



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΓΕΝΙΚΟ ΤΜΗΜΑ
ΤΟΜΕΑΣ ΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΥΣΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΞΕΝΟΒΙΟΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΣΕ
ΤΡΟΦΙΜΑ ΓΙΑ ΒΡΕΦΗ ΚΑΙ ΠΑΙΔΙΑ ΜΙΚΡΗΣ
ΗΛΙΚΙΑΣ

Αναγνωστόπουλος Χρήστος
Γεωπόνος M.Sc.

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Αθήνα 2012

“Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Γενικό Τμήμα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα”

Νόμος 5343/32, άρθρο 202 2.

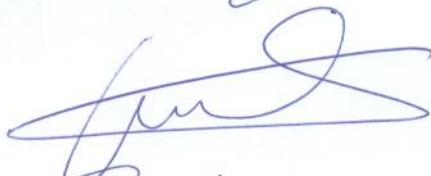
Η Εξεταστική Επιτροπή δέχθηκε ότι η διδακτορική διατριβή του κ. Χ. Αναγνωστόπουλου με τίτλο “Ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό των ξενοβιοτικών ουσιών σε τρόφιμα για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας” πληρεί τις προϋποθέσεις της κείμενης Πανεπιστημιακής Νομοθεσίας και του Εσωτερικού κανονισμού του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών και τον κρίνει άξιο να του απονεμηθεί ο τίτλος του Διδάκτορα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Η ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Σ. Χαρουτουιάν
Καθηγητής Γ.Π.Α.



Μ. Πολυσίου
Καθηγητής Γ.Π.Α.



Γ. Ζέρβας
Καθηγητής Γ.Π.Α.



Κ. Γεωργίου
Καθηγητής Γ.Π.Α.



Γ. Μηλιάδης
Ερευνητής Α' Μ.Φ.Ι.



Κ. Λιαπής
Ερευνητής Β' Μ.Φ.Ι.



Π. Σκανδάμης
Επ. Καθηγητής Γ.Π.Α.



*στους γονείς μου και
στον αδερφό μου*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Υπάρχουν πολλοί άνθρωποι που στάθηκαν κοντά μου στην προσπάθεια εκπόνησης της διδακτορικής διατριβής και αξίζουν αναγνώρισης. Λίγες λέξεις σε μια σελίδα είναι αδύνατο να αποτιμήσουν τη συνεισφορά όλων. Σε όλους όσους αναφέρομαι παρακάτω αλλά και σε όλους εκείνους που είναι αδύνατο να αναφερθώ ονομαστικά, να γνωρίζουν ότι τους ευχαριστώ θερμά για την υποστήριξή τους.

Εξ' αρχής θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στο Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο και στο εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων στο οποίο εκπονήθηκε το πειραματικό μέρος της διατριβής μου. Χωρίς την στήριξη που μου παρείχε δε θα γινόταν δυνατή η υλοποίηση αυτής.

Χρωστάω πολλά στον επιβλέποντα της διδακτορικής μου διατριβής, καθηγητή κ. Σέρκο Χαρουτουνιάν, για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με ένα τόσο ενδιαφέρον και πρωτότυπο θέμα, τη συνεχή υποστήριξη, γενικότερη συμπαράσταση, καθοδήγηση, επίβλεψη, επιμονή και υπομονή του.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά και τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Συμβουλευτικής μου Επιτροπής. Τον Δρ. Κωνσταντίνο Λιαπή για τις συμβουλές του, την καθοδήγησή του, την υπομονή του να ακούει κάθε μου δυσκολία σχετικά με την έρευνα και στον οποίο οφείλω την καινοτομία του ερευνητικού μου έργου και τον Καθηγητή Κωνσταντίνο Γεωργίου για το γνήσιο ενδιαφέρον του και την καλόπιστη εποικοδομητική κριτική του.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Γεώργιο Ζέρβα και στην Λέκτορα Δρ. Ελένη Τσιμπλάκου για την ιδιαίτερη συνεισφορά

τους εμπλουτίζοντας τις δραστηριότητες της διατριβής, για την άψογη συνεργασία και την αμέριστη υποστήριξή τους.

