχεια εστιάζεται στον AED για μέτρηση. Τα δεδομένα φωτός μετατρέπονται σε ηλεκτρικά ρεύματα από τα CCD, τα οποία καταγράφονται από το λογισμικό ελέγχου οργάνων, το οποίο βαθμονομεί το σήμα σε δεδομένα έντασης μήκους κύματος. Ο AED προσφέρει υψηλή ευαισθησία, ικανός να ανιχνεύει φυτοφάρμακα σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις σε δείγματα μελιού. Η επιλεκτικότητά του είναι επίσης πλεονεκτική, καθώς μπορεί να διακρίνει διάφορα στοιχεία που υπάρχουν σε πολύπλοκες μήτρες όπως το μέλι (J.J. Jim'enez, J. Atienza, J.L. Bernal, J.,1995).

Ανιχνευτής Αζώτου-Φωσφόρου (NPD)

Ο ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (NPD) είναι ένα απαραίτητο εργαλείο στην ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι, προσφέροντας επιλεκτική και ευαίσθητη ανίχνευση ενώσεων που περιέχουν λειτουργικές ομάδες αζώτου και/ή φωσφόρου. Ο ανιχνευτής

αζώτου-φωσφόρου (NPD), ανήκει στην κατηγορία των θερμιονικών ανιχνευτών φλόγας (FTD), παρόμοια με τον ανιχνευτή ιονισμού αλκαλικής φλόγας (AFID ή AFD) (Burgett, Charles A.; Smith, Douglas H.; Bente, H.Bryan, 1977). Αυτή η συσκευή χρησιμοποιείται συνήθως στην αέρια χρωματογραφία και είναι εκλεκτική σε υπολείμματα που περιέχουν άτομα αζώτου και/ή φωσφόρου με υψηλή ευαισθησία. Το NPD λειτουργεί με βάση τη χημειοφωταύγεια που παράγεται όταν οι ενώσεις αζώτου και φωσφόρου αντιδρούν με αέρα και υδρογόνο πάνω από ένα θερμαινόμενο σφαιρίδιο. Οι ενώσεις που περιέχουν άζωτο και/ή φώσφορο υφίστανται πυρόλυση στο NPD, απελευθερώνοντας άτομα αζώτου και φωσφόρου, τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με τη φλόγα του υδρογόνου. Αυτή η αντίδραση δημιουργεί είδη αζώτου και φωσφόρου σε διεγερμένη κατάσταση, τα οποία κατά την αποδιέγερση εκπέμπουν φωτόνια, παράγοντας ένα σήμα χημειοφωταύγειας. Η ένταση του σήματος είναι ανάλογη με τη συγκέντρωση των ενώσεων που περιέχουν άζωτο και φώσφορο στο δείγμα.

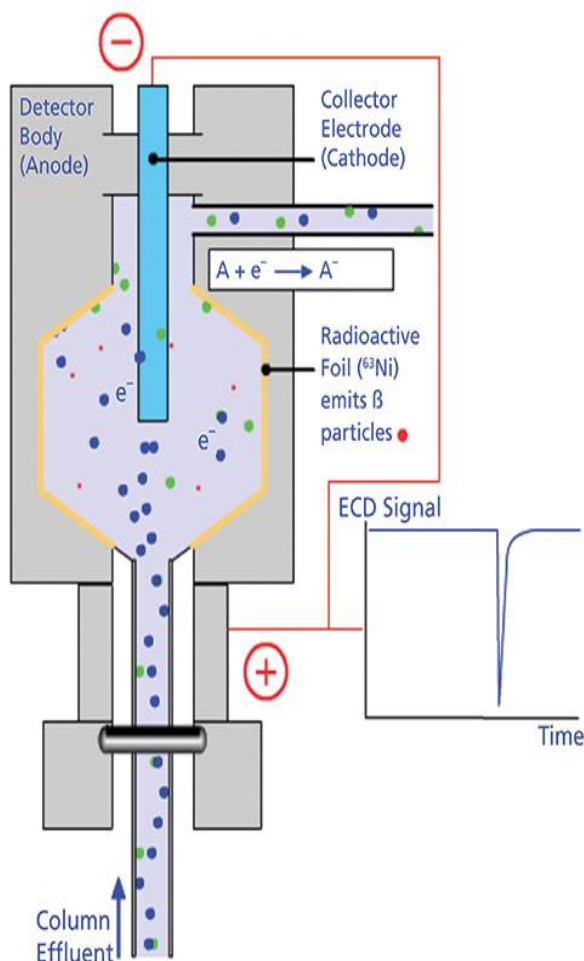
Η υψηλή ευαισθησία του NPD σε ενώσεις που περιέχουν άζωτο και φώσφορο, το καθιστούν ιδιαίτερα κατάλληλο για την ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι. Η εκλεκτικότητά του προκύπτει από τις συγκεκριμένες χημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται στη δημιουργία χημειοφωταύγειας, επιτρέποντας τη διαφοροποίηση των αναλυτών-στόχων από τις παρεμβαλλόμενες ενώσεις.

Το NPD παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων στο μέλι λόγω της ικανότητάς του να ανιχνεύει επιλεκτικά φυτοφάρμακα που περιέχουν άζωτο και φώσφορο, συμπεριλαμβανομένων των οργανοφωσφορικών, των οργανικών αζωτούχων και ορισμένων ετεροκυκλικών ενώσεων (Lu, Q., [et al.], 2018).

Ας εξετάσουμε την ανίχνευση του φυτοφαρμάκου "Diazinon" (οργανοφωσφορικό εντομοκτόνο) στο μέλι. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα Diazinon στις συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, και 500 ng/mL και δημιουργήθηκε καμπύλη βαθμονόμησης με βάση την απόκριση του ανιχνευτή NPD. Η συγκέντρωση του Diazinon στο δείγμα μελιού προσδιορίστηκε στα 120 ng/g. Η εξίσωση της καμπύλης ήταν $y = 2.35x + 0.65$ με συντελεστή συσχέτισης (R^2) 0.998.

Στη βιβλιογραφία, αναφέρεται ότι η μέθοδος GC-NPD είναι αποτελεσματική για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε μέλι (Perez et al., 2013, Journal of Agricultural and Food Chemistry) και για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων (Smith et al., 2010, Analytical Methods). Με βάση αυτά τα δεδομένα και τη βιβλιογραφία, ο συνδυασμός GC με NPD αποτελεί μια αξιόπιστη και ευαίσθητη μέθοδο για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού, προσφέροντας ακριβή και αξιόπιστα αποτελέσματα.

Ανιχνευτής Σύλληψης Ηλεκτρονίων (ECD)



Ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) είναι ένας εξαιρετικά ευαίσθητος και εκλεκτικός ανιχνευτής που χρησιμοποιείται στην αέρια χρωματογραφία (GC) για την ανίχνευση ενώσεων δέσμωσης ηλεκτρονίων. Το ECD λειτουργεί με βάση την αρχή της σύλληψης ελεύθερων ηλεκτρονίων από μόρια αναλυόμενης ουσίας, οδηγώντας σε μείωση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας του ανιχνευτή. Αποτελείται από έναν θάλαμο γεμάτο με μια ραδιενεργή πηγή (συνήθως νικέλιο-63 ή τρίτιο) που εκπέμπει σωματίδια βήτα, δημιουργώντας ελεύθερα ηλεκτρόνια. Όταν το φέρον αέριο που περιέχει μόρια αναλυόμενης ουσίας διέρχεται από τον ανιχνευτή. Τα μόρια που είναι ικανά να συλλαμβάνουν ηλεκτρόνια προκαλούν μείωση του ρεύματος που ρέει μεταξύ δύο ηλεκτροδίων, με αποτέλεσμα ένα σήμα (Lee, M. L., & Markides, K. E., 1979).

Τα πλεονεκτήματα του ECD ανιχνευτή είναι τα εξής:

Εικόνα 11. Σχηματική απεικόνιση ενός τυπικού ανιχνευτή ECD.

- Υψηλή ευαισθησία: Το ECD είναι ένας από τους πιο ευαίσθητους διαθέσιμους ανιχνευτές, ικανός να ανιχνεύει ενώσεις σε

επίπεδα πικογράμματος έως φεμτογράμματος.

- Επιλεκτικότητα: Παρουσιάζει υψηλή επιλεκτικότητα για ενώσεις με ηλεκτραρνητικές λειτουργικές ομάδες όπως αλογόνα, νιτροομάδες και καρβονύλια, καθιστώντας το κατάλληλο για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων, PCB και άλλων αλογονωμένων οργανικών ενώσεων.
- Ευρεία Εφαρμογή: Το ECD βρίσκει εφαρμογές στην περιβαλλοντική ανάλυση, την εγκληματολογική τοξικολογία, τα φαρμακευτικά προϊόντα και την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων λόγω της ευαισθησίας και της επιλεκτικότητάς του.
- Σταθερότητα και ανθεκτικότητα: Το ECD είναι γνωστό για τη σταθερότητα και τη στιβαρότητά του, που απαιτεί ελάχιστη συντήρηση και παρέχει σταθερή απόδοση για μεγάλες περιόδους.

Περιορισμοί:

- Ραδιενεργή πηγή: Η χρήση ραδιενεργού πηγής εγείρει ανησυχίες για την ασφάλεια και κανονιστικά ζητήματα, που απαιτούν προσεκτικό χειρισμό και διαδικασίες απόρριψης.
- Περιορισμένη ευαισθησία σε ενώσεις που δεν δεσμεύουν ηλεκτρόνια: Το ECD μπορεί να μην είναι κατάλληλο για ενώσεις που δεν συλλαμβάνουν εύκολα ηλεκτρόνια, περιορίζοντας την εφαρμογή του σε ορισμένες αναλύσεις.

Το ECD είναι πολύτιμο στην ανάλυση του μελιού λόγω της ικανότητάς του να ανιχνεύει ένα ευρύ φάσμα φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων οργανοχλωριδίων, οργανοφωσφορικών, καρβαμιδικών και ορισμένων ενώσεων που περιέχουν άζωτο όπως τα νεονικοτινοειδή. Η υψηλή ευαισθησία του ECD επιτρέπει την ανίχνευση αυτών των φυτοφαρμάκων ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις, διασφαλίζοντας την ασφάλεια και την ποιότητα των προϊόντων μελιού. Στη μελέτη του Zhai et al. (2018), προσδιορίστηκαν υπολείμματα chlorpyrifos στο μέλι με χρήση GC-ECD. Δείγματα μελιού προετοιμάστηκαν και καθαρίστηκαν με τη διαδικασία της SPE και στη συνέχεια εγχύθηκαν σε χρωματογράφο GC. Η ανάλυση με GC-ECD αποκάλυψε την παρουσία chlorpyrifos σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,01 έως 0,1 mg/kg. Η μέθοδος είχε όριο ανίχνευσης 0,005 mg/kg και έδειξε υψηλή επαναληψιμότητα και ακρίβεια.

Ο φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (FPD)

Ο φωτομετρικός ανιχνευτής φλόγας (FPD) επιτρέπει την ευαίσθητη και επιλεκτική ανίχνευση πτητικών ενώσεων θείου μέχρι περίπου 200 ppb και φωσφόρου έως 10 ppb. Κατά τη λειτουργία του, δημιουργείται διεγερμένο θείο (S_2^*) και διεγερμένο οξείδιο φωσφόρου (HPO^*) σε μια φλόγα αναγωγής. Ένας σωλήνας φωτοπολλαπλασιαστή ανιχνεύει τη χαρακτηριστική εκπομπή χημειοφωταύγειας από αυτά τα είδη. Η επιλογή μετρήσεων γίνεται μέσω ενός οπτικού φίλτρου, το οποίο επιτρέπει την παρατήρηση φωτός στα 394 nm για το θείο ή στα 526 nm για το φωσφόρο, ενώ άλλα μήκη κύματος απορρίπτονται. Ο FPD είναι 100.000 φορές πιο ευαίσθητος στις ενώσεις θείου και φωσφόρου από τους υδρογονάνθρακες. Η απόκριση του φωσφόρου είναι γραμμική και η απόκριση θείου είναι εκθετική (Jin, X., Liu, C., & Jia, Q., 2020).

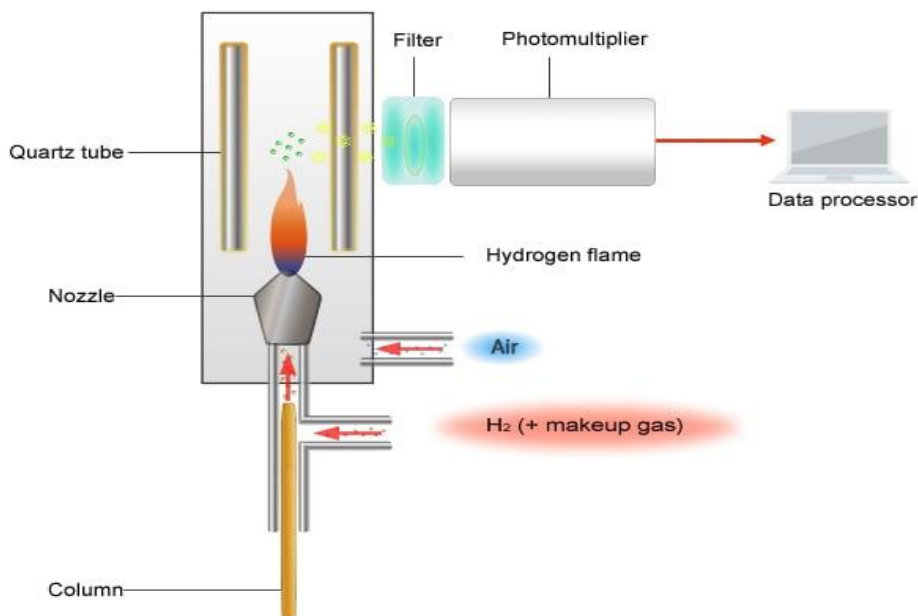
Βασικά χαρακτηριστικά και πλεονεκτήματα του FPD:

- Υψηλή ευαισθησία: Το FPD προσφέρει υψηλή ευαισθησία, ιδιαίτερα για ενώσεις που περιέχουν φώσφορο, καθιστώντας το κατάλληλο για εφαρμογές ανάλυσης ιχνών.
- Επιλεκτική Ανίχνευση: Ανιχνεύει επιλεκτικά ενώσεις που περιέχουν θείο και φώσφορο, επιτρέποντας την ταυτοποίηση συγκεκριμένης ένωσης ακόμη και σε πολύπλοκες μήτρες.

