ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΠΟΛΥΫΠΟΛΕΙΜΜΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΕ ΧΥΜΟΥΣ ΜΕ LC-MS/MS ΚΑΙ GC-MS^n

Παπαϊωάννου Β.[1,2], Αντώνιου Σ.[2], Τσίπη Δ.[2], Οικονόμου Α.[1] και Μποτίτση Ελ.[2]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2]Γενικό Χημείο του Κράτους, Αν. Τσόχα 16, Αθήνα 11521
e-mail: pesticides@gcsl.gr

Περίληψη

Ο έλεγχος των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης είναι απαραίτητος για την προστασία της ανθρώπινης υγείας. Στην ΕΕ εκτελούνται ετησίως κοινοτικά και εθνικά προγράμματα ελέγχου υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα για τη διερεύνηση της συμφωνίας των επιπέδων των τροφίμων με τα ανώτατα όρια υπολειμμάτων (MRL) που ορίζονται από τον Κανονισμό (ΕΚ) 396/2005 καθώς και για την εκτίμηση της ποσότητας των φυτοφαρμάκων που προσλαμβάνεται μέσω της τροφικής αλυσίδας. Η ταυτόχρονη ανάλυση ενός μεγάλου αριθμού υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε διαφορετικές μήτρες τροφίμων είναι εφικτή μέσω πολυϋπολειμματικών μεθόδων που βασίζονται σε γενικές μεθόδους εκχύλισης σε συνδυασμό με πολυδύναμες τεχνικές ανάλυσης όπως η αεριοχρωματογραφία (GC) και η υγροχρωματογραφία (LC) συζευγμένες με φασματομετρία μαζών (MS) [1, 2].
Στόχος αυτής της εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η επικύρωση και η σύγκριση τριών μεθόδων προετοιμασίας-εκχύλισης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε χυμούς φρούτων: i) η μέθοδος Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (QuEChERS) ii) η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) με φυσίγγια OASIS HLB και iii) η μέθοδος απευθείας έγχυσης. Τα εκχυλίσματα των δειγμάτων χυμών αναλύθηκαν με LC-MS/MS και GC-MS^n για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση περίπου 300 φυτοφαρμάκων. Με τη τεχνική LC-MS/MS προσδιορίστηκαν 203 ενώσεις ενώ 85 ενώσεις προσδιορίστηκαν με τη τεχνική GC-MS^n. Οι τρεις μέθοδοι επικυρώθηκαν σύμφωνα με την κατευθυντήρια οδηγία SANTE /11813/2017 [3]. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η μέθοδος QuEChERS αποτελεί τον πιο ικανοποιητικό συνδυασμό αναλυτικής επίδοσης, χρόνου προπαρασκευής και κόστους.

Λέξεις-Κλειδιά: :Υπολείμματα φυτοφαρμάκων, QuEChERS, SPE, LC-MS/MS, GC-MS^n

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η χρήση των φυτοφαρμάκων και η παρουσία υπολειμμάτων αυτών στα τρόφιμα, στα νερά και στο έδαφος αποτελούν σημαντικό πρόβλημα τόσο για την υγεία του ανθρώπου όσο και για το περιβάλλον. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο έχει θεσπιστεί ο κανονισμός (ΕΚ) 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και της Ευρωπαϊκής Επιτροπής που ορίζει τα Μέγιστα Όρια Υπολειμμάτων (Maximum Residue Limits, MRLs) στα τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης. Ο συγκεκριμένος κανονισμός τροποποιείται συνεχώς, καλύπτοντας δραστικές ενώσεις φυτοπροστατευτικών προϊόντων που χρησιμοποιούνται ή χρησιμοποιούνταν στη γεωργία εντός ή εκτός της ΕΕ . Στις περιπτώσεις που ένα συγκεκριμένο φυτοφάρμακο δεν συμπεριλαμβάνεται, ισχύει ένα γενικό εξ' ορισμού MRL της τάξης των 0,01 mg kg^{-1} [4].