Ο όρος «δάσκαλος» αποτελεί έναν τίτλο τιμής που χαρακτηρίζει τον άνθρωπο που η συμβολή του ξεφεύγει από τα παραδοσιακά όρια της διδασκαλίας και της εκπαίδευσης του μαθητή, τον άνθρωπο που στέκεται δίπλα σου στα «δύσκολα» σε υποστηρίζει και σε καθοδηγεί. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον «δάσκαλο» μου και προϊστάμενο του εργαστηρίου Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου, Δρ. Γ. Μηλιάδη για τις πολύτιμες συμβουλές του οι οποίες διαμόρφωσαν τόσο την επιστημονική μου αντίληψη όσο και τον χαρακτήρα μου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις βαθιές μου ευχαριστίες στους συναδέλφους και κυρίως φίλους του εργαστηρίου Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου γιατί μου προσέφεραν ιδανικές εργασιακές συνθήκες και εξαιρετικές προσωπικές στιγμές από την εποχή που ξεκίνησα τις προπτυχιακές μου σπουδές μέχρι και την ημέρα ολοκλήρωσης της διατριβής αυτής.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την πιο βαθιά μου ευγνωμοσύνη σε όλη την οικογένεια μου για την πολύτιμη υποστήριξή της. Ευχαριστώ τους γονείς μου για τις αξίες με τις οποίες με μεγάλωσαν και που πάντα με στηρίζουν σε όλες μου τις προσπάθειες αλλά και τον αδερφό μου για την υποστήριξή του, που πάντα με ακούει και ανέχεται με χαρά και κατανόηση.

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Η βιομηχανοποίηση της πρωτογενούς παραγωγής και η παραγωγή επεξεργασμένων τροφίμων που απευθύνονται σε βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας υλοποιήθηκε μέσω της ανάπτυξης πλήθους νέων τεχνολογιών, οι οποίες είχαν ως αρνητικό επακόλουθο την εισαγωγή τοξικών ουσιών στην τροφική αλυσίδα. Επειδή η παρουσία των ουσιών αυτών στα τελικά προς κατανάλωση προϊόντα δεν είναι αναμενόμενη υπό κανονικές συνθήκες, αυτές χαρακτηρίζονται ως ξενοβιοτικές. Η μεγάλη ποικιλομορφία, σε συνδυασμό με τα χαμηλά όρια συγκέντρωσής τους στα τρόφιμα, έχουν αναγάγει την παρακολούθηση των επιπέδων τους σε πρόκληση για τον τομέα της ανάλυσης τροφίμων και αποτελέσει έναυσμα για τη διενέργεια της διατριβής, η οποία περιλαμβάνει την επίτευξη των παρακάτω δυο επιμέρους συμπληρωματικών στόχων:

A. Ανάπτυξη νέων αναλυτικών μεθόδων επεξεργασίας δειγμάτων και προσδιορισμού αναλυτών για την ανίχνευση ξενοβιοτικών ουσιών σε τρόφιμα για βρέφη-παιδιά μικρής ηλικίας και ζωοτροφές.

B. Παρακολούθηση των επιπέδων των συγκεντρώσεων για ποικίλες κατηγορίες ξενοβιοτικών ουσιών σε εμπορικά δείγματα τροφίμων για βρέφη-παιδιά μικρής ηλικίας και ζωοτροφών.

Η υλοποίηση του πρώτου στόχου αναφέρεται στην ανάπτυξη νέων μεθόδων οι οποίες είναι **απλές** (απλή διαδικασία εκχύλισης χωρίς πολύπλοκο εξοπλισμό), **σύντομες** (κατάλληλες για ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα), **οικονομικές** (μικρή κατανάλωση αναλωσίμων ανά δείγμα), **πολυδύναμες** (κατάλληλη για ανάλυση ξενοβιοτικών ουσιών διαφορετικών χημικών κατηγοριών), **ευαίσθητες** (δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σε επίπεδα συγκέντρωσης λίγων mg/kg) και προπάντων **αξιόπιστες**, ώστε να πληρούνται οι απαιτήσεις περί διαχείρισης της αβεβαιότητας των μετρήσεων που έχει θεσπίσει η Ε.Ε. Συγκεκριμένα, κατά την εκπόνηση της διατριβής αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν οι παρακάτω πολυδύναμες αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού για:

1. **25 Φυτοπροστατευτικά προϊόντα** υψηλής τοξικότητας και μεταβολιτών τους σε **παιδικές τροφές** με τις τεχνικές **GC-ECD** και **GC-NPD**.

2. **Φυτοπροστατευτικών προϊόντα** διαφόρων χημικών κατηγοριών μεταβολιτών τους σε **παιδικές τροφές** με την τεχνική **LC-MS/MS**.