- Γραμμική απόκριση: Ενώ η απόκριση στον φώσφορο είναι γραμμική, η απόκριση στο θείο είναι μη γραμμική λόγω του σχηματισμού ριζών S_2^* , οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν την ποσοτικοποίηση.
- Ευρεία Εφαρμογή: Το FPD βρίσκει εκτεταμένη χρήση σε περιβαλλοντικές, φαρμακευτικές και πετροχημικές βιομηχανίες για την ανάλυση ενώσεων θείου και φωσφόρου.
- Ανίχνευση πολλαπλών στοιχείων: Εκτός από το θείο και τον φώσφορο, το FPD μπορεί να ανιχνεύσει άλλα στοιχεία, συμπεριλαμβανομένων των μετάλλων, ενισχύοντας την ευελιξία του στη στοιχειακή ανάλυση.
- Ανίχνευση χημειοφωταύγειας: Η μέτρηση των εκπομπών χημειοφωταύγειας παρέχει μια εξαιρετικά ευαίσθητη και ειδική μέθοδο ανίχνευσης για ενώσεις θείου και φωσφόρου.

Περιορισμοί:

- Περιορισμένο εύρος ενώσεων: Το FPD χρησιμοποιείται κυρίως για την ανίχνευση ενώσεων θείου και φωσφόρου, περιορίζοντας την εφαρμογή του σε συγκεκριμένες αναλυόμενες ουσίες.
- Μη γραμμική απόκριση για το θείο: Η μη γραμμική απόκριση του FPD στις ενώσεις θείου μπορεί να περιπλέξει την ποσοτικοποίηση και τη βαθμονόμηση.



Εικόνα 12. Σχηματική απεικόνιση ενός φωτομετρικού ανιχνευτή φλόγας Shimadzu

Ακολουθεί ένας πίνακας που συνοψίζει διάφορες μελέτες σχετικά με την αέρια χρωματογραφία (GC) για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι. Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει τις τεχνικές απομόνωσης και επεξεργασίας δειγμάτων, τις τεχνικές

ποσοτικοποίησης, τους ανιχνευτές, τα ανιχνευμένα φυτοφάρμακα, τις ανακτήσεις τους (από το μικρότερο στο μεγαλύτερο) και τις σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD).

Πίνακας 10. Διάφορες μελέτες σχετικά με την αέρια χρωματογραφία (GC) για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι.

Αναφορά	Τεχνική Απομόνωσης & Επεξεργασίας Δείγματος	Τεχνική ποσοτικοποίησης	Ανιχνευτής	Φυτοφάρμακα	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
Gawel, Kiljanek, Niewiadowska, Semeniuk, Goliszek, Burek, & Posyniak. (2019)	Μέθοδος QuEChERS	GC-MS	MS	Imidacloprid, Thiomethoxam, Acetamiprid	70-90	3-10
Albero, Sánchez, & Tadeo. (2004)	Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (LLE)	GC-MS	MS	Dichlofluanid, Ethalfluralin	>86	<10
Menkissoglu, Diamantidis, Georgiou, & Thrasyvoulou. (2000)	Εκχύλιση Υγρού-Υγρού (LLE)	GC-ECD	ECD	Coumaphos, Fluvalinate	79-94	2-8
Orso, Martins, Donato, Rizzetti, Kemmerich, Adaime, & Zanella. (2014)	Μέθοδος QuEChERS	GC-ECD	ECD	Carbendazim, Chlorpyrifos, Cypermethrin	60-85	5-12
Korta, Bakkali, Berrueta, Gallo, Vicente, Kilchenmann, & Bogdanov (2001)	Διασπορά στερεάς φάσης μήτρας (MSPD)	GC-MS/MS	MS/MS	Amitraz, Tau-fluvalinate, Thiacloprid	75-98	4-11
Thompson, Vaughan, Mahlein, Ladewig, & Kenter (2022)	Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE)	GC-MS	MS	Thiomethoxam, Clothianidin	65-88	6-9
Shamsipur, Yazdanfar, & Mahnaz (2016).	Εκχύλιση στερεάς φάσης διασποράς (dSPE)	GC-MS	MS	Fipronil, Thiamethoxam, Imidacloprid	68-90	3-7
Sun, Zheng, Yan, & Lian. (2021)	Εκχύλιση με SPE	GC-MS	MS	Diazinon, Malathion, Parathion	78-92	2-7

3.2.2. Υγρή Χρωματογραφία

Η υγρή χρωματογραφία (LC) είναι μια ευέλικτη αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό, την αναγνώριση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών σε ένα μείγμα. Λειτουργεί με βάση την αρχή της διαφορικής κατανομής των αναλυτών μεταξύ μιας κινητής φάσης (υγρός διαλύτης) και μιας στατικής φάσης (στερεό στήριγμα).

Η αρχή λειτουργίας της LC προβλέπει τον διαχωρισμό των συστατικών με βάση τη διαφορετική αλληλεπίδρασή τους με τη στατική και την κινητή φάση. Τα συστατικά που αλληλεπιδρούν πιο έντονα με τη στατική φάση περνούν περισσότερο χρόνο σε αυτήν και εκκλύονται αργότερα, ενώ εκείνα που αλληλεπιδρούν πιο έντονα με την κινητή φάση εκκλύονται νωρίτερα.

Η στατική φάση μπορεί να είναι πολική ή μη πολική και τυπικά επικαλύπτεται στην επιφάνεια στερεών σωματιδίων (σε πακτωμένες στήλες) ή ακινητοποιείται στην επιφάνεια της στήλης (σε τριχοειδείς στήλες). Οι πιο κοινές στατικές φάσεις χωρίζονται στις εξής κατηγορίες:

- **Αντεστραμμένη Φάση:** Κυριαρχούν οι υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, με κοινές μη πολικές στατικές φάσεις όπως το πυρίτιο C18. Αυτή η φάση χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό μη πολικών ή μέτρια πολικών ενώσεων.
- **Κανονική Φάση:** Επικρατούν πολικές αλληλεπιδράσεις, με πολικές στατικές φάσεις όπως σιλικαζέλ ή αλουμίνα. Το LC κανονικής φάσης είναι κατάλληλο για διαχωρισμό πολικών ενώσεων.
- **Ιονανταλλαγής:** Φορτισμένες ομάδες στη στατική φάση αλληλεπιδρούν με ιόντα αναλυόμενης ουσίας με βάση το φορτίο τους. Αυτή η φάση χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ιόντων ή ιονιζόμενων ενώσεων.
- **Αποκλεισμού μεγεθών:** Επίσης γνωστή ως διήθηση γέλης ή χρωματογραφία διείσδυσης γέλης, αυτή η φάση διαχωρίζει τις αναλυόμενες ουσίες με βάση το μέγεθος και το σχήμα τους, επιτρέποντας σε μικρότερα μόρια να διεισδύσουν στην πορώδη στατική φάση ενώ τα μεγαλύτερα μόρια αποκλείονται.
- **Συγγένειας:** Η επιλογή της στατικής φάσης καθορίζει την επιλεκτικότητα του διαχωρισμού. Η προσαρμογή της στατικής φάσης στις ιδιότητες της αναλυόμενης ουσίας ενισχύει την απόδοση διαχωρισμού.

Η κινητή φάση είναι το ρευστό που μεταφέρει το δείγμα μέσω του χρωματογραφικού συστήματος, διευκολύνοντας τον διαχωρισμό της αναλυόμενης ουσίας. Οι κινητές φάσεις μπορεί να είναι είτε υδατικοί είτε οργανικοί διαλύτες, είτε μείγματα αυτών. Οι κοινοί οργανικοί διαλύτες περιλαμβάνουν μεθανόλη, ακετονιτρίλιο και τετραϋδροφουράνιο. Ο ρόλος τους είναι η αλληλεπίδραση με τα μόρια στατικής φάσης και αναλυόμενης ουσίας, επηρεάζοντας τους χρόνους κατακράτησης και έκλυσης. Η έκλυση των διαλυτών στη στήλη χωρίζεται σε βαθμιδωτή και ισοκρατική. Στη

βαθμιδωτή, η σύσταση του ρεύματος διαλυτών αλλάζει σταδιακά κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Αυτό επιτυγχάνεται με την ανάμειξη διαλυτών που διαφέρουν στο ποσοστό τους στο μίγμα. Η χρονική αλλαγή στη σύσταση του μίγματος μπορεί να επηρεάσει τον διαχωρισμό των ενώσεων στο δείγμα, επιτρέποντας την απομόνωση και τον διαχωρισμό περισσότερων ενώσεων σε σύγκριση με μια σταθερή σύσταση του ρεύματος. Στην ισοκρατική έκλυση, η σύσταση του μίγματος διαλυτών παραμένει σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, είναι πιο απλή στην υλοποίηση και προσφέρει σταθερές συνθήκες ανάλυσης. Ένα μειονέκτημα της ισοκρατικής έκλυσης, είναι ο περιορισμός της απόδοσης του διαχωρισμού ενώσεων που αλληλεπιδρούν διαφορετικά με τους διαλύτες (Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R., 2017).

Διάφοροι ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν με LC, συμπεριλαμβανομένης της φασματοσκοπίας UV-Vis, της φασματοσκοπίας φθορισμού, της φασματομετρίας μάζας (LC-MS) και της ανίχνευσης του δείκτη διάθλασης. Η επιλογή του ανιχνευτή εξαρτάται από τις ιδιότητες της αναλυόμενης ουσίας και την απαιτούμενη ευαισθησία. Η υγρή χρωματογραφία (LC) έχει ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση φυτοφαρμάκων στο μέλι, ιδιαίτερα για ενώσεις που είναι θερμικά ασταθείς. Αν και η μάζα συνήθως είναι ο πλέον χρήσιμος και κατάλληλος ανιχνευτής για αυτού του είδους την ανάλυση, έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί και άλλοι τύποι ανιχνευτών, όπως η ανίχνευση με μεταβαλλόμενο μήκος κύματος, η ανίχνευση με πίνακα διόδων (DAD) και η φασματοσκοπία φθορισμού (J. Vichapong, R. Burakham, S. Srijaranai, 2015). Ωστόσο, αυτοί οι εναλλακτικοί ανιχνευτές χρησιμοποιούνται γενικά για την ανάλυση ενός περιορισμένου αριθμού φυτοφαρμάκων ή κατηγοριών φυτοφαρμάκων.

LC-UV

Ο συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας-ορατής φασματοσκοπίας (LC-UV) είναι μια τεχνική που ενσωματώνει τον διαχωρισμό υγρής χρωματογραφίας (LC) με την ανίχνευση χρησιμοποιώντας ένα φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους. Ενώ το LC-UV δεν χρησιμοποιείται τόσο συχνά όσο άλλες μέθοδοι ανίχνευσης όπως η φασματομετρία μάζας, μπορεί να εφαρμοστεί στην ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι, ιδιαίτερα για ενώσεις με χρωμοφόρα που απορροφούν στην ορατή περιοχή.

Η ανάλυση LC-UV περιλαμβάνει τον διαχωρισμό των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας και στη συνέχεια την ανίχνευση τους με βάση την απορρόφησή τους από το ορατό φως. Καθώς το υγρό έκλυσης που περιέχει διαχωρισμένες αναλυόμενες ουσίες διέρχεται μέσω της κυψέλης ροής του φασματοφωτόμετρου, οι ενώσεις με συγκεκριμένα χρωμοφόρα απορροφούν φως σε χαρακτηριστικά μήκη κύματος. Η απορρόφηση μετράται και δημιουργείται χρωματογράφημα, που υποδεικνύει την παρουσία και τη συγκέντρωση των αναλυτών-στόχων.

Η ανάλυση LC-UV είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορισμένων κατηγοριών φυτοφαρμάκων στο μέλι, ιδιαίτερα εκείνων που παρουσιάζουν ισχυρή απορρόφηση στην ορατή περιοχή, όπως ορισμένα ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την τακτική παρακολούθηση των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων για να διασφαλιστεί η ασφάλεια του μελιού και η συμμόρφωση με τα ρυθμιστικά πρότυπα (J. Atienza, J.J. Jim'enez, J.L. Bernal, M.T. Mart'ın, J., 1993). Στα πλεονεκτήματα των οργάνων LC-UV συγκαταλέγεται η ειδικότητα στην ανίχνευση, καθώς διαφοροποιούνται τα σήματα των ενώσεων στόχων από τις παρεμβολές της μήτρας και το οικονομικό όφελος σε σύγκριση με άλλες μεθόδους ανίχνευσης όπως η φασματομετρία μάζας. Η ανίχνευση LC-UV δεν είναι τόσο ευαίσθητη όσο άλλες μεθόδους ανίχνευσης, όπως η μάζας. Αυτό μπορεί να οδηγήσει σε μικρότερο εύρος ανίχνευσης ή σε μεγαλύτερα όρια ανίχνευσης για τις ενώσεις στόχους.

LC-DAD

Η υγρή χρωματογραφία με ανίχνευση συστοιχίας διόδων (LC-DAD) είναι μια ισχυρή αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων στο μέλι. Το LC-DAD συνδυάζει υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανίχνευση διάταξης διόδων (DAD). Σε αυτή την τεχνική, μια υγρή κινητή φάση μεταφέρει το δείγμα μέσω μιας στατικής φάσης (συνήθως μια στήλη C18) υπό υψηλή πίεση. Καθώς τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται με βάση την αλληλεπίδρασή τους με τη στατική φάση, περνούν από έναν ανιχνευτή DAD. Ο ανιχνευτής DAD αποτελείται από μια σειρά διόδων που καλύπτουν ένα εύρος μηκών κύματος, συνήθως στο ορατό φάσμα UV. Καθώς οι ενώσεις έκλουσης περνούν από τον ανιχνευτή, απορροφούν φως σε συγκεκριμένα μήκη κύματος, παράγοντας φάσματα απορρόφησης. Τα φάσματα απορρόφησης καταγράφονται, παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με την ταυτότητα και τη συγκέντρωση των ενώσεων στο δείγμα. Αυτό επιτρέπει τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών με βάση τα χαρακτηριστικά απορρόφησής τους (J. Vichapong, R. Burakham, S. Srijaranai, 2015).