Εκτός από τους κανονισμούς για τα MRLs, η ΕΕ έχει εκδώσει και άλλες οδηγίες που αφορούν τις φυτοπροστατευτικές ουσίες. Οι κανονισμοί που βρίσκονται και σήμερα σε ισχύ είναι ο 1107/2009/ΕΚ σχετικά με τη διάθεση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά και η οδηγία 2009/128/ΕΚ σχετικά με την επίτευξη ορθολογικής χρήσης των γεωργικών φαρμάκων [5,6].

Ο έλεγχος υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών ενώσεων και των μεταβολιτών τους απαιτεί την ανάπτυξη πολυδύναμων μεθόδων με δυνατότητα συνεχούς επέκτασης του αναλυτικού τους πεδίου ώστε να καλύπτεται ο συνεχώς αυξανόμενος και μεταβαλλόμενος κατάλογος των ενώσεων-στόχων. Οι σύγχρονες πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι στηρίζονται σε γενικές μεθόδους εκχύλισης και σε ενόργανες τεχνικές ανάλυσης με δυνατότητα προσδιορισμού πολλαπλών ενώσεων όπως οι τεχνικές GC-MS/MS, GC-HRMS και LC-MS/MS, LC-HRMS.

Η συγκεκριμένη μελέτη έχει στόχο την επικύρωση και την σύγκριση τριών μεθόδων προετοιμασίας δειγμάτων χυμών φρούτων και λαχανικών για την ανίχνευση, την ταυτοποίηση και την ποσοτικοποίηση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων: i) τη μέθοδο Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe (QuEChERS) ii) την εκχύλιση στερεής φάσης (SPE) με μικροστήλες OASIS HLB και iii) τη μέθοδο απευθείας έγχυσης. Η επικύρωση των μεθόδων έγινε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της κατευθυντήριας οδηγίας SANTE 11813/2017.

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν πιστοποιημένες πρότυπες ουσίες φυτοφαρμάκων των οίκων Dr Ehrenstorfer, ChemService, Sigma-Aldrich στην υψηλότερη διαθέσιμη καθαρότητα. Μονήρη διαλύματα παρακαταθήκης προτύπων ουσιών συγκέντρωσης (100-500 μg mL^{-1}) παρασκευάσθηκαν σε ακετονιτρίλιο και ακετόνη (pestiscan grade) και φυλάσσονται στους -20°C . Παρασκευάσθηκαν μίγματα - διαλύματα εργασίας σε επίπεδο συγκέντρωσης 10 μg mL^{-1} από τα μονήρη διαλύματα παρακαταθήκης των φυτοφαρμάκων σε ακετονιτρίλιο, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων βαθμονόμησης και για τον εμβολιασμό των δειγμάτων στα πειράματα ανάκτησης κατά την επικύρωση. Χρησιμοποιήθηκαν ακετονιτρίλιο, μεθανόλη μυρμηγκικό αμμώνιο, LC-MS grade, του οίκου Merck (Darmstadt, Γερμανία) και μυρμηγκικό οξύ του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Γερμανία). Οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, είναι καθαρότητας pesticide grade ενώ στη μέθοδο QuEChERS EN 15662 χρησιμοποιούνται έτοιμα μίγματα αλάτων του οίκου Interchim. Οι μικροστήλες OASIS HLB είναι του οίκου Waters (Mildford, USA).

Προετοιμασία Δείγματος

Μέθοδος *QuEChERS*

Ποσότητα 10.0 g ομογενοποιημένου δείγματος χυμού εκχυλίζεται με 10 mL ακετονιτριλίου, οξινισμένου με 1% οξικό οξύ, υπό μηχανική ανάδευση για 30 λεπτά. Προστίθεται το μίγμα αλάτων ($MgSO_4$ 4 g, Na Citrate 1g, Na Sesquihydrate 0.5 g, NaCl 1 g) της μεθόδου QuEChERS, ακολουθεί έντονη ανατάραξη και φυγοκέντρηση. 5 mL από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε φυγοκεντρικό σωλήνα που περιέχει μίγμα αλάτων (900 mg $MgSO_4$, 250 mg PSA), ακολουθεί ξανά έντονη ανατάραξη και φυγοκέντρηση. Ποσότητα του υπερκειμένου εκχυλίσματος αραιώνεται με νερό για να αναλυθεί με LC-

Παπαϊωάννου Β.[1,2], Μποτίτση Ελ.[2], Αντωνιου Σ.[2], Τσίπη Δ.[2], και Οικονόμου Α.[1]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2]Γενικό Χημείο του Κράτους

MS/MS ενώ για την ανάλυση με GC-MS/MS η αραίωση γίνεται με διάλυμα εξανίου-ακετόνης (40:60).