3. **Φυτοπροστατευτικών προϊόντων** διαφόρων χημικών κατηγοριών μεταβολιτών τους σε **ζωοτροφές** με τις τεχνικές **GC-MS/MS** και **LC-MS/MS**.

4. **Φυτοπροστατευτικών προϊόντων** διαφόρων χημικών κατηγοριών μεταβολιτών τους σε **γάλα** με εφαρμογή της τεχνικής **GPC** για την απομάκρυνση του λίπους και προσδιορισμό των αναλυτών με την τεχνική **GC-MS/MS**.

5. **Φυτοπροστατευτικών προϊόντων** και διαφόρων χημικών κατηγοριών μεταβολιτών τους σε **προϊόντα ζωικής προέλευσης** με την τεχνική **GC-MS/MS**.

6. **Φυτορμονών** σε φυτικά προϊόντα με τις τεχνικές **LC-MS/MS** και **LC-TOF**.

7. **Μυκοτοξινών** σε **ζωοτροφές** με τις τεχνικές **LC-MS/MS** και **LC-TOF**.

8. **Μυκοτοξινών** στο **γάλα** με τις τεχνικές **LC-MS/MS** και **LC-TOF**.

Στη συνέχεια, οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση του δεύτερου στόχου μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων των ξενοβιοτικών ουσιών σε δείγματα τροφίμων για βρέφη-παιδιά μικρής ηλικίας και ζωοτροφών. Συγκεκριμένα, μελετήθηκαν-αναλύθηκαν δείγματα:

1. Εξήντα ενός **παιδικών τροφών**, στις οποίες προσδιορίστηκαν υπολείμματα των **φυτοπροστατευτικών προϊόντων**. Από αυτά μόνο τα δυο βρέθηκαν θετικά ως προς την παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε συγκέντρωση όμως κάτω του LOQ της μεθόδου.

2. Εξήντα τέσσερα **ζωοτροφές**, στις οποίες προσδιορίστηκαν τα υπολείμματα των **φυτοπροστατευτικών προϊόντων**. Ένα σημαντικό ποσοστό από αυτά βρέθηκε θετικό στην παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων, με ιδιαίτερα έντονη την παρουσία του **endosulfan**.

3. Τριάντα τέσσερα **γάλατα**, στα οποία προσδιορίστηκαν τα υπολείμματα των **φυτοπροστατευτικών προϊόντων**. Σε κανένα από αυτά δεν διαπιστώθηκε παρουσία φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω από το LOQ της μεθόδου.

4. Είκοσι τέσσερα **κρέατα και συκώτια**, στα οποία προσδιορίστηκαν τα υπολείμματα των **φυτοπροστατευτικών προϊόντων**. Σε κανένα από αυτά δεν διαπιστώθηκε η παρουσία φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω από τα όρια αναφοράς της μεθόδου.

5. Σαράντα τρία δείγματα διαφόρων **φυτικών προϊόντων**, στα οποία ανιχνεύτηκε η παρουσία υπολειμμάτων **φυτορμονών**. Ένα μικρό ποσοστό από αυτά βρέθηκε να περιέχει φυτορμόνες και συγκεκριμένα τα μόρια **1-ναφθαλενοξικό οξύ**, **2,4-D**, **chlormequat**, **4-γλωροφαινοξυ-οξικό οξύ**, **thiadiazuron** και **2iP**.

6. Εξήντα έξι **ζωοτροφές**, στις οποίες προσδιορίστηκαν **μυκοτοξίνες**. Ένα σημαντικό ποσοστό από αυτά βρέθηκε να περιέχει μυκοτοξίνες και συγκεκριμένα, τις **αφλατοξίνες B1, B2** και **G2**, την **ωχρατοξίνη A** και την **τοξίνη T-2**.

7. Τριάντα τρία **γάλατα**, στα οποία προσδιορίστηκαν **μυκοτοξινές και μεταβολίτες τους**. Σε κανένα από αυτά δεν ανιχνεύτηκε η παρουσία μυκοτοξινών πάνω από τα όρια αναφοράς της μεθόδου.