Το LC-DAD χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο μέλι λόγω της ευαισθησίας, της επιλεκτικότητας και της ικανότητάς του να ανιχνεύει ένα ευρύ φάσμα ενώσεων. Τα φυτοφάρμακα, συμπεριλαμβανομένων των εντομοκτόνων, μυκητοκτόνων και ζιζανιοκτόνων, μπορούν να διαχωριστούν και να ποσοτικοποιηθούν χρησιμοποιώντας LC-DAD. Η τεχνική επιτρέπει την ταυτοποίηση συγκεκριμένων φυτοφαρμάκων που υπάρχουν σε δείγματα μελιού και επιτρέπει την ποσοτική ανάλυση για τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεών τους.

Πλεονεκτήματα του LC-DAD:

- Ταυτόχρονη ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πολλαπλών φυτοφαρμάκων σε μία μόνο δοκιμή.
- Υψηλή ευαισθησία και επιλεκτικότητα, επιτρέποντας την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε επίπεδο ίχνους.
- Ευρεία εφαρμογή σε διάφορες κατηγορίες φυτοφαρμάκων.
- Παρέχει φάσματα απορρόφησης ορατά από την υπεριώδη ακτινοβολία για αναγνώριση ένωσης.
- Σχετικά γρήγορος χρόνος ανάλυσης σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους.

Η μελέτη των Jovanov, P., et al αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των νεονικοτινοειδών στο μέλι μέσω μιας μεθόδου HPLC-DAD. Χρησιμοποιήθηκε ένα σύστημα Agilent 1200 Series HPLC με αποσταγμένο διαλυτή, τριφασική αντλία, αυτόματο δείγματολήπτη και θερμοστατημένη στήλη στήλης. Η διάχυση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε σε στήλη ZORBAX Eclipse XDB-C18 (50 mm x 4.6 mm, i.d. 1.8 mm) με θερμοκρασία στήλης 30 °C. Το κινητό φάσμα αποτελούνταν από δύο ελουέντες, ACN (A) και υπέρκαθαρο νερό με 0,2% φορμικό οξύ (B), παραδόθηκε σε ρυθμό ροής 0,7 mL/min. Η ανάλυση των νεονικοτινοειδών πραγματοποιήθηκε με πρόγραμμα γραμμικής αναβαθμιστικής διαχρονίσεως, ξεκινώντας από 90% B και φτάνοντας σε 60% B μετά από 6 λεπτά, ενώ επέστρεφε στο 90% B στο τέλος της ανάλυσης στα 10 λεπτά. Η αναγνώριση των νεονικοτινοειδών βασίστηκε στους χρόνους κατακράτησης και η ποσοτικοποίηση βασίστηκε στις περιοχές των κορυφών. Οι μέθοδοι αξιολογήθηκαν σύμφωνα με τις απαιτήσεις μεθόδου επικύρωσης και ελέγχου ποιότητας για την ανάλυση καταλοίπων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Η ειδικότητα διαπιστώθηκε με την αναγνώριση των αναλυτών βασισμένη στα φασματικά διαγράμματα UV και τους σχετικούς χρόνους κατακράτησης. Οι χρόνοι κατακράτησης ήταν σταθεροί, με RSD ποτέ δεν υπερβαίνει το 0.1%. Η ακρίβεια της μεθόδου εκφράστηκε με τη μέση ανάκτηση (R, %), με τις τιμές R και RSD να είναι στα 70-120% και $\leq 20\%$ αντίστοιχα για όλα τα επιλεγμένα νεονικοτινοειδή σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης.

LC/MS-MS

Ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας σε σύζευξη με διαδοχικό φασματογράφο μάζας (LC-MS/MS) επιτρέπει την ανίχνευση των φυτοφαρμάκων σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε πολύπλοκες μήτρες όπως το μέλι. Στο πρώτο στάδιο (MS1), τα πρόδρομα ιόντα ενδιαφέροντος επιλέγονται και κατακερματίζονται σε ιόντα προϊόντος. Αυτά τα ιόντα προϊόντος υποβάλλονται στη συνέχεια σε ένα δεύτερο στάδιο ανάλυσης μάζας (MS2), όπου επιλέγονται συγκεκριμένα ιόντα για ανίχνευση με βάση προκαθορισμένες μεταβάσεις. Με τη λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων (MRM), ο ανιχνευτής μάζας αναλύει μόνο τα ιόντα που

ενδιαφέρουν, ενισχύοντας την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (M.R.F. Sampaio, D. Tomasini, L.V. Cardoso, S.S. Caldas, E.G. Primel, 2012). Το LC-MS/MS προσφέρει αυξημένη ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ειδικότητα σε σύγκριση με το LC-MS, καθιστώντας το ιδιαίτερα κατάλληλο για την ανάλυση σύνθετων δειγμάτων όπως το μέλι, το οποίο μπορεί να περιέχει ίχνη φυτοφαρμάκων μεταξύ άλλων ενώσεων (Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A. I., & Pérez, R. A., 2019).

Πλεονεκτήματα της LC-MS/MS:

- **Υψηλή Ευαισθησία:** Η LC-MS/MS επιτρέπει την ανίχνευση ακόμα και των πολύ μικρών συγκεντρώσεων φυτοφαρμάκων στο μέλι, καθιστώντας την κατάλληλη για την παρακολούθηση των ορίων κατανάλωσης.
- **Ειδικότητα:** Η λειτουργία του LC-MS/MS επιτρέπει την ακριβή και αξιόπιστη ανίχνευση των φυτοφαρμάκων, ακόμα και σε πολύπλοκες μήτρες.
- **Αποτελεσματικότητα:** Η χρήση της LC-MS/MS επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών φυτοφαρμάκων σε ένα δείγμα, μειώνοντας έτσι τόσο τον χρόνο όσο και το κόστος ανάλυσης.
- **Ποικιλία Αναλυτικών Διαδικασιών:** Η LC-MS/MS επιτρέπει την εφαρμογή διαφόρων τεχνικών αναλυτικής χημείας, όπως η ανάλυση με προηγμένες μεθόδους προεπεξεργασίας δεδομένων ή η χρήση διαφορετικών τύπων στηλών, για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση των φυτοφαρμάκων.

Η τεχνική LC-MS/MS εφαρμόζεται ευρέως για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση φυτοφαρμάκων στο μέλι. Ανάμεσα στα φυτοφάρμακα που μπορούν να αναλυθούν συμπεριλαμβάνονται τα οργανοχλωριούχα, τα πυρεθροειδή και τα καρβαμοειδή. Η παρακολούθηση της παρουσίας αυτών των φυτοφαρμάκων στο μέλι είναι κρίσιμη για την ασφάλεια του καταναλωτή και την τήρηση των κανονισμών ποιότητας των τροφίμων.

Η συζευγμένη τεχνική υγρής χρωματογραφίας με διπλή φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) επιτρέπει την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε χαμηλές συγκεντρώσεις σε πολύπλοκα δείγματα όπως το μέλι. Το σύστημα αυτό βελτιώνει την ευαισθησία, μειώνει την παρεμβολή από το υπόστρωμα και προσφέρει δομικές πληροφορίες. Η λειτουργία πολλαπλής παρακολούθησης αντιδράσεων (MRM) επιτρέπει στον φασματογράφο να αναλύει μόνο τα ιόντα ενδιαφέροντος, αυξάνοντας την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Συνεπώς, οι μέθοδοι LC-MS/MS έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για την αξιολόγηση της παρουσίας αναλύτων στόχων σε εμπορικό μέλι και συναφή δείγματα. Όσον αφορά τη στατική φάση, η στήλη C18 (4,6 και 2,1 mm i.d.) είναι σχεδόν κοινή για τον διαχωρισμό φυτοφαρμάκων. Στην μελέτη των Moliner-Martínez, et. al. (2015), τα δείγματα μελιού διαλύθηκαν σε μεθανόλη, υποβλήθηκαν σε φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο υγρό περάστηκε μέσα από μια στήλη στερεάς φάσης εκχύλισης (SPE) για καθαρισμό και συγκέντρωση των φυτοφαρμάκων. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκε στήλη C18 για την υγρή

χρωματογραφία με κινητές φάσεις νερού και μεθανόλης με 0,1% φορμικό οξύ και ρυθμό ροής 0,3 mL/min σε γραμμική αύξηση της κινητής φάσης Β από 10% σε 90% σε 15 λεπτά. Το σύστημα MS/MS λειτούργησε σε λειτουργία πολλαπλής παρακολούθησης αντιδράσεων (MRM) και χρησιμοποιήθηκε ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) σε θετική και αρνητική λειτουργία ανάλογα με τα χαρακτηριστικά των αναλύτων. Οι ανακτήσεις των φυτοφαρμάκων κυμαίνονταν από 75% έως 105%, τα όρια ανίχνευσης (LOD) κυμάνθηκαν από 0,5 ng/g έως 2 ng/g ανάλογα με το φυτοφάρμακο και οι συντελεστές απόκλισης (RSD) ήταν κάτω από 8% για όλα τα φυτοφάρμακα που αναλύθηκαν. Η μέθοδος LC-MS/MS που αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε ήταν ιδιαίτερα ευαίσθητη και αξιόπιστη για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι, προσφέροντας εξαιρετικό διαχωρισμό των αναλύτων και ακριβή ποσοτικοποίηση μέσω της λειτουργίας MRM.

Υγρή Χρωματογραφία Εξαιρετικά Υψηλής Απόδοσης (UHPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Ultra-High Performance (UHPLC) έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό αναλυτικό εργαλείο για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Το UHPLC προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τη συμβατική υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC), όπως υψηλότερη ανάλυση, ταχύτεροι χρόνοι ανάλυσης και αυξημένη ευαισθησία. Στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων στο μέλι, το UHPLC επιτρέπει τον γρήγορο διαχωρισμό σύνθετων μειγμάτων φυτοφαρμάκων, επιτρέποντας την ακριβέστερη αναγνώριση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών-στόχων.

Τα συστήματα UHPLC συνήθως χρησιμοποιούν στήλες γεμάτες με μικρότερα σωματίδια, οδηγώντας σε αυξημένη απόδοση και ανάλυση στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς. Οι δυνατότητες υψηλότερης πίεσης των συστημάτων UHPLC επιτρέπουν ταχύτερους ρυθμούς ροής και μικρότερους χρόνους ανάλυσης σε σύγκριση με το συμβατικό HPLC. Η αυξημένη ταχύτητα συμβάλλει σε υψηλότερη απόδοση δείγματος και βελτιωμένη εργαστηριακή απόδοση. Ο συνδυασμός υψηλής ανάλυσης, μειωμένου χρόνου ανάλυσης και βελτιωμένης ευαισθησίας που παρέχεται από τα συστήματα UHPLC επιτρέπει υψηλότερη απόδοση δειγμάτων, επιτρέποντας στα εργαστήρια να αναλύουν περισσότερα δείγματα σε λιγότερο χρόνο χωρίς να διακυβεύεται η ποιότητα των δεδομένων (Martel, Anny-Isabelle, et al. 2016).

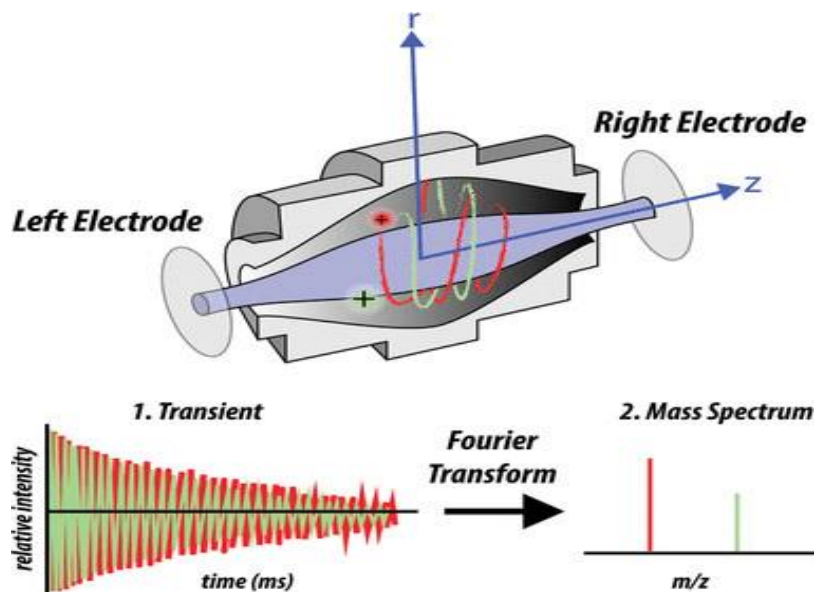
Τα συστήματα UHPLC είναι εξοπλισμένα με προηγμένους ανιχνευτές, όπως η φασματομετρία μάζας (MS), που προσφέρουν ανώτερη ευαισθησία για την ανίχνευση ιχνών επιπέδων φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Οι Gómez-Pérez, Plaza-Bolanos, Romero-González, Martínez-Vidal και Garrido-Frenich (2012) ανέπτυξαν μια μέθοδο για την ταυτόχρονη ανάλυση περισσότερων από 350 φυτοφαρμάκων στο μέλι, χρησιμοποιώντας υγρή χρωματογραφία εξαιρετικά υψηλής απόδοσης σε συνδυασμό με ανάλυση φασματομετρίας μάζας Orbitrap (UHPLC-Orbitrap-MS) (Gómez-Pérez,

María Luz, et al., 2017). Το φασματόμετρο μάζας Orbitrap (MS) είναι ένας τύπος οργάνου φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης που χρησιμοποιείται ευρέως για τον ποσοτικό προσδιορισμό μορίων σε σύνθετα δείγματα. Το Orbitrap MS λειτουργεί με βάση τις αρχές της ανάλυσης μάζας, στην οποία τα ιόντα διαχωρίζονται και ανιχνεύονται με βάση την αναλογία μάζας προς φορτίο (m/z).