Μέθοδος ***SPE***

10 mL του δείγματος χυμού προστίθενται σε φιάλη των 100 mL και ακολουθεί αραίωση με υπερκάθαρο ύδωρ μέχρι τη χαραγή. Η μικρό-στήλης SPE ενεργοποιείται με τη διαβίβαση: i) 6 mL διχλωρομεθανίου, ii) 6 mL μεθανόλης, iii) 6 mL νερού. Διαβιβάζεται το δείγμα υπό κενό στη στήλη SPE, όπου κατακρατούνται τα φυτοφάρμακα, και ακολουθεί έκπλυση με 2 mL νερού. Για την εκχύλιση χρησιμοποιούνται οι διαλύτες: i) 6 mL μεθανόλη, ii) 6 mL διαλύματος μεθανόλης : διχλωρομεθανίου 50:50 (v/v), iii) 6 mL διχλωρομεθανίου. Το εκχύλισμα συμπυκνώνεται μέχρι ξηρού και γίνεται ανασύσταση με 5 mL ακετονιτριλίου. Το τελικό εκχύλισμα αραιώνεται με νερό για να αναλυθεί με LC-MS/MS ενώ για την ανάλυση με GC-MS/MS η αραίωση γίνεται με διάλυμα εξανίου-ακετόνης (40:60).

Μέθοδος Απευθείας *Έγχυσης*

5 mL δείγματος χυμού κατεργάζονται σε λουτρό υπερήχων για 20 min. Ακολουθεί διήθηση με φίλτρο σύριγγας μεμβράνης PVDF με μέγεθος πόρων 0,45 μm, 1 mL του δείγματος μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 2 mL και αραιώνεται με ακετονιτρίλιο μέχρι τη χαραγή. Το διάλυμα διηθείται με φίλτρο σύριγγας μεμβράνης PVDF (0,22 μm, 13 mm) πριν την ανάλυση με LC-MS/MS.

Ανάλυση LC-MS/MS

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα LC-MS/MS τριών διαδοχικών τετραπολικών αναλυτών μάζας, TSQ Quantum Ultra, και πηγή ιοντισμού με ηλεκτροδιάχυση, Ion Max API Source, της εταιρείας ThermoElectron, Η.Π.Α.. Το σύστημα υγροχρωματογραφίας αποτελείται από αντλία Surveyor LC και αυτόματο δειγματολήπτη Surveyor (ThermoElectron, Η.Π.Α.). Ο διαχωρισμός γίνεται σε στήλη αντίστροφης φάσης RP-SYNERGI 4 μm, 80 Å, 2,1x50mm με σύστημα βαθμιδωτής έκλουσης δύο διαλυτών : κινητή φάση Α : 10mM μυρμηκικό αμμώνιο και 0.1% μυρμηκικό οξύ σε νερό, και κινητή φάση Β : 10mM μυρμηκικό αμμώνιο και 0.1% μυρμηκικό οξύ σε μεθανόλη. Η ταχύτητα ροής ήταν 0.2 ml/min και ο όγκος έγχυσης 10 μL.