SUMMARY

The industrialization of the primary production and the recent advances in food science regarding foods for infants and young children, was implemented through the adoption of a variety of new technologies, whose negative outcome was the introduction of a wide range of toxic compounds in the food chain. The presence of these compounds is not normally expected in the final product therefore they can be characterized as xenobiotics. Due to their high diversity and their low concentration levels in foods, monitoring their presence and concentration levels is a analytical challenge in the field of food science. This challenge motivated the current research whose implementation was achieved through 2 supplementary sub-objectives:

A. Development of new analytical methods for sample preparation and analyte determination in the field of analysis of xenobiotics in foods for infants and small children and animal feed.

B. Monitoring of the presence and concentration levels of a wide range of xenobiotics in real samples of foods for infants and small children and animal feed.

The implementation of the first objective involved the development of new methods based on the following features: **simplicity** (simple procedures without the use of complicated equipment), **short** (appropriate for the analysis of a large number of samples in a short period of time), **cheap** (low consumption of reagents per sample), **sensitive** (ability to detect and quantify concentration at the level of few $\mu\text{g}/\text{kg}$) and reliable as to meet the E.U. requirements regarding the uncertainty of the analytical measurements. Thus in the framework of the current thesis a wide range of analytical methods were developed and validated for the determination of the following xenobiotic compounds:

1. **25 high toxicity pesticides** and their metabolites in **baby food** with **GC-ECD** and **GC-NPD** as a determination technique.
2. **Pesticide residues** of different classes and their metabolites in **baby food** with **LC-MS/MS** as a determination technique.
3. **Pesticide residues** of different classes and their metabolites in **animal feed** with **GC-MS/MS** and **LC-MS/MS** as a determination technique.
4. **Pesticide residues** of different classes and their metabolites in **milk** using **GPC** as a clean-up step and **GC-MS/MS** and **LC-MS/MS** as a determination technique.
5. **Pesticide residues** of different classes and their metabolites in **products of animal origin** with **GC-MS/MS** as a determination technique.
6. **Plant hormones** in various **plant commodities** with **LC-MS/MS** and **LC-TOF** as a determination technique.

7. **Mycotoxins** of different classes in **animal feed** with **LC-MS/MS** and **LC-TOF** as a determination technique.

8. **Mycotoxins** of different classes in **milk** with **LC-MS/MS** and **LC-TOF** as a determination technique.

The developed methods were applied for the implementation of the second objective, through the determination of various xenobiotic compounds in animal feed and in a variety of commodities used in the nutrition of infants and young children. Thus the following samples were studied-analyzed:

1. Sixty one **baby food** samples were analyzed for the determination of **pesticide residues**. Only 2 samples were found positive for the presence of pesticides but in concentrations below the LOQ of the method.

2. Forty six (**46**) **animal feed** samples were analyzed for the determination of **pesticide residues**. Most of the samples were found positive for the presence of pesticides with the particularly intense the presence of Σ endosulfan.

3. Thirty four (**34**) **milk** samples were analyzed for the determination of **pesticide residues**. No pesticides residues were found at levels above the LOD of the method.

4. Twenty four (**24**) **meat** and **liver** samples were analyzed for the determination of **pesticide residues**. No pesticides residues were found at levels above the LOD of the method.

5. Forty three (**43**) samples from various **plant commodities** were analyzed for the determination of **plant hormones**. A small percentage of the samples were found positive for the presence of plant hormones. The plant hormones detected were 1-naphthylacetic acid 1-naphthylacetic acid, 2,4 D, chlormequat, 4-Chlorophenoxyacetic acid, thiadiazuron and 2iP.

6. Sixty six (**66**) **animal feed** samples were analyzed for the determination of **mycotoxins**. A significant percentage of the samples were found positive for the presence of mycotoxins. The mycotoxins detected were aflatoxin B1, B2 G2, ochratoxin A and T-2 toxin.

7. Thirty three (**33**) **milk** samples were analyzed for the determination of **mycotoxins**. A significant percentage of the samples were found positive for the presence of mycotoxins. No mycotoxins were found at levels above the LOD of the method.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

E.E.	Ευρωπαϊκή Ένωση
ECD	ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων
EFSA	Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων
EI	ιονισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων
ESI	ιονισμός ηλεκτροδιάχυσης
GC	αέρια χρωματογραφία
GC-MS/MS	αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου
LC	υγρή χρωματογραφία
GPC	χρωματογραφία πηκτής
LC-MS/MS	υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου
LC-TOF	υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών χρόνου πτήσης ιόντων
LOD	όριο ανίχνευσης
LOQ	όριο ποσοτικοποίησης
MRM	μετάπτωση
NPD	ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου
PTV	εγχυτής προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας εξαέρωσης
RT	χρόνος κατακράτησης
SDr	σχετική τυπική απόκλιση

ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Οι ανάγκες της διατριβής υπαγόρευσαν τη χρήση ενός μεγάλου αριθμού αναλυτικών συστημάτων, οι οποίες διατέθηκαν από το Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα (και συστοιχίες τους):

1. Αεριοχρωματογράφος Agilent 6890 με 2 εγχυτές τύπου splitless, τριχοειδείς στήλες, 30m, 0,32 mm και πάχους υμένα 0,25 μm των παρακάτω τύπων: α) DB-5MS συνδεδεμένη με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) και β) DB-17 συνδεδεμένη με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD). Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chemstation Rev. B.03.02.

2. Αεριοχρωματογράφος Agilent 6890 με 2 εγχυτές τύπου splitless, τριχοειδείς στήλες, 30m, 0,32 mm και πάχους υμένα 0,25 μm των παρακάτω τύπων: α) DB-5MS συνδεδεμένη με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) και β) DB-17 συνδεδεμένη με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chemstation Rev. B.03.02.

3. Αεριοχρωματογράφος Varian CP3800 με εγχυτή τύπου θερμοκρασιακά προγραμματιζόμενης εξαέρωσης (PTV), στήλη τύπου Factor Four Capillary Column VF-5 ms (30×0.25 mm I.D.×0.25 μm film thickness) με προστήλη (fused silica untreated capillary column 5×0.53 mm I.D. cyano-phenyl-methyl deactivated) (Varian Inc.) συνδεδεμένος με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου (MS/MS), για λειτουργία με τις τεχνικές ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) και χημικού ιοντισμού (CI) και τεχνική λειτουργίας ταυτόχρονης παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων, με εύρος λειτουργίας 50-1000 amu.

4. Σύστημα χρωματογραφίας πηκτής της Knauer (Knauer GPC cleanup Unit 6500 system) το οποίο αποτελείται από ανιχνευτή UV (Smartline UV detector 25000 ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 254 nm, αντλία 2 καναλιών (Smartline pump 1000

binary pump), αναμίκτη κινητής φάσης (SmartMix Mixer), εισαγωγέα δείγματος πολλαπλών θέσεων (Smartline Assistant 6000 with two built-in K-16 valve drives) και γυάλινη χρωματογραφική στήλη 400×25 mm I.D με προσροφητικό υλικό Bio-Beads SX-3. Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ChromGate V3.1.7 Knauer instrument control.

5. Υγρός χρωματογράφος με σύστημα 2 αντλιών Varian Prostar 210, στήλη τύπου C₁₈, αυτόματο δειγματολήπτης Prostar 420, 100 θέσεων, συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας τριπλού τετράπολου Varian 1200L, με πηγή ηλεκτροδιάχυσης (ESI) με δυνατότητα λειτουργίας θετικού ή αρνητικού ιονισμού. Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Varian MS Workstation software version 6.8.

6. Υγρός χρωματογράφος με σύστημα αντλίας 2 καναλιών (Agilent 1200), στήλη τύπου C₁₈, σύστημα απαέρωσης κινητών φάσεων, αυτόματο δειγματολήπτη 100 θέσεων ελεγχόμενης θερμοκρασίας (G1330B) και θάλαμο στήλης ελεγχόμενης θερμοκρασίας συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης ιόντων (Agilent 6220). Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.02.00.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ	i
SUMMARY	iii
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	v
ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ	vi
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	viii

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	3
1. Παιδικές τροφές και τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας	3
1.1. Τι είναι τρόφιμο ?	3
1.2. Έτοιμες παιδικές τροφές	4
1.3. Το γάλα	5
2. Σημασία της διατροφής στην βρεφική και παιδική ηλικία	6
2.1. Ειδικές διατροφικές απαιτήσεις	6
2.2. Διατροφή του βρέφους	7
2.3. Διατροφή στην βρεφική ηλικία 6 – 12 μηνών	8
2.4. Διατροφή παιδιών ηλικίας 1 - 4 ετών	11
2.5. Διατροφικές συνήθειες βρεφών και παιδιών μικρής ηλικίας σε χώρες εκτός Ευρώπης	15
3. Ασφάλεια τροφίμων	22
4. Ποιές είναι οι ξενοβιοτικές ουσίες?	25
4.1. Μυκοτοξίνες	26
4.2. Φυτορμόνες (Φυτορρυθμιστικές ουσίες)	32
4.3. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα	34
5. Τεχνικές Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης	40
5.1. Αεριοχρωματογραφία	40
5.1.1 Οργανολογία	41
5.1.2. Τεχνικές εισαγωγής δείγματος στην αέρια χρωματογραφία	43
5.1.3. Στήλες	45
5.2. Υγρή χρωματογραφία	48
5.2.1 Οργανολογία	48
5.3. Ανιχνευτές	51
5.3.1. Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)	51
5.3.2. Ανιχνευτής Αζώτου φωσφόρου (NPD)	52
5.3.3. Φασματομετρία μαζών	54