Τα στάδια λειτουργίας του Orbitrap-MS είναι τα εξής:

- **Ιοντισμός:** Το δείγμα πρώτα ιονίζεται για να δημιουργηθούν φορτισμένα μόρια ή μοριακά θραύσματα. Οι κοινές τεχνικές ιονισμού περιλαμβάνουν μεταξύ άλλων τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI) και τον χημικό ιονισμό με ατμοσφαιρική πίεση (APCI).
- **Παγίδευση ιόντων:** Τα ιόντα που παράγονται από τη διαδικασία ιονισμού κατευθύνονται στη συνέχεια στον αναλυτή Orbitrap. Μέσα στον Orbitrap, τα ιόντα παγιδεύονται σε ένα ηλεκτροστατικό πεδίο υψηλής τάσης ανάμεσα σε ένα εξωτερικό ηλεκτρόδιο που μοιάζει με βαρέλι και ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο που μοιάζει με άξονα. Καθώς τα ιόντα περιφέρονται γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο, βιώνουν μια δύναμη επαναφοράς που τα αναγκάζει να ταλαντώνονται κατά μήκος του άξονα z .
- **Ανάλυση Συχνότητας:** Καθώς τα ιόντα ταλαντώνονται, μετρώνται οι συχνότητες κίνησής τους. Αυτή η μέτρηση βασίζεται στο ρεύμα εικόνας που προκαλείται στο εξωτερικό ηλεκτρόδιο από τα κινούμενα ιόντα. Οι συχνότητες ανιχνεύονται και μετατρέπονται σε ηλεκτρικά σήματα από τον ανιχνευτή Orbitrap.
- **Μετασχηματισμός Fourier:** Οι ανιχνευόμενες συχνότητες υποβάλλονται στη συνέχεια σε ανάλυση μετασχηματισμού Fourier, η οποία μετατρέπει τα σήματα συχνότητας σε τιμές αναλογίας μάζας προς φορτίο (m/z). Αυτή η διαδικασία οδηγεί σε ένα φάσμα μάζας που αντιπροσωπεύει την κατανομή των ιόντων με βάση τις αναλογίες μάζας προς φορτίο.
- **Ανάλυση Δεδομένων:** Τέλος, το φάσμα μάζας αναλύεται για να εντοπιστούν και να ποσοτικοποιηθούν τα ιόντα που υπάρχουν στο δείγμα. Αυτή η ανάλυση μπορεί να πραγματοποιηθεί χρησιμοποιώντας διάφορα εργαλεία λογισμικού που ταιριάζουν τα παρατηρούμενα φάσματα μάζας με γνωστές βάσεις δεδομένων φάσματος μάζας ή συγκρίνοντάς τα με πρότυπα αναφοράς.

Η φασματομετρία μάζας Orbitrap (MS) έχει αναδειχθεί ως ένα ισχυρό εργαλείο για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων σε δείγματα μελιού. Ο αναλυτής Orbitrap MS είναι γνωστός για την υψηλή ανάλυση, την ακρίβεια και την ευαισθησία του, γεγονός που τον καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλο για την ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων όπως το μέλι.



Εικόνα 13. Σχηματική απεικόνιση του ανιχνευτή μάζας Orbitrap FT.

Φασματοφθορισμόμετρο (FLD)

Η φθορισμομετρία είναι μια τεχνική ανάλυσης που βασίζεται στην ικανότητα ορισμένων ουσιών να απορροφούν φως σε μια συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος και στη συνέχεια να εκπέμπουν φως σε μια άλλη, μεγαλύτερη περιοχή του φάσματος. Αυτή η ιδιότητα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφόρων ουσιών σε βιολογικά, περιβαλλοντικά και βιομηχανικά δείγματα.

Η αρχή λειτουργίας του φασματοφθορισμόμετρου περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- **Διέγερση:** Η ουσία του δείγματος εκτίθεται σε φως (συνήθως από λάμπες xenon ή laser) σε μια συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος. Η ενέργεια του φωτός προκαλεί τη διέγερση των ηλεκτρονίων των μορίων της ουσίας σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα.
- **Φθορισμός:** Τα διεγερμένα ηλεκτρόνια επιστρέφουν στα αρχικά τους ενεργειακά επίπεδα, εκπέμποντας φως σε μια μεγαλύτερη περιοχή του φάσματος (φθορισμός). Η εκπομπή αυτή ανιχνεύεται και μετριέται από το φασματοφθορισμόμετρο.
- **Ανάλυση Δεδομένων:** Η ένταση του φθορισμού είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της φθορίζουσας ουσίας στο δείγμα, και έτσι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της.

Η συνδυασμένη αυτή τεχνική (LC-FLD) είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι λόγω της υψηλής ευαισθησίας και της ικανότητας ανίχνευσης ουσιών σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις. Επιπλέον, η φθορισμομετρία μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ουσιών που είτε έχουν φυσική φθορίζουσα ιδιότητα είτε μπορούν να τροποποιηθούν για να αποκτήσουν τέτοια ιδιότητα. Η χρήση φασματοφθορισμομέτρου σε συζευγμένη τεχνική με υγρή χρωματογραφία (LC) είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι. Στη μέθοδο αυτή, τα δείγματα μελιού διαλύονται σε κατάλληλο διαλύτη, όπως η μεθανόλη ή το ακετονιτρίλιο, και ακολουθεί μια διαδικασία καθαρισμού (cleanup) με χρήση στερεάς φάσης εκχύλισης (SPE) για την αφαίρεση ακαθαρσιών και τη συγκέντρωση των φυτοφαρμάκων. Τα καθαρισμένα δείγματα εγχέονται στο σύστημα LC, όπου ο διαχωρισμός των φυτοφαρμάκων επιτυγχάνεται μέσω μιας κατάλληλης στήλης χρωματογραφίας υπό συγκεκριμένες συνθήκες (κινητή φάση, ρυθμός ροής κ.λπ.). Στη συνέχεια, τα διαχωρισμένα φυτοφάρμακα ανιχνεύονται με τη χρήση του φασματοφθορισμομέτρου, το οποίο μετρά την ένταση της φθορισμού που εκπέμπεται από κάθε ουσία, προσφέροντας υψηλή ευαισθησία, ιδιαίτερα για ουσίες που έχουν φυσικό ή επαγόμενο φθορισμό.

Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman είναι μια αναλυτική τεχνική που βασίζεται στη μελέτη των φωτονίων Raman που παράγονται όταν ένα δείγμα διαστέλλεται με λέιζερ. Η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες για τις μοριακές και χημικές δομές των ουσιών, καθώς και για τις μοριακές δυναμικές τους, επιτρέποντας την αναγνώριση και την ποσοτικοποίηση χημικών ενώσεων σε ποικίλα δείγματα. Η τεχνική Raman αναπτύχθηκε από τον ινδικό φυσικό C.V. Raman και τον συνεργάτη του K.S. Krishnan το 1928, και αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μη καταστροφικές μεθόδους ανάλυσης.

Η φασματοσκοπία Raman λειτουργεί βασιζόμενη στο φαινόμενο της αλλαγής της ενέργειας των φωτονίων (Raman shift) που εκπέμπονται όταν ένα δείγμα ακτινοβολείται με ένα λέιζερ. Τα φωτόνια Raman που εκπέμπονται έχουν ενέργεια που διαφέρει από αυτή του εισερχόμενου λέιζερ, και αυτή η διαφορά (Raman shift) καταγράφεται ως φασματική γραμμή στο φάσμα Raman του δείγματος. Τα Raman φάσματα περιλαμβάνουν πληροφορίες για τις δονήσεις, περιστροφές και δομικές ιδιότητες των μορίων του δείγματος, επιτρέποντας την αναγνώριση μοριακών συνδέσμων και ουσιών.

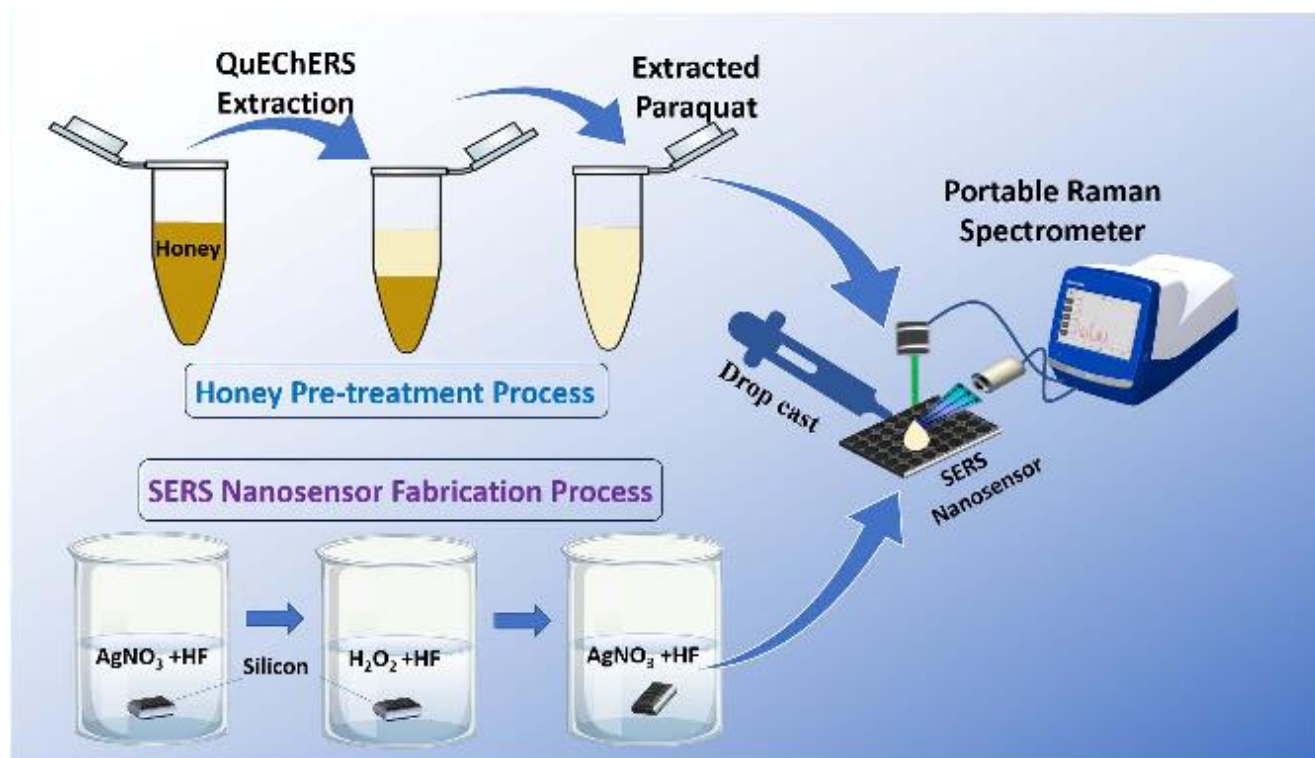
Η φασματοσκοπία Raman έχει εφαρμοστεί επιτυχώς για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε διάφορα βιολογικά δείγματα, συμπεριλαμβανομένου και του μελιού. Η τεχνική αυτή προσφέρει πλεονεκτήματα όπως:

- Μη Καταστροφικότητα: Δεν απαιτείται καταστροφική προετοιμασία του δείγματος.
- Απευθείας Ανάλυση: Μπορεί να εφαρμοστεί απευθείας σε ποικίλα δείγματα χωρίς περαιτέρω προετοιμασία.
- Ευαισθησία: Είναι ευαίσθητη στις μοριακές δομές, επιτρέποντας τον προσδιορισμό σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις.
- Ταχύτητα: Οι μετρήσεις είναι γρήγορες και μπορούν να πραγματοποιηθούν εντός λίγων λεπτών.

Σε μελέτες που εφαρμόζουν τη φασματοσκοπία Raman για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι, οι ερευνητές συχνά αξιολογούν την ικανότητα της τεχνικής να ανιχνεύει και να ποσοτικοποιεί συγκεκριμένα χημικά συστατικά, χρησιμοποιώντας συνήθως αναλυτές Raman με λείζερ υψηλής ισχύος και επαρκή ανάλυση φασμάτων. Οι μελέτες αυτές συνήθως περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της ευαισθησίας της τεχνικής, την ακρίβεια και την επαναληπτικότητα, καθώς και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με άλλες αναλυτικές μεθόδους. Επιπλέον, η φασματοσκοπία Raman μπορεί να συνδυαστεί με άλλες τεχνικές όπως η υγρή χρωματογραφία ή η υγρή χρωματογραφία-μάζας για περαιτέρω επιβεβαίωση και ποσοτικοποίηση των εντοπισμένων ενώσεων. Η Raman φασματοσκοπία παρέχει μοναδικά φασματικά χαρακτηριστικά για διάφορες οργανικές ενώσεις, όπως δονητικές και περιστροφικές κινήσεις των μορίων. Τα φασματικά δεδομένα μπορούν να συγκριθούν με γνωστά φάσματα από βιβλιοθήκες για την αναγνώριση των ενώσεων. Με τη χρήση κατάλληλων μεθόδων και αναλυτικών εργαλείων, μπορούν να προσδιοριστούν οι συγκεντρώσεις των οργανικών ενώσεων στα δείγματα, χρησιμοποιώντας την ένταση των Raman σημάτων. Η Raman φασματοσκοπία είναι επιλεκτική και ευαίσθητη, καθιστώντας την ιδανική για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση ακόμα και μικρών ποσοτήτων οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα δείγματα όπως το μέλι.

Σε μια πρόσφατη έρευνα, παρουσιάζεται μια πλατφόρμα οπτικών νανοαισθητήρων η οποία εφαρμόστηκε για την ταχεία ανίχνευση ιχνών του παρασιτοκτόνου paraquat στο μέλι. Για την αντιμετώπιση της παρεμβολής σήματος από τη μήτρα του μελιού, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) για την απομόνωση του paraquat. Αυτή η μέθοδος βελτίωσε σημαντικά την αποτελεσματικότητα του αισθητήρα και επέτρεψε την ανίχνευση του paraquat με όριο ανίχνευσης (LOD) όσο χαμηλό όσο 0,075 mg/kg (75 ppb) στο μέλι. Η ένταση του σήματος Raman στην κορυφή 1648 cm^{-1} παρουσίασε γραμμική σχέση με την αύξηση της συγκέντρωσης paraquat και επέδειξε υψηλό συντελεστή συσχέτισης R^2 ίσο με

0,9986. Αυτή η μέθοδος αποδείχθηκε κατάλληλη, παρέχοντας γρήγορη και αξιόπιστη ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι (S. Singh, et. Al., 2023).