***Ανάλυση* GC-MS^n**

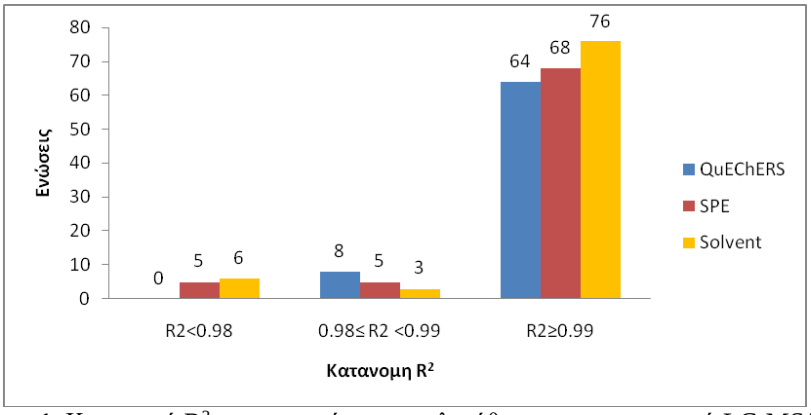
Το σύστημα αεριοχρωματογραφίας αποτελείται από αέριο-χρωματογράφο Trace GC Ultra, με έναν εισαγωγέα δείγματος PTV και με έναν Split/splitless εισαγωγέα (ThermoScientific., Η.Π.Α.). Ο ανιχνευτής φασματομετρίας μάζας είναι τύπου παγίδας ιόντων (ion trap), Polaris Q, (ThermoScientific., Η.Π.Α.). Ο αυτόματος δειγματολήπτης είναι ο TriPlus - AS, της εταιρείας Thermo Scientific. Ο διαχωρισμός των ενώσεων γίνεται σε τριχοειδή στήλη DB-35MS (0,25 mm, 30 m, 0,25μm).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

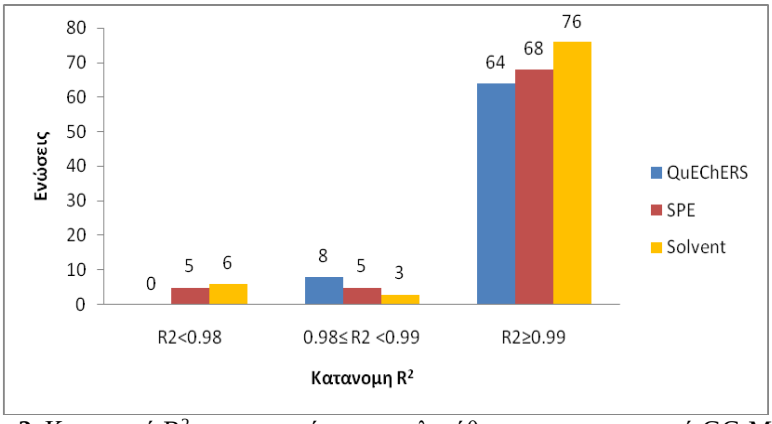
Η μελέτη γραμμικότητας έγινε κατασκευάζοντας καμπύλες βαθμονόμησης προτύπων προσαρμοσμένων στη μήτρα του δείγματος χρησιμοποιώντας το κατάλληλο εκχύλισμα λευκού δείγματος για την κάθε μέθοδο στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,5-50 μg L^{-1} για τις ενώσεις που μελετήθηκαν με LC-MS/MS και 2,5-100 μg L^{-1} για τις ενώσεις που μελετήθηκαν με GC-MS/MS. Υπολογίστηκε ο συντελεστής συσχέτισης R^2 για όλες τις ενώσεις, χρησιμοποιήθηκε το γραμμικό μοντέλο παλινδρόμησης. Οι τιμές R^2 ήταν ≥ 0.98

Παπαϊωάννου Β.[1,2], Μποτίτση Ελ.[2], Αντωνιου Σ.[2], Τσίπη Δ.[2], και Οικονόμου Α.[1]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2]Γενικό Χημείο του Κράτους

για τις περισσότερες ενώσεις που μελετήθηκαν. Η κατανομή των τιμών του R^2 που προέκυψαν από τις καμπύλες βαθμονόμησης πρότυπων προσαρμοσμένων στη μήτρα και σε διαλύτη παρατίθενται στα Σχήματα 1 και 2.



Σχημα 1. Κατανομή R^2 για τις ουσίες που μελετήθηκαν με την τεχνική LC-MS/MS



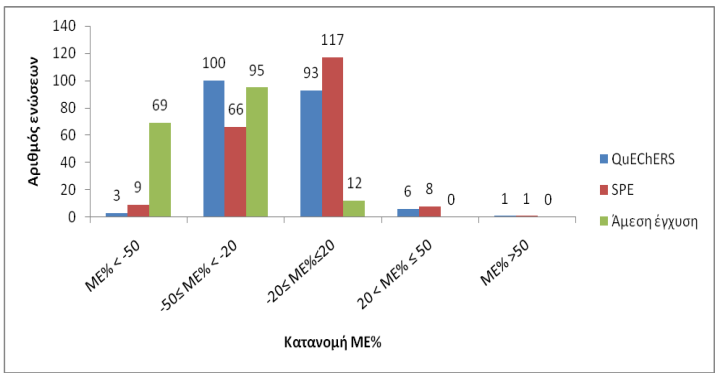
Σχημα 2. Κατανομή R^2 για τις ουσίες που μελετήθηκαν με την τεχνική GC-MS/MS

Για την εκτίμηση του φαινομένου επίδρασης μήτρας υπολογίσθηκε η επίδραση μήτρας ΜΕ% σύμφωνα με τον τύπο:

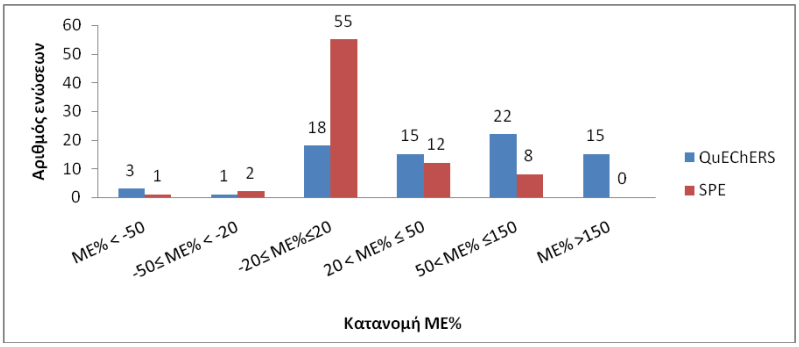
$$\text{ME\%} = 100 \times \left(\frac{b_m}{b_s} - 1 \right)$$

όπου b_m η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης προτύπων προσαρμοσμένων στη μήτρα και b_s η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης προτύπων σε διαλύτη. Τα φαινόμενα επίδρασης μήτρας για τις ενώσεις που μελετήθηκαν με τη τεχνική LC-MS/MS ήταν εντονότερα στην μέθοδο της απευθείας έγχυσης, ακολουθεί η μέθοδος QuEChERS και την ασθενέστερη επίδραση μήτρας παρουσίασε η SPE (Σχήμα 3). Για τις ενώσεις που αναλύθηκαν με την τεχνική GC-MS/MS, οι τιμές ΜΕ % με τη μέθοδο QuEChERS κυμαίνονται από -20% μέχρι και μεγαλύτερες του +150% (Σχήμα 4).

Παπαϊωάννου Β.[1,2], Μποτίτση Ελ.[2],Αντωνιου Σ.[2], Τσίπη Δ.[2], και Οικονόμου Α.[1]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2]Γενικό Χημείο του Κράτους
Σύγκριση και επικύρωση πολυϋπολειμματικών μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε χυμούς με LC-MS / MS και GC-MS / MS



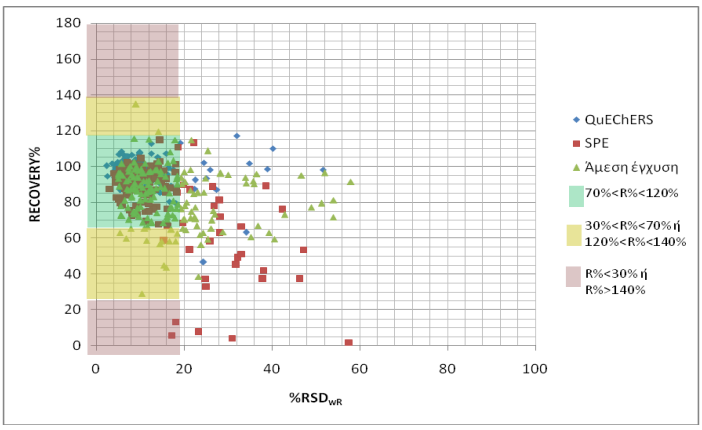
Σχημα 3. Κατανομή ΜΕ% για τις ουσίες που μελετήθηκαν με την τεχνική LC-MS/MS