Εικόνα 14. Σχηματική απεικόνιση της ανίχνευσης παρασιτοκτόνου Paraquat στο μέλι με χρήση φορητής πλατφόρμας νανοαισθητοποίησης που βασίζεται σε SERS (Surface-Enhanced Raman Spectroscopy).

Ακολουθεί ένας πίνακας που συνοψίζει διάφορες μελέτες σχετικά με την υγρή χρωματογραφία για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι. Αυτός ο πίνακας περιλαμβάνει τις τεχνικές απομόνωσης και επεξεργασίας δειγμάτων, τις τεχνικές ποσοτικοποίησης, τους ανιχνευτές, τα ανιχνευμένα φυτοφάρμακα, τις ανακτήσεις τους (από το μικρότερο στο μεγαλύτερο) και τις σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD).

Πίνακας 11. Διάφορες μελέτες σχετικά με την υγρή χρωματογραφία για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων στο μέλι.

Αναφορά	Τεχνική Απομόνωσης & Επεξεργασίας Δείγματος	Τεχνική ποσοτικοποίησης	Ανιχνευτής	Φυτοφάρμακα	Ανάκτηση (%)	RSD (%)
Kamel (2010)	Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)	LC-MS/MS	MS	Μεταβολίτες νεονικοτινοειδών	72-98	2-8
Zheng, Park, Abd, Seong-Kwan, Cho, Choi, Yi et al. (2018)	Μέθοδος QuEChERS	LC-MS/MS	MS	cymiazole, 2,4-DMA, fipronil, coumaphos, amitraz και fluvalinate	72-98	<12
Oymen, Aşır, Türkmen, & Adil (2022)	Μέθοδος QuEChERS	LC-MS/MS	MS	κουμάφος, θειαμεθοξάμη, N-(2,4-διμεθυλοφαινυλο)φορμαμίδιο, πιπερονυλοβουτοξείδιο	76-98	<20
Chaimanee, Veeranan, Josephine Johnson, and Jeffery S. Pettis. (2022)	Μέθοδος QuEChERS	LC-MS/MS	MS	μεταβολίτες αμιτράζης, 2,4-διμεθυλοφαινυλοφορμαμίδιο (DMPF) και 2,4-διμεθυανιλίνη (DMA),	68-97	5-8
(Gómez-Pérez, María Luz, et al., 2017)	Εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE)	UHPLC-Orbitrap-MS	Orbitrap-MS	cinosulfuron, paclobutrazol	77-99	4-8

3.3 Ανοσολογικές τεχνικές

Η έλευση των ανοσοχημικών τεχνικών σηματοδότησε μια σημαντική αλλαγή στην ανάλυση φυτοφαρμάκων σε διάφορους τομείς όπως η κτηνιατρική, η γεωργία, η κλινική χημεία, καθώς και η περιβαλλοντική ανάλυση και η ανάλυση τροφίμων. Αυτές οι μέθοδοι έχουν κερδίσει όλο και περισσότερο την αναγνώριση για τα χαρακτηριστικά τους ότι είναι γρήγορες, απλές, εξαιρετικά ευαίσθητες, ειδικά και οικονομικά εργαλεία ικανά να ανιχνεύουν συγκεντρώσεις κλίμακας νανογραμμαρίων επί τόπου.

Οι ανοσοδοκιμασίες, ο ακρογωνιαίος λίθος αυτών των τεχνικών, λειτουργούν με τη μέτρηση του επιπέδου δέσμευσης αντιγόνου-αντισώματος για να εξακριβωθεί η συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας στο δείγμα. Μεταξύ αυτών, οι ενζυμικές ανοσοδοκιμασίες όπως η ELISA προσφέρουν ιδιαίτερα αυξημένη ευαισθησία στην ανίχνευση αναλυόμενης ουσίας. Η ανάπτυξη μιας ανοσοδοκιμασίας τυπικά τηρεί τις στρατηγικές αρχές όπου παράγονται και χρησιμοποιούνται αντιγόνο-ειδικά αντισώματα είτε για τη σύλληψη του αντιγόνου σε ένα βιολογικό δείγμα είτε αντίστροφα (Goel, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2014).

Μια θεμελιώδης προϋπόθεση για την ανάπτυξη της ανοσοδοκιμασίας έγκειται στην εξασφάλιση αντισωμάτων με την επιθυμητή συγγένεια και ειδικότητα. Αυτό απαιτεί το αρχικό στάδιο της παρασκευής ενός ανοσογόνου με μοριακό βάρος προσαρμοσμένο, ώστε να προκαλεί την ανοσολογική απόκριση του ζώου. Τα αναπτυξιακά στάδια μιας ανοσοδοκιμασίας περιλαμβάνουν την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό απτενίου και ανοσογόνου, τη σύζευξη του απτενίου με έναν μακρομοριακό φορέα που ακολουθείται από καθαρισμό, την ανοσοποίηση των ζώων-ξενιστών για παραγωγή αντισωμάτων και τη βελτιστοποίηση της δοκιμασίας.

Δεδομένου του χαμηλού μοριακού βάρους των περισσότερων φυτοφαρμάκων, η ικανότητά τους να διεγείρουν μια ανοσολογική απόκριση είναι συνήθως ανεπαρκής. Κατά συνέπεια, η παραγωγή αντισωμάτων κατά των παρασιτοκτόνων-απτενίων απαιτεί την ομοιοπολική σύνδεση του απτενίου με μια πρωτεΐνη φορέα για τη σύνθεση του ανοσογόνου. Η ανοσοχημεία του απτενίου παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη αντισωμάτων. Οι κρίσιμες εκτιμήσεις στην παρασκευή ανοσογόνου περιλαμβάνουν τη θέση σύζευξης με τον φορέα, το μήκος των διαχωριστών σύζευξης, την επιλογή βελτιστοποιημένων φορέων, τη διαδικασία σύζευξης και τον αριθμό των απτενίων που είναι συνδεδεμένα σε ένα μόριο φορέα. Η χρήση διαχωριστών C3-C6 κρίνεται βέλτιστη για τη διασφάλιση της σωστής έκθεσης σε απτένιο, καθώς τα υπερβολικά μακριά διαχωριστικά μπορεί να εμποδίσουν αυτήν την έκθεση.

Η δομική τροποποίηση των φυτοφαρμάκων είναι επιτακτική για να διασφαλιστεί ότι τα απτένια περιέχουν αντιδραστικές ομάδες, αρωματικούς δακτυλίους ή δακτυλίους ετεροατόμων. Το απτένιο πρέπει να διαθέτει μια δραστική λειτουργική ομάδα όπως -COOH, -NH₂ ή -OH για άμεση σύζευξη με πρωτεΐνες φορείς. Εναλλακτικά, μπορεί να απαιτείται προηγούμενη τροποποίηση για να εισαχθεί τουλάχιστον μία από αυτές τις αντιδραστικές ομάδες. Για παράδειγμα, σκιαγραφούνται δύο προσεγγίσεις για την παρασκευή chlorpyrifos-hapten, που εξαρτάται από τη θέση σύνδεσης του διαχωριστικού βραχίονα: τροποποίηση του αρωματικού δακτυλίου ή της θεοφωσφορικής ομάδας ενώ διατηρείται το τμήμα του δακτυλίου πυριδυλίου (Hua *et al.*, 2012; Goel, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2014).

Η προσάρτηση του απτενίου σε μακρομοριακούς φορείς συνεπάγεται τη χρήση διαφόρων μεθόδων που εξαρτώνται από τη χημική δομή των απτενίων. Αυτές οι μέθοδοι περιλαμβάνουν (Goel, 2013):

- Τα απτένια που περιέχουν καρβοξύλιο μπορούν να συνδεθούν με τον φορέα μέσω ενεργού εστέρα N-υδροξυηλεκτριμιδίου/άνθρακα-διιμίνης ή του πρωτοκόλλου αντιδραστηρίου Woodward.
- Τα αμινο-περιέχοντα απτένια μπορούν να συζευχθούν με φορείς χρησιμοποιώντας πρωτόκολλα γλουταραλδεϋδης, δισοκυανικού, αλογονο-νιτροβενζολίου, εστέρα διιμίνης ή διαζωτοποίησης.
- Τα απτένια που περιέχουν υδροξύλιο μπορούν να συνδεθούν απευθείας στον φορέα χρησιμοποιώντας ηλεκτρικό ανυδρίτη ή το πρωτόκολλο αζωβενζοϊκού οξέος.
- Τα απτένια που περιέχουν καρβονύλιο (κετόνη ή αλδεϋδη) συνδέονται τυπικά με φορείς χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο αμινο-οξ-οξικού οξέος.
- Χρήση ομοιογενών ή ετερογενών διλειτουργικών αντιδραστηρίων για σύζευξη.

Ο καθαρισμός του συζεύγματος που προορίζεται για χρήση ως ανοσογόνο είναι επιτακτική ανάγκη για την πρόληψη της δημιουργίας μη ειδικών αντισωμάτων και ανεπιθύμητων διασταυρούμενων αντιδράσεων πολυκλωνικών αντιορών. Ο διαχωρισμός του συζυγούς από τα μη συζευγμένα απτένια επιτυγχάνεται μέσω καθαρισμού ή διήθησης γέλης. Ο καθαρισμός αποδίδει ένα πλήρως καθαρισμένο αντιγόνο, που χρησιμοποιείται με επιτυχία για το Acephate και το Fenthion. Εναλλακτικά, η διήθηση γέλης (Sephadex G-25) έχει χρησιμοποιηθεί για τον διαχωρισμό των συζυγών bromophos και chlorpyrifos-πρωτεΐνης από μη συζευγμένα απτένια. Οι αναφορές περιγράφουν επίσης λεπτομερώς τον διαχωρισμό συζυγών cyanophos-πρωτεΐνης μέσω διήθησης γέλης που ακολουθείται από τον καθαρισμό (Hua *et al.*, 2012).

Διάφορα θερμόαιμα ζώα, όπως ποντίκια, κουνέλια, κατσίκες ή κοτόπουλα μπορούν να ανοσοποιηθούν με το συζυγές απτενίου-πρωτεΐνης για φυτοφάρμακα. Τα κουνέλια επιλέγονται κυρίως για την ευκολία χειρισμού, την ταχεία απόκριση, την επαρκή παραγωγή αντιορού και την παρατεταμένη διάρκεια ζωής τους. Τόσο τα πολυκλωνικά όσο και τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν συμβάλει καθοριστικά στην ανάπτυξη ανοσοδοκιμασίας φυτοφαρμάκων. Αν και τα μονοκλωνικά αντισώματα (mAbs) προσφέρουν πλεονεκτήματα όπως σταθερά χαρακτηριστικά και σταθερή παροχή, τα πολυκλωνικά αντισώματα παραμένουν διαδεδομένα λόγω της επίπονης και δαπανηρής φύσης της παραγωγής mAb. Η ανοσοποίηση τυπικά περιλαμβάνει πολλαπλές ενέσεις μικρών όγκων εμβολιασμού σε διάφορα σημεία, με δόσεις που χορηγούνται σε τακτά χρονικά διαστήματα. Η συλλογή αίματος ακολουθεί κάθε δόση για την απόκτηση αντιορών (Hua *et al.*, 2012; Mahmoudi *et al.*, 2014).

Μια επιπλέον οδός για την απόκτηση αντισωμάτων περιλαμβάνει τη χρήση τεχνικών μηχανικής ανασυνδυασμένων αντισωμάτων, που αντιπροσωπεύουν προηγμένα ανοσοαντιδραστήρια. Η *in vitro* παραγωγή ανασυνδυασμένων αντισωμάτων (rAbs) ή θραυσμάτων τους (π.χ. scFv ή Fab) διευκολύνεται μέσω της δημιουργίας βιβλιοθηκών τμημάτων γονιδίου αντισώματος που ακολουθείται από εμφάνιση φάγου, ριβοσωματική εμφάνιση ή εμφάνιση ζυμομύκητα. Αντισώματα με επιθυμητές εξειδικεύσεις και συγγένειες, προσαρμοσμένα από τοποκατευθυνόμενες μεταλλάξεις, μπορούν έτσι να επιλεγούν. Αντισώματα μεταβλητού θραύσματος μονής αλυσίδας (scFv) έχουν δημιουργηθεί μέσω εμφάνισης φάγων έναντι πολυάριθμων φυτοφαρμάκων όπως το parathion, το methamidophos και η fenitrothion.

Τα αντισώματα που λαμβάνονται μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη ανοσοπροσδιορισμών σε διάφορες μορφές, που κατηγοριοποιούνται ευρέως ως "ανταγωνιστικά" και "μη ανταγωνιστικά". Οι ανταγωνιστικές δοκιμασίες βασίζονται στον ανταγωνισμό μεταξύ στερεάς φάσης (δεσμευμένου) και διαλυτού αντιγόνου για περιορισμένα αντισώματα, παρέχοντας πληροφορίες για τις μη κατειλημμένες θέσεις δέσμευσης αντισωμάτων. Αυτή η προσέγγιση ευνοείται για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων λόγω της ευαισθησίας του, με μείωση της απορρόφησης που αντιστοιχεί σε αύξηση της συγκέντρωσης φυτοφαρμάκων. Μια εξαιρετικά ευαίσθητη ανοσοδοκιμασία μπορεί να υπερηφανεύεται για ένα χαμηλό όριο ανίχνευσης (DL), που απαιτεί υψηλή συγγένεια μεταξύ του αντισώματος και της αναλυόμενης ουσίας. Έχουν παρασχεθεί εκτενείς επισκοπήσεις ανοσοδοκιμών που αναπτύχθηκαν για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων, με επακόλουθες μελέτες που περιγράφουν λεπτομερώς την ανάπτυξη εξαιρετικά ευαίσθητων ELISA έναντι διαφόρων φυτοφαρμάκων μετά το 2001, συμπεριλαμβανομένων των ορίων ανίχνευσης (LOD) και των τιμών I_{50} (Hua *et al.*, 2012; Goel, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2014).

Οι ενζυμικές δοκιμασίες, αν και είναι γρήγορες για τον έλεγχο εντομοκτόνων, μπορεί να μην έχουν ειδικότητα μεταξύ παρόμοιων φυτοφαρμάκων. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα των ELISA προς δομικά παρόμοια φυτοφάρμακα υπογραμμίζει τη σημασία της αξιολόγησης πιθανών διασταυρούμενων αντιδράσεων πριν από την εφαρμογή. Αυτό περιλαμβάνει τη σύγκριση τυπικών καμπυλών της υπό διερεύνηση αναλυόμενης ουσίας με παρόμοια απτένια, χρησιμοποιώντας ως σημεία αναφοράς συγκεντρώσεις αναλυόμενης ουσίας στην καμπύλη αναστολής 50%. Αξιοσημείωτες περιπτώσεις διασταυρούμενης αντιδραστικότητας υπογραμμίζουν την ανάγκη για ενδελεχή αξιολόγηση της δοκιμασίας για να διασφαλιστεί η ακριβής ανίχνευση φυτοφαρμάκων (Hua *et al.*, 2012, 2012; Goel, 2013; Mahmoudi *et al.*, 2014).

4. Όρια και MRL φυτοφαρμάκων σε μέλι

Η παγκόσμια κατανάλωση φυτοφαρμάκων το 2019 ήταν περίπου 4,19 εκατομμύρια μετρικοί τόνοι, όπου η Κίνα ήταν μακράν η μεγαλύτερη χώρα κατανάλωσης φυτοφαρμάκων (1,76 εκατομμύρια μετρικοί τόνοι), ακολουθούμενη από τις Ηνωμένες Πολιτείες (408 χιλιάδες τόνους), τη Βραζιλία (377 χιλιάδες τόνους) και Αργεντινή (204 χιλιάδες τόνους) (Fernández-López *et al.*, 2017). Στη νοτιοανατολική Ασία, ο ΠΟΥ ανέφερε ετήσια αύξηση στη χρήση φυτοφαρμάκων με το 20% των αναπτυσσόμενων χωρών να είναι καταναλωτές φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων της Καμπότζης, του Λάος και του Βιετνάμ. Η Ινδία ανήκει σε μία από τις μεγαλύτερες χώρες παραγωγής φυτοφαρμάκων στην Ασία, έχοντας 90 χιλιάδες τόνους ετήσια παραγωγή οργανοχλωρικών φυτοφαρμάκων, συμπεριλαμβανομένων εξαχλωριούχου βενζολίου και DDT (Pathak *et al.*, 2022). Μεταξύ 2010 και 2014, η μέση αναλογία κόστους/οφέλους ήταν 0,645 g συνολικών φυτοφαρμάκων ανά κιλό απόδοσης καλλιέργειας, με μέση ετήσια κατανάλωση 2,784 kg / εκτάριο. Η Ιαπωνία (18,94 kg ha⁻¹) είχε τη μεγαλύτερη μέση χρήση φυτοφαρμάκων από το 2010 έως το 2014, ακολουθούμενη από την Κίνα (10,45 kg ha⁻¹), το Μεξικό (7,87 kg ha⁻¹), τη Βραζιλία (6,16 kg ha⁻¹), τη Γερμανία (5,12 kg ha⁻¹), Γαλλία (4,85 kg ha⁻¹), Ηνωμένο Βασίλειο (4,03 kg ha⁻¹), ΗΠΑ (3,88 kg ha⁻¹) και Ινδία (0,26 kg ha⁻¹) (Zhang *et al.*, 2015).

Ο Πίνακας 12 δείχνει τα μέγιστα υπολειμματικά όρια (MRL) για τα φυτοφάρμακα στο μέλι όπως έχουν υιοθετηθεί από διάφορες χώρες: Βραζιλία (29 φυτοφάρμακα) (Ministério da Agricultura, 2015), Ευρωπαϊκή Ένωση (20 από 279 φυτοφάρμακα) (EFSA, 2015), Ηνωμένο Βασίλειο (21 από 327 φυτοφάρμακα) (Health and Safety Executive, 2016), Ηνωμένες Πολιτείες (4 φυτοφάρμακα) (U.S. Environmental Protection Agency, 2018) και Αυστραλία (5 φυτοφάρμακα) (Food Standards Australia, 2015). Σημειωτέον, ενώ η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης και του Ηνωμένου Βασιλείου παρέχει έναν ολοκληρωμένο κατάλογο MRL για τα φυτοφάρμακα στο μέλι, μόνο 18 και 24, αντίστοιχα, ευθυγραμμίζονται με εκείνα που αναφέρονται στη νομοθεσία της Βραζιλίας. Αντίθετα, η νομοθεσία από τις Ηνωμένες Πολιτείες και την Αυστραλία περιλαμβάνει μόνο τέσσερα και πέντε φυτοφάρμακα στο μέλι, αντίστοιχα.

Πίνακας 12. Μέγιστα υπολειμματικά όρια (MRL) φυτοφαρμάκων στο μέλι σύμφωνα με τη νομοθεσία της Βραζιλίας, της Ευρώπης (EE), των Ηνωμένων Πολιτειών, του Ηνωμένου Βασιλείου και της Αυστραλίας

Κατηγορία	Ένωση	Μέγιστα υπολειμματικά όρια (MRL) στο στο μέλι (mg/kg)				
		Βραζιλία	EE	ΗΠΑ	ΗΒ	Αυστραλία
Αλογονωμένο και οργανοχλωρικό	Aldrin*	10	10	-	10	-
	α-Endosulfan* 10	10	10	-	10	-

	4,4-DDE*	10	50	-	50	-
	4,4-DDD*	10	50	-	50	-
	4,4 DDT*	10	50	-	50	-
	Dodecachlor* 10	10	-	-	-	-
	Endrin*	10	10	-	10	-
	Tetradifon*	20	50	-	50	-
	Vinclozolin*	20	50	-	50	-
	Heptachlor*	10	10	-	10	-
	α-HCH*	10	-	-	-	-
	β-HCH*	10	-	-	-	-
Καρβαμιδικά	γ-HCH	10	-	-	-	-
	Carbofuran*	50	10	-	10	-
	Carbaryl*	20	50	-	50	-
	Captan*	20	50	-	50	-
Πυρεθροειδή	Fluvalinate*	-	50	-	50	-
	Flumethrin*	-	-	20	-	10
	Permethrin*	20	-	-	-	5
	Cyfluthrin*	20	50	-	50	-
	Fenpropathrin* 10	10	-	-	-	-
	Deltamethrin	20	30	-	30	-
Οργανοφωσφορικά	Coumaphos*	200	-	200	-	-
	Chlorpyrifos*	-	-	150	-	-
	Dimethoate*	20	-	-	-	-
	Disulfoton*	20	-	-	-	-
	Pirimiphos methyl*	10	10	-	10	-
	Parathion*	50	-	-	-	-
	Fenamiphos*	20	-	-	-	-
	Terbufos*	10	10	-	10	-
	Profenofos	10	-	-	-	-
	Coumaphos*	20	-	-	-	-
	Chlorpyrifos*	-	10	-	10	-
	Profenofos*	-	50	-	50	-
Πυραζόλη	Fenpyroximate nf	-	50	-	50	-
	Fipronil	-	5	100	5	-

*Φυτοφάρμακα για τα οποία η Βραζιλία καθόρισε όρια σύμφωνα με το Εθνικό Σχέδιο Ελέγχου για Υπολείμματα και Ρύπους (PNCRC) του Υπουργείου Γεωργίας, Κτηνοτροφίας και Προμήθειας Τροφίμων (Ministério da Agricultura, 2015)

Τα προγράμματα παρακολούθησης για τα φυτοφάρμακα στο μέλι επικεντρώνονται κυρίως στα ακαρεοκτόνα, που χρησιμοποιούνται για τη διαχείριση του *Varroa jacobsoni* (Satta *et al.*, 2005). Ορισμένες μελέτες έχουν επίσης αντιμετωπίσει τα φυτοφάρμακα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των καλλιεργειών και αυτά που εισάγονται στις κυψέλες από τις μέλισσες (Faucon *et al.*, 2005).

Η παρουσία φυτοφαρμάκων στο μέλι έχει διερευνηθεί σε πολλές χώρες, μεταξύ των οποίων Κίνα, Σερβία, Αίγυπτος, Ταϊλάνδη, Ιράν, Ελλάδα, Κολομβία, Μαλαισία, Βραζιλία, Ιταλία, Πολωνία, Ισπανία, Βοσνία-Ερζεγοβίνη, Γαλλία, Αργεντινή, Ηνωμένες Πολιτείες, Τουρκία και Ινδία. Υψηλή εμφάνιση του coumaphos παρατηρήθηκε από τους Balayiannis and Balayiannis (2008) (74%), του carbendazim από τους Wiest *et al.* (2011)–64%, και της κλοθειανιδίνης από τους Kujawski and Namieśnik (2011)–65%. Ο μεταβολίτης της αμιτράζης, N-2,4-διμεθυλοφαινυλο-N-μεθυλοφορμαμίδίνη, ανιχνεύθηκε σε 127 δείγματα μελιού σε συγκεντρώσεις έως 20 mg/kg, που είναι χαμηλότερες από το MRL. Υψηλά ποσοστά δειγμάτων από την Ουγγαρία, την Κίνα, τις Ηνωμένες Πολιτείες, την Αργεντινή και την Ιαπωνία ήταν θετικά για την ένωση amitraz (92%, 81%, 60%, 58% και 32%, αντίστοιχα), υποδεικνύοντας ότι έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως (Nakajima *et al.*, 2015). Κάποιες άλλες μελέτες, βρήκαν υψηλή επικράτηση χλωροφαινόλων, τριαζόλης, χλωροπυριφός αιθυλίου, μαλαθείου και πυρεθροειδών στο μέλι. Ωστόσο, ο αριθμός των δειγμάτων που αναλύθηκαν ήταν μικρός (r6) και δεν ήταν στατιστικά αντιπροσωπευτικός (Fan, Li and Cao, 2015). Οι Wang *et al.* (2010) βρήκαν οργανοχλωριούχα φυτοφάρμακα στο 100% των δειγμάτων που αναλύθηκαν. Το εξαχλωροβενζόλιο (68%) και η δικοφόλη (38,9%) ήταν τα οργανοχλωρικά φυτοφάρμακα που ανιχνεύθηκαν συχνότερα στις μελέτες των Malhat *et al.* (2015), και Mukherjee (2009), αντίστοιχα. Αυτό το αποτέλεσμα είναι ανησυχητικό επειδή τα οργανοχλωρίδια είναι ανθεκτικά και βιοσυσσωρεύονται στο περιβάλλον, ο λόγος για τον οποίο έχουν περιοριστεί ή απαγορευτεί η χρήση τους στη γεωργία από το 1978 στις ΗΠΑ και την Ευρώπη. Σύμφωνα με τους Mukherjee (2009), το dicofol χρησιμοποιείται για τον έλεγχο του *Varroa*. Άλλα ακαρεοκτόνα που χρησιμοποιήθηκαν από τους μελισσοκόμους κατά του *Varroa destructor* ανιχνεύθηκαν επίσης σε αυτή τη μελέτη (δηλαδή βρωμοπροπυλικό, τετραδιφόν, μαλαθείο). Μεταξύ των δειγμάτων που αναλύθηκαν, το 81,8% των ανιχνευθέντων φυτοφαρμάκων υπερέβη τα ΑΟΚ της Ευρωπαϊκής Ένωσης.

5. Συμπεράσματα

Η καταλληλότητα της αέριας χρωματογραφίας (GC), της υγρής χρωματογραφίας (LC) και των ανοσολογικών μεθόδων για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως η ευαισθησία, η ειδικότητα, η

πολυπλοκότητα της προετοιμασίας του δείγματος και η φύση των αναλυτών. Ακολουθεί μια σύγκριση για να προσδιοριστεί ποια μέθοδος μπορεί να είναι καταλληλότερη. Τα πλεονεκτήματα της αέριας χρωματογραφίας (GC) είναι η υψηλή ανάλυση και ευαισθησία για πτητικές και ημιπτητικές ενώσεις, το καλά εδραιωμένο πρωτόκολλο που έχει αναπτυχθεί για πολλά φυτοφάρμακα και μπορεί επίσης να συνδυαστεί με ανιχνευτές όπως MS, FID, ECD για συγκεκριμένη και ευαίσθητη ανίχνευση. Κάποιοι περιορισμοί είναι η απαίτηση για παραγωγοποίηση για μη πτητικές ή θερμικά ασταθείς ενώσεις και ότι η προετοιμασία του δείγματος μπορεί να είναι πολύπλοκη και χρονοβόρα. Σχετικά με την υγρή χρωματογραφία (LC), αυτή είναι κατάλληλη για ένα ευρύ φάσμα πολικών και μη πτητικών ενώσεων και συνδυάζεται με ανιχνευτές όπως MS/MS, DAD για υψηλή ευαισθησία και ειδικότητα. Οι ευέλικτες μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων (π.χ. SPE, QuEChERS) την κάνουν ελκυστική μέθοδο ανίχνευσής. Η UPLC προσφέρει ταχύτερους χρόνους ανάλυσης και καλύτερη ποιότητα ανάλυσης, ωστόσο κάποιοι περιορισμοί αποτελούν το κόστος εξοπλισμού και λειτουργίας που μπορεί να είναι υψηλότερο από το GC.

Όσον αφορά τις ανοσολογικές μεθόδους (π.χ. ELISA), παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση λόγω αλληλεπιδράσεων αντιγόνου-αντισώματος, είναι γρήγορες και σχετικά απλές στην εκτέλεση και απαιτούν ελάχιστη προετοιμασία δείγματος. Οι βασικοί περιορισμοί συνδέονται με το ότι η μέθοδος περιορίζεται στα διαθέσιμα αντισώματα και μπορεί να μην καλύπτει όλους τους αναλύτες στόχους. Γενικά παρουσιάζει χαμηλότερη ευαισθησία και υπάρχει υψηλότερος κίνδυνος διασταυρούμενης αντίδρασης σε σύγκριση με τις χρωματογραφικές μεθόδους. Συχνά χρησιμοποιείται για σκοπούς ελέγχου και όχι για την ακριβή ποσοτικοποίηση.