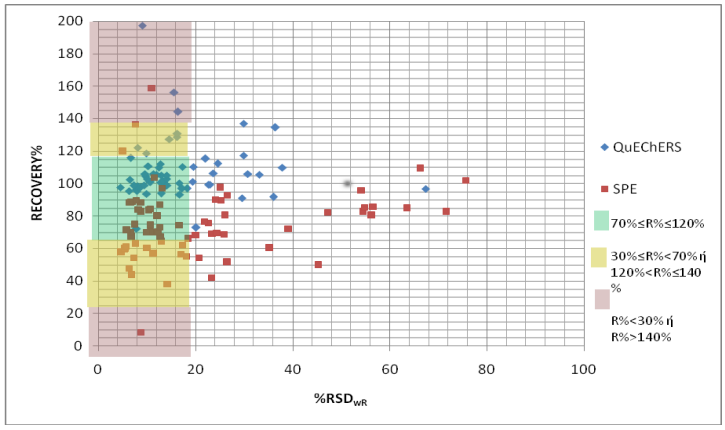
Σχημα 4. Κατανομή ΜΕ% για τις ουσίες που μελετήθηκαν με την τεχνική GC-MS/MS

Η ακρίβεια των μεθόδων μελετήθηκε με δοκιμές ανάκτησης σε λευκά δείγματα σε δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, 0,010 και 0,050 mg kg^{-1}. Πραγματοποιήθηκαν 6 επαναλήψεις ανά επίπεδο σε 3 ημέρες εργασίας, σύμφωνα με τις απαιτήσεις της SANTE 11813/2017. Για την πιστότητα μελετήθηκε το υποσύνολο της επαναληψιμότητας υπολογίζοντας τη σχετική τυπική απόκλιση της ανάκτησης, $\%RSD_r$, 6 επαναλήψεων που πραγματοποιήθηκαν σε μία μέρα και το υποσύνολο της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, $\%RSD_{WR}$, υπολογίζοντας τη σχετική τυπική απόκλιση της ανάκτησης 18 επαναλήψεων των τριών εργαστηριακών ημερών. Η ορθότητα εκτιμήθηκε με υπολογισμό της ανάκτησης. Η κατανομή της ανάκτησης ως προς ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα των τριών μεθόδων δίνεται στα Σχήματα 5 και 6. Η πλειοψηφία των τιμών ανάκτησης και πιστότητας των μεθόδων βρίσκεται στις αποδεκτές περιοχές (ανάκτηση 70%-120%, 30%-70% και 120%-140% με τιμές $\%RSD_r \leq 20\%$ και $\%RSD_{WR} \leq 20\%$) της Οδηγίας SANTE 11813/2017. Η κατανομή των ενώσεων ανά μέθοδο που πληρούν όλες τις απαιτήσεις της νομοθεσίας συγκεκριμένα της γραμμικότητας ($R^2 \geq 0.98$), της ακρίβειας (αποδεκτές τιμές ανάκτησης) και της πιστότητας ($\%RSD_r$ & $\%RSD_{wR} \leq 20\%$) δίνεται στο Σχήμα 7. Διαπιστώθηκε ότι οι περισσότερες ενώσεις (>240) έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα με τη μέθοδο QuEChERS σε σχέση με τις μεθόδους απευθείας έγχυσης και SPE.