Επομένως σχετικά με την καταλληλότητα των παραπάνω μεθόδων που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία για προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι, οι μέθοδοι LC-MS/MS και GC-MS είναι εξαιρετικά ευαίσθητες και εξειδικευμένες, καθιστώντας τις ιδανικές για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό φυτοφαρμάκων στο μέλι. Σχετικά με το εύρος των αναλυτών, η μέθοδος LC είναι πιο ευέλικτη για ένα ευρύτερο φάσμα αναλυτών, ειδικά για μη πτητικές, πολικές ενώσεις που είναι κοινές στα φυτοφάρμακα. Όσον αφορά την προετοιμασία των δειγμάτων, οι μέθοδοι LC έχουν συχνά πιο απλή προετοιμασία δείγματος σε σύγκριση με το GC για μη πτητικές ενώσεις. Οι ανοσολογικές μέθοδοι είναι απλές αλλά μπορεί να μην προσφέρουν την ολοκληρωμένη ανάλυση που απαιτείται για διάφορα φυτοφάρμακα. Αναφορικά με την ανάλυση των δεδομένων, οι χημειομετρικές μέθοδοι δεν είναι αυτόνομες, αλλά ενισχύουν την ανάλυση δεδομένων από χρωματογραφικές τεχνικές, καθιστώντας τις πολύτιμες για πολύπλοκα σύνολα δεδομένων και βελτιώνοντας τη συνολική αναλυτική απόδοση.

Συμπερασματικά, η Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με Φασματομετρία Μάζας (LC-MS/MS) είναι γενικά πιο κατάλληλη για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων και φυτοφαρμάκων στο μέλι λόγω της ευελιξίας, της υψηλής ευαισθησίας και της εξειδίκευσής του. Μπορεί να χειριστεί ένα ευρύ φάσμα αναλυτών με σχετικά απλή προετοιμασία δειγμάτων. Η αέρια χρωματογραφία είναι επίσης κατάλληλη, ιδιαίτερα για πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις, αλλά μπορεί να απαιτεί πιο πολύπλοκη προετοιμασία δείγματος για μη πτητικές αναλυόμενες ουσίες, ενώ οι ανοσολογικές μέθοδοι είναι χρήσιμες για γρήγορο έλεγχο αλλά όχι τόσο ολοκληρωμένες για λεπτομερή ανάλυση και ποσοτικοποίηση.

6. Βιβλιογραφία

Albero, Beatriz, Consuelo Sánchez-Brunete, and José L. Tadeo. 2004. "Analysis of pesticides in honey by solid-phase extraction and gas chromatography– mass spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(19): 5828-5835.

Alqarni, A. S., Owayss, A. A., & Mahmoud, A. A. (2012). Mineral content and physical properties of local and imported honeys in Saudi Arabia. *Journal of Saudi Chemical Society*, 5, 618 - 625.

Ajtony, Z., Bencs, L., Haraszi, R., Szigeti, J., & Szoboszlai, N. (2007). Study on the simultaneous determination of some essential and toxic trace elements in honey by multi-element graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 71, 683–690.

Amendola, P. Pelosi, R. Dommarco, Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey, *J. Env. Sci. Health* 46 (2011) 24–34

Anastassiades M, Mastovska K, Lehotay SJ. 2003. Evaluation of analyte protectants to improve gas chromatographic analysis of pesticides. *J Chromatogr A*. 1015:163-184.

Andersen, Ø. M., & Markham, K. R. (2006). *Flavonoids Chemistry, Biochemistry and Applications*. In: *Separation and Quantification of Flavonoids*. New York: Taylor e Francis.

A.N. Anthemidis, K.I.G. Ioannou, Recent developments in homogeneous and dispersive liquid-liquid extraction for inorganic elements determination: a review, *Talanta* 80 (2009) 413–421.

G. Amendola, P. Pelosi, R. Dommarco, Solid-phase extraction for multi-residue analysis of pesticides in honey, *J. Env. Sci. Health* 46 (2011) 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(2), 412-431.

C.L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid-phase microextraction with thermal-desorption using fused-silica optical fibers, *Anal. Chem.* 62 (1990) 2145–2148.

J. Atienza, J.J. Jim'enez, J.L. Bernal, M.T. Mart'ín, *J. Chromatogr. A* 655, (1993) 95.

Balayiannis, G. and Balayiannis, P. (2008) 'Bee Honey as an Environmental Bioindicator of Pesticides' Occurrence in Six Agricultural Areas of Greece', Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 55(3), pp. 462–470. doi: 10.1007/s00244-007-9126-x.

Bentabol Manzanares, A., et al. (2014). "Determination of pesticide residues in honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array detection." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62(15), 3249-3256.

Blasco, C., et al. (2003). "Solid-phase extraction clean-up for the determination of pesticide residues in honey." Analytica Chimica Acta, 483(1-2), 89-96.

Bonté, F., & Desmoulière, A. (2013). Le miel: origine et composition. Actualités pharmaceutiques, 531, 18-21.

S. Bonzini, P. Tremolada, I. Bernardinelli, M. Colombo, M. Vighi, Predicting pesticide fate in the hive (part 1): experimentally determined tau-fluvalinate residues in bees, honey and wax, Apidologie 42 (2011) 378–390.

Cavia, M. M., Fernández-Muino, M. A., Alonso-Torre, S. R., Huidobro, J. F., & Sancho, M. T. (2007). Evolution of acidity of honeys from continental climates: Influence of induced granulation. Food Chemistry, 100, 1728–1733.

Campillo, P. Vinas, R. Penalver, J.I. Cacho, M. Hernandez-Cordoba, Solid-phase microextraction followed by gas chromatography for the speciation of organotin compounds in honey and wine samples: A comparison of atomic emission and mass spectrometry detectors, J. Food Compos. Anal. 25 (2012), 66–73.

Chaimanee, Veeranan, Josephine Johnson, and Jeffery S. Pettis. (2022) "Determination of amitraz and its metabolites residue in honey and beeswax after Apivar® treatment in honey bee (*Apis mellifera*) colonies." *Journal of Apicultural Research* 61, 213-218.

O. Chienthavorn, K. Dararuang, A. Sasook, N. Ramnut, Purge and trap with monolithic sorbent for gas chromatographic analysis of pesticides in honey, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 955–964.

E. Cieslik, A. Sadowska-Rociek, J.M.M. Ruiz, M. Surma-Zadora, Evaluation of QuEChERS method for the determination of organochlorine pesticide residues in elected groups of fruits, Food Chem. 125 (2011) 773–778.

Ciulu, M., Solinas, S., Floris, I., Panzanellia, A., Pilo, M. I., Piu, P. C., et al. (2011). RP- HPLC determination of water-soluble vitamins in honey. Talanta, 83, 924–929.

D. Debayle, G. Dessalces, M.F. Grenier-Loustalot, Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 391 (2008) 1011–1020.

N.K. Dubey, R. Shukla, A. Kumar, P. Singh, B. Prakash Prospects of botanical pesticides in sustainable agriculture *Curr. Sci.*, 98 (4) (2010), pp. 479-480.

Z. Du, M. Liu, G.K. Li, Novel magnetic SPE method based on carbon nanotubes filled with cobalt ferrite for the analysis of organochlorine pesticides in honey and tea, *J. Sep. Sci.* 36 (2013) 3387–3394.

EC—European Commission . Guidance Document on Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed. DG SANTE; Bruxelles, Belgium: 2019. 46p SANTE/12682/2019.

Escuredo, O., Míguez, M., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2013). Nutritional value and antioxidant activity of honeys produced in a European Atlantic area. *Food Chemistry*, 138, 851–856

Escuredo, O., Dobre, I., Fernández-González, M., & Seijo, M. C. (2014). Contribution of botanical origin and sugar composition of honeys on the crystallization phenomenon. *Food Chemistry*, 149, 84-90.

Fan, C., Li, N. and Cao, X. (2015) ‘Determination of chlorophenols in honey samples using in-situ ionic liquid-dispersive liquid–liquid microextraction as a pretreatment method followed by high-performance liquid chromatography’, *Food Chemistry*, 174, pp. 446–451. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.11.050.

Farajzadeh, M. A., et al. (2016). "Determination of Organophosphorus Pesticides in Honey by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry." *Food Chemistry*, 192, 108-114.

M.A. Farajzadeh, M.R.A. Mogaddam, H. Ghorbanpour, Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection, *J. Chromatogr. A* 1347 (2014) 8-16.

Faucon, J. et al. (2005) ‘Experimental study on the toxicity of imidacloprid given in syrup to honey bee (*Apis mellifera*) colonies’, *Pest Management Science*, 61(2), pp. 111–125. doi: 10.1002/ps.957.

Fernández-López, M. G. et al. (2017) 'Enhancing methyl parathion degradation by the immobilization of Burkholderia sp. isolated from agricultural soils', *MicrobiologyOpen*, 6(5). doi: 10.1002/mbo3.507.

Fernandez, M., et al. (2006). "Determination of pesticide residues in honey by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 1108(1-2), 185-194

T.R. Fukuto, Relationships between the structure of organophosphorus compounds and their activity as acetylcholinesterase inhibitors, *Bulletin of the World Health Organization.*, 44 (1–3) (1971), pp. 31-42.

Garrettson, L.K., 1993. Chapter 9 – Poisoning. *Neurologic Emergencies in Infancy and Childhood (Second Edition)* 136-166.

M. Garcia-Chao, M.J. Agruna, G.F. Calvete, V. Sakkas, M. Llompart, T. Dagnac, Validation of an off line solid phase extraction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of systemic insecticide residues in honey and pollen samples collected in apiaries from NW Spain, *Anal. Chim. Acta* 672 (2010) 107–113.

Garcia, F.P., Ascencio, S.Y.C., Oyarzun, J.G., Hernandez, A.C. and Alavarado, P.V., 2012. Pesticides: classification, uses and toxicity. Measures of exposure and genotoxic risks. *J. Res. Environ. Sci. Toxicol*, 1(11), 279-293.

Gaweł, Marta, Tomasz Kiljanek, Alicja Niewiadowska, Stanisław Semeniuk, Milena Golsizek, Olga Burek, and Andrzej Posyniak. 2019. "Determination of neonicotinoids and 199 other pesticide residues in honey by liquid and gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry." *Food Chemistry* 282,36-47.

Gómez-Pérez, María Luz, et al. "Simultaneous determination of multi-class pesticides in honey using ultra-high-performance liquid chromatography coupled to high-resolution Orbitrap mass spectrometry." *Food Chemistry*, vol. 228, 2017, pp. 177-187.

Goel, P. (2013) 'Immunodiagnosis of pesticides: a review.', *Journal of Biotechnology*, 12(52), pp. 7158–7167. doi: 10.5897/AJBX2013.13478.

Gupta, R.C., Crissman, J.W, 2013. Chapter 42 - Agricultural Chemicals. Haschek and Rousseaux's *Handbook of Toxicologic Pathology (Third Edition)* II (2013) 1349-1372.

Health and Safety Executive (2016) Maximum Residue Level (MRL) Database. (<https://secure.pesticides.gov.uk/MRLs/main.asp>).

Han, L., Sapozhnikova, Y., & Lehotay, S. J. (2018). Analysis of pesticides and environmental contaminants in honey using gas chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(1), 182-192

Herrera, A., Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Arino, A., & Llobat, L. (2017). Analytical methods for pesticide residues in honey. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 907-929.

Hua, X. et al. (2012) 'Development of an Enzyme Linked Immunosorbent Assay and an Immunochromatographic Assay for Detection of Organophosphorus Pesticides in Different Agricultural Products', *PLoS ONE*. Edited by S. Kaveri, 7(12), p. e53099. doi: 10.1371/journal.pone.0053099. Haffeejee, I.E.; Moosa, A. Honey in the treatment of infantile gastroenteritis. *BMJ* 1985, 290, 1866–1867.

Burgett, Charles A.; Smith, Douglas H.; Bente, H.Bryan (1977). "The nitrogen-phosphorus detector and its applications in gas chromatography". *Journal of Chromatography A*. 134 (1): 57–64.

Jin, X., Liu, C., & Jia, Q. (2020). Recent Advances and Future Trends in Flame Photometric Detector. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2020.

Jovanov, P., Guzsvány, V., Lazić, S., Franko, M., Sakač, M., Šarić, L., & Kos, J. (2015). Development of HPLC-DAD method for determination of neonicotinoids in honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 40, 106–113.

Jurado-Sánchez, B., Ballesteros, E., & Gallego, M. (2011). Gas chromatographic determination of 29 organic acids in foodstuffs after continuous solid-phase extraction. *Talanta*, 84, 924–930.

Kamal, M. A. & Klein, P. (2011). Determination of sugars in honey by liquid chromatography. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18, 17-21.

S.G. Kamita, K.-D. Kang, B.D. Hammock, A.B. Inceoglu, Genetically modified baculoviruses for pest insect control comprehensive molecular insect, *Science*, 6 (2005), pp. 271-322.

Kamel, Alaa. "Refined methodology for the determination of neonicotinoid pesticides and their metabolites in honey bees and bee products by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). (2010). " *Journal of agricultural and food chemistry* 58, 5926-5931.

Karabagias, I.K., Badeka, A., Kontakos, S., Karabournioti, S., & Kontominas, M.G. (2014). Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics. *Food Chemistry*, 146, 548–557.

Korta, E., A. Bakkali, L. A. Berrueta, B. Gallo, F. Vicente, V. Kilchenmann, and S. Bogdanov. 2001. "Study of acaricide stability in honey. Characterization of amitraz degradation products in honey and beeswax." *Journal of Agricultural and food Chemistry* 49, 5835-5842.

Kujawski, M. W. and Namieśnik, J. (2011) 'Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS', *Food Control*, 22(6), pp. 914–919. doi: 10.1016/j.foodcont.2010.11.024.J.J. Jim'enez, J. Atienza, J.L. Bernal, J. High Resolut. Chromatogr. 18, (1995) 367.