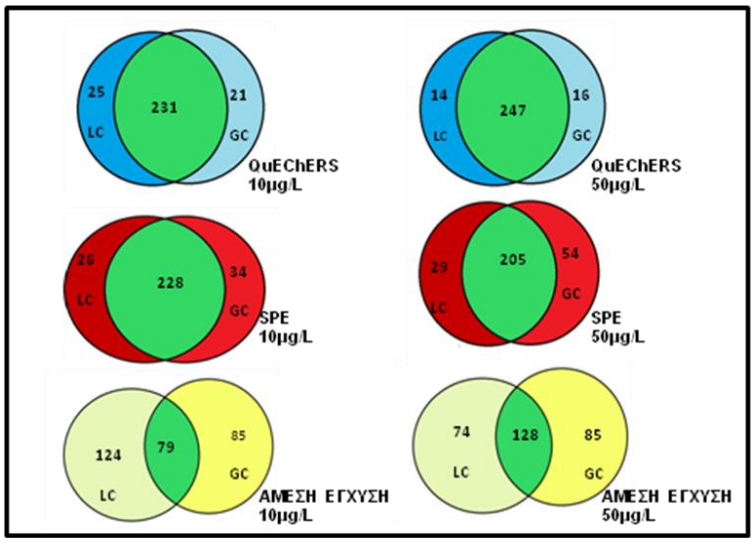
Παπαϊωάννου Β.[1,2], Μποτίτση Ελ.[2],Αντωνιου Σ.[2], Τσίπη Δ.[2], και Οικονόμου Α.[1]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2]Γενικό Χημείο του Κράτους
Σύγκριση και επικύρωση πολυϋπολειμματικών μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε χυμούς με LC-MS / MS και GC-MS / MS



Σχημα 5. Διαγραμματική απεικόνιση της ανάκτησης σε συνάρτηση με την σχετική τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (%RSD$_{WR}$) για το επίπεδο των 10 μg L^{-1} για τις ενώσεις που μελετήθηκαν με χρήση της τεχνικής LC-MS/MS.



Σχημα 6. Διαγραμματική απεικόνιση της Ανάκτησης σε συνάρτηση με την σχετική τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (%RSD$_{WR}$) για το επίπεδο των 10 μg L^{-1} για τις ενώσεις που μελετήθηκαν με χρήση της τεχνικής GC-MS^n



Σχημα 7. Κατανομή ενώσεων ανά μέθοδο σε σχέση με τα απαιτούμενα κριτήρια επίδοσης

Παπαϊωάννου Β.[1,2], Μποτίτση Ελ.[2],Αντωνιου Σ.[2], Τσίπη Δ.[2], και Οικονόμου Α.[1]
[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών
[2]Γενικό Χημείο του Κράτους
Σύγκριση και επικύρωση πολυϋπολειμματικών μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε χυμούς με LC-MS / MS και GC-MS / MS

7ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας
Αθήνα, 11-12 Μαΐου 2018

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη μελέτη επικύρωσης και σύγκρισης των τριών μεθόδων διαπιστώθηκε ότι οι μέθοδοι ισοδύναμες ως προς τη γραμμικότητα. Η μέθοδος SPE παρουσίασε τις ασθενέστερες επιδράσεις φαινομένου της μήτρας. Καταλληλότερη μέθοδος βάσει των αποτελεσμάτων της επικύρωσης αποδείχθηκε η μέθοδος QuEChERS. Η μέθοδος απευθείας έγχυσης, ενώ θα μπορούσε να είναι μια χρήσιμη εναλλακτική προσέγγιση για την πολύ-υπολειμματική ανάλυση χυμών, δεν παρουσιάζει την απαιτούμενη επίδοση για μεγάλο εύρος ενώσεων.

Βιβλιογραφία

[1] Botitsi H, Tsipi D, Economou A, "Current Legislation on Pesticides" in Applications in High Resolution Mass Spectrometry, Food Safety and Pesticide Residue Analysis, edited by Roberto Romero-González and Antonia Garrido Frenich, 2017, Elsevier Inc.

[2] Tsipi D, Botitsi H, Economou A, (Eds.), "Mass spectrometry for the analysis of pesticide residues and their metabolites", 2015, Wiley Series on Mass Spectrometry, Wiley & Sons.

[3] DG SANTE, European Commission, Document No SANTE/11813/2017: "Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed", http://www.eurl-pesticides.eu

[4] Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC, Official Journal of the European Union L 70.

[5] Regulation (EC) No. 1107/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC, Official Journal of the European Union L 309.

[6] Regulation (EC) No. 128/2009 of the European Parliament and of the Council concerning the establishing a framework for Community action to achieve the sustainable use of pesticides, Official Journal of the European Union L 309/71

Παπαϊωάννου Β.[1,2], Μποτίτση Ελ.[2],Αντωνιου Σ.[2], Τσίπη Δ.[2], και Οικονόμου Α.[1]

[1]Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Αθηνών

[2]Γενικό Χημείο του Κράτους