M.W. Kujawski, A. Barganska, K. Marciniak, E. Miedzianowska, J.K. Kujawski, M. Slebiada, J. Namiesnik, Determining pesticide contamination in honey by LC-ESI-MS/MS-Comparison of pesticide recoveries of two liquid-liquid extraction based approaches, *LWT-Food Sci. Technol.* 56 (2014) 517–523.

M.W. Kujawski, J. Namiesnik, Levels of 13 multi-class pesticide residues in Polish honeys determined by LC-ESI-MS/MS, *Food Control* 22 (2011), 914–919.

Kumar S., Pandey A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. *Sci. World J.* 2013:1–16.

Lee, M. L., & Markides, K. E. (1979). The Electron Capture Detector and its Analytical Applications in Gas Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 17(12), 565-582.

León-Ruiz, V., Vera, S., González-Porto, A. V., & Andrés, M. P. S. (2013). Analysis of water-soluble vitamins in honey by isocratic RP-HPLC. *Food Analytical Methods*, 6, 488–496.

Lehotay, S. J., et al. (2010). "Validation of a fast and easy method for the determination of pesticide residues in honey using liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(10), 5884-5891.

Li S., Chen G., Zhang C., Wu M., Wu S., Liu Q. Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. *Food Sci. Hum. Wellness*. 2010;3:110–116.

López-Blanco, R., et al. (2014). "Determination of Organophosphorus Pesticides in Honey by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) after Liquid-Liquid Extraction." *Food Chemistry*, 151, 63-69.

Lu, Q., [et al.]. (2018). Determination of Pesticide Residues in Honey Samples by Gas Chromatography with Nitrogen-Phosphorus Detection. *Journal of Chromatography A*, 1543, 96-104.

Mahmoudi, R. et al. (2014) Detection of oxytetracycline residues in honey samples using ELISA and HPLC methods.

Malhat, F. M. et al. (2015) 'Residues of organochlorine and synthetic pyrethroid pesticides in honey, an indicator of ambient environment, a pilot study', *Chemosphere*, 120, pp. 457–461. doi: 10.1016/j.chemosphere.2014.08.032.

Manzanares, A. B.; García, H., Galdón, B. R., Rodríguez, E. R. & Romero, C. D. (2014). Physicochemical characteristics of minor monofloral honeys from Tenerife, Spain. *Food Science and Technology*, 55, 572-578.

Moliner-Martínez, Y., Plaza-Bolaños, P., Uclés, S., Fernández-Alba, A. R., & Font, G. (2015). Multi-class determination of veterinary drug residues in honey using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1387, 79-89.

Ministério da Agricultura (2015) Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa SDA nº 13, de 15 de julho de 2015. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2015, pp. 5.

Mukherjee, I. (2009) 'Determination of Pesticide Residues in Honey Samples', *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 83(6), pp. 818–821. doi: 10.1007/s00128-009-9772-y.

Menkissoglu-Spiroudi, Urania, Grigorios C. Diamantidis, Vassiliki E. Georgiou, and Andreas T. Thrasyvoulou. 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, 178-182.

M. Moniruzzaman, M.A.Z. Chowdhury, M.A. Rahman, S.A. Sulaiman, S.H. Gan, Determination of mineral, trace element, and pesticide levels in honey samples originating from different regions of Malaysia compared to Manuka Honey, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 1–10.

Mukherjee, Determination of pesticide residues in honey samples, *Bull. Env. Contam. Toxicol.* 83 (2009) 818–821.

Martel, Anny-Isabelle, et al. "Liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry for pesticide residue analysis in honey." *Talanta*, vol. 156-157, 2016, pp. 180-187.

E.S. Mizubuti, V.L. Júnior, G.A. Forbes Management of late blight with alternative products *Pest Technol.*, 2 (2007), pp. 106-116.

E.J. Mrema, F.M. Rubino, G. Brambilla, A. Moretto, A.M. Tsatsakis, C. Colosio, Persistent organochlorinated pesticides and mechanisms of their toxicity, *Toxicology.*, 307 (2013), pp. 74-88.

Moreira, R. F. A., Maria, C. A. B., Pietroluongo, M., & Trugo, L. C. (2010). Chemical changes in the volatile fractions of Brazilian honeys during storage under tropical conditions. *Food Chemistry*, 121, 697–704.

Narahashi, 1996 T. Narahashi, Neuronal ion channels as the target sites of insecticides, *Pharmacology and Toxicology*, 79 (1) (1996), pp. 1-14.

Nakajima, T. et al. (2015) 'Determination and surveillance of nine acaricides and one metabolite in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry', *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(7), pp. 1099–1104. doi: 10.1080/19440049.2015.1050460.

Neilson A.P., Goodrich K.M., Ferruzzi M.G. Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease. 4th ed. Elsevier Inc.; San Diego, CA, USA: 2017. Bioavailability and metabolism of bioactive compounds from foods; pp. 301–320.

T. Nilsson, in *Encyclopedia of Separation Science*, 2000.

Orso, Débora, Manoel L. Martins, Filipe F. Donato, Tiele M. Rizzetti, Magali Kemmerich, Martha B. Adaime, and Renato Zanella. 2014. "Multiresidue determination of pesticide residues in honey by modified QuEChERS method and gas chromatography with electron capture detection." *Journal of the Brazilian Chemical Society* 25,1355-1364.

Oymen, Beste, Süleyman Aşır, Deniz Türkmen, and Adil Denizli. (2022) "Determination of multi-pesticide residues in honey with a modified QuEChERS procedure followed by LC-MS/MS and GC-MS/MS." *Journal of Apicultural Research* 61, 530-542.

Passarella, S. et al. (2022) 'Dataset of PAHs determined in home-made honey samples collected in Central Italy by means of DLLME-GC-MS and cluster analysis for studying the source apportionment', *Data in Brief*, 42, p. 108136. doi: 10.1016/j.dib.2022.108136.

Pathak, V. M. et al. (2022) 'Current status of pesticide effects on environment, human health and it's eco-friendly management as bioremediation: A comprehensive review', *Frontiers in Microbiology*, 13. doi: 10.3389/fmicb.2022.962619.

S. Panseri, A. Catalano, A. Giorgi, F. Arioli, A. Procopio, D. Britti, L.M. Chiesa, Occurrence of pesticide residues in Italian honey from different areas in relation to its potential contamination sources, *Food Control* 38 (2014), 150–156.

C. Pirard, J. Widart, B.K. Nguyen, C. Deleuze, L. Heudt, E. Haubruge, E. Pauw, J. F. Focant, Development and validation of a multi-residue method for pesticide determination in honey using on-column liquid-liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1152, (2007) 116–123.

A.S. Perry, I. Yamamoto, I. Ishaaya, R.Y. Perry, *Insecticides in agriculture and environment: Retrospects and prospects* Springer Science & Business Media (2013).

Perez, R. A., Sanchez-Brunete, C., Albero, B., Tadeo, J. L. (2013). Determination of pesticides in honey by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection and mass spectrometric confirmation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(21), 5041-5049. doi:10.1021/jf4009094.

O.D. Prestes, C.A. Friggi, M.B. Adaime, R. Zanella, QuEChERS-Um método moderno de preparo de amostra para determinação multiresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas, *Quim. Nova* 32 (2009) 1620–1634.

Prestes, O. D., et al. (2009). "QuEChERS: a modern sample preparation method for the determination of pesticide residues in food by chromatographic methods coupled to mass spectrometry." *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2538-2547.

Pyrzynska, K. & Biesaga, M. (2009). Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 893-902.

R.S. Rattan Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin *Crop Prot.*, 29 (9) (2010), pp. 913-920.

Robb, E.L. and Baker, M.B., 2017. Organophosphate toxicity.

F.H. Salami, M.E.C. Queiroz, Microextraction in packed sorbent for the determination of pesticides in honey samples by gas chromatography coupled to mass spectrometry, *J. Chromatogr. Sci.* 51 (2013) 899–904.

M. Safarikova, I. Safarik, Magnetic solid-phase extraction, *J. Magn. Magn. Mater.* 194 (1999) 108–112.

M. Sajid, K. Alhooshani, Dispersive liquid-liquid microextraction based binary extraction techniques prior to chromatographic analysis: a review. *TrAC Trends Anal. Chem.* 108 (2018), 167–182

M.R.F. Sampaio, D. Tomasini, L.V. Cardoso, S.S. Caldas, E.G. Primel, Determination of pesticide residues in sugarcane honey by QuEChERS and liquid chromatography, *J. Braz. Chem. Soc.* 23 (2012) 197–205.

Satta, A. et al. (2005) 'Formic Acid-Based Treatments for Control of *Varroa destructor* in a Mediterranean Area', *Journal of Economic Entomology*, 98(2), pp. 267–273. doi: 10.1093/jee/98.2.267.

Shamsipur, Mojtaba, Najmeh Yazdanfar, and Mahnaz Ghambarian. 2016. "Combination of solid-phase extraction with dispersive liquid–liquid microextraction followed by GC–MS for determination of pesticide residues from water, milk, honey and fruit juice." *Food chemistry* 204, 289-297.

Sghaier, M. B., Skandrani, I., Nasr, N., Franca, M. D., Chekir-Ghedira, L., & Ghedira, K. (2011). Flavonoids and sesquiterpenes from *Tecurium ramosissimum* promote antiproliferation of human cancer cells and enhance antioxidant activity: A structure–activity relationship study. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 32, 336–348.

S. Singh, S. Bano, S. K. Keshi, U. Singh and A. Agarwal, "Rapid Detection of Paraquat Pesticide in Honey Using SERS-Based Portable Nanosensing Platform," in *IEEE Sensors Letters*, vol. 7, no. 10, pp. 1-4, Oct. 2023, Art no. 6006804.

Skoog, D. A.; Holler, F. J. & Crouch, S. R. (2007). Αρχές ενόργανης ανάλυσης. 6η έκδοση. Αθήνα: Εκδ. Κωσσταράκη.

Smith, C. J., Wang, J., Armstrong, D. W. (2010). Analysis of organophosphorus pesticides by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *Analytical Methods*, 2(6), 736-742. doi:10.1039/C0AY00020K.

Sun, Peng, Shusheng Zheng, Rui Yan, and Yongfu Lian. 2021. "Determination of organophosphorus pesticides using solid-phase extraction followed by gas chromatography–mass spectrometry." *Journal of Chromatographic Science* 60, 1-6.

Tadeo, J.L. (2008). *Analysis of Pesticides in Food and Environmental Samples*, 2nd Edition, New York : CRC Press.

Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Albero, B., García-Valcárcel, A. I., & Pérez, R. A. (2019). Analytical methodologies for determination of pesticide residues in honey. *Trends in Analytical Chemistry*, 112, 130-146.

Thompson, Helen, Sarah Vaughan, Anne-Katrin Mahlein, Erwin Ladewig, and Christine Kenter. 2022. "Is there a risk to honeybees from use of thiamethoxam as a sugar beet seed treatment?." *Integrated Environmental Assessment and Management* 18, 709-721.

J. Vichapong, R. Burakham, S. Srijaranai, In-coupled syringe assisted octanol-water partition microextraction coupled with high-performance liquid chromatography for simultaneous determination of neonicotinoid in-secticide residues in honey, *Talanta* 139 (2015) 21–26.

Wang, J. et al. (2010) ‘Residues of organochlorine pesticides in honeys from different geographic regions’, *Food Research International*, 43(9), pp. 2329–2334. doi: 10.1016/j.foodres.2010.08.006.K.W.

Wang, J., et al. (2013). "Analysis of Pyrethroid Pesticides in Honey Using Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography with Electron Capture Detection." *Food Chemistry*, 140(1-2), 407-412

Wang, J., Leung, D., & Chow, W. (2011). Determination of organophosphorus pesticides in honey using liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17), 9522-9529.

L. Wiest, A. Bulete, B. Giroud, C. Fratta, S. Amic, O. Lambert, H. Pouliquen, C. Arnaudguilhem, 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, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5743–5756.

Wiest, L. *et al.* (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(34), pp. 5743–5756. doi: 10.1016/j.chroma.2011.06.079.

Wang, J., et al. (2013). "High-performance liquid extraction and analysis of pesticides in honey samples." *Journal of Chromatography A*, 1272, 23-30.

L. Ye, Q. Wang, J.P. Xu, Z.G. Shi, L. Xu, Restricted-access nanoparticles for magnetic solid-phase extraction of steroid hormones from environmental and biological samples, *J. Chromatogr. A* 1244 (2012) 46–54.

C.H. Yu, B. Hu, Sol-gel polydimethylsiloxane/poly(vinylalcohol)-coated stir bar sorptive extraction of organophosphorus pesticides in honey and their determination by large volume injection GC, *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 147–153.

C.K. Zacharis, I. Rotsias, P.G. Zachariadis, A. Zotos, Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of organochlorine pesticides residues in honey by gas chromatography-electron capture and ion trap mass spectrometric detection, *Food Chem.* 134 (2012) 1665–1672.

Zhai, Z., Qu, X., Wu, X., Yang, S., & Li, M. (2018). Determination of chlorpyrifos residues in honey using gas chromatography with electron capture detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(10), 2345-2350.

J.H. Zhang, H.X. Gao, B. Peng, S.Q. Li, Z.Q. Zhou, Comparison of the performance of conventional, temperature-controlled, and ultrasound-assisted ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction combined with high-performance liquid chromatography in analyzing pyrethroid pesticides in honey samples, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 6621–6629.

Zhang, Y., et al. (2013). "Application of Liquid-Liquid Extraction for the Detection of Neonicotinoid Pesticides in Honey." *Journal of Chromatography A*, 1293, 28-35.

Zhang, Y. *et al.* (2015) 'Intercalation of herbicide propyzamide into DNA using acridine orange as a fluorescence probe', *Sensors and Actuators B: Chemical*, 206, pp. 630–639. doi: 10.1016/j.snb.2014.09.114.

L. Zhang et al. (2016). "Magnetic solid phase extraction based on molecularly imprinted polymers for the determination of triazolone herbicides in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry." *Analytical Methods*, 8(12), 2714-2722.

Zheng, Weijia, Jin-A. Park, A. M. Abd El-Aty, Seong-Kwan Kim, Sang-Hyun Cho, Jeong-min Choi, Hee Yi et al. (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, 60-69.