6. Επικύρωση Μεθόδων Προσδιορισμού	63
6.1. Ορθότητα – Πιστότητα	63
6.2. Γραμμικότητα	65
6.3. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	65
6.4. Διεργαστηριακές Εξετάσεις Ελέγχου Ικανότητας (Proficiency Tests)	65
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	67
1.Ελεγχοι Καταλληλότητας Αναλυτικών Συστημάτων	67
1.1. Παρακολούθηση παραμέτρων Διαλυμάτων Ελέγχου Ποιότητας	67
1.2. Παρακολούθηση της ευαισθησίας	69
1.3. Συντονισμός συστημάτων φασματογράφων μαζών (tuning)	69
1.4. Παρακολούθηση της ακρίβεια μάζας	72
2. Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS τον προσδιορισμό 25 φυτοπροστατευτικών ουσιών και μεταβολιτών τους σε παιδικές τροφές με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας	73
2.1. Εισαγωγή	75
2.2. Υλικά και Αντιδραστήρια	76
2.3. Εξοπλισμός	76
2.4. Παρασκευή Προτύπων Δ/των Παρακαταθήκης	76
2.5. Παρασκευή Διαλυμάτων Εργασίας	76
2.6. Μέθοδος Εκχύλισης	77
2.7. Προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία	78
2.8. Αποτελέσματα και συζήτηση	79
2.8.1 Ταυτοποίηση	79
2.8.2. Προσδιορισμός	81
2.8.3. Γραμμικότητα	81
2.8.4. Ορθότητα – Πιστότητα	84
2.8.5. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	86
2.9. Συμπεράσματα	88

3. Επικύρωση Δύο παραλλαγών στις μεθόδου QmEChERS για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων και μεταβολιτών τους σε παιδικές τροφές με την χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μαζών.	89
3.1. Εισαγωγή	89
3.2. Υλικά και Αντιδραστήρια	91
3.3. Εξοπλισμός	93
3.4. Παρασκευή Προτύπων διαλυμάτων Παρακαταθήκης	93
3.5. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	93
3.6. Μέθοδος Εκχύλισης	94
3.6.1. Εκχύλιση των 117 αναλυτών διαφόρων χημικών κατηγοριών	94
3.6.2. Εκχύλιση του Haloxyfor και των εστέρων του	95
3.7. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου	95
3.7.1. Προσδιορισμός των 119 αναλυτών διαφόρων χημικών κατηγοριών, του Haloxyfor και των μεταβολιτών του	96
3.7.2. Προσδιορισμός του Fentin	97
3.8. Ταυτοποίηση	97
3.9. Προσδιορισμός	98
3.10. Αποτελέσματα και συζήτηση	98
3.10.1. Επιλογή κατάλληλου προγράμματος έκλουσης – Κατανομής μεταπτώσεων	98
3.10.2. Επιλογή τελικού διαλύτη	100
3.10.3. Βελτιστοποίηση παραμέτρων Φασματομέτρου Μάζών	103
3.11. Αποτελέσματα και συζήτηση	106
3.11.1. Γραμμικότητα	106
3.11.2. Ορθότητα – Πιστότητα	111
3.11.3. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	117
3.12. Ανάλυση δειγμάτων	119
3.13. Συμπεράσματα	121
4. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δείγματα ζωοτροφών και γάλακτος από διάφορα μέρη της Ελλάδα	122
4.1. Εισαγωγή	122
4.2. Πειραματικό Σχέδιο	123

4.3. Υλικά και Αντιδραστήρια	123
4.4. Εξοπλισμός	125
4.5. Επιλογή αναλυτών	126
4.6. Παρασκευή Προτύπων διαλυμάτων Παρακαταθήκης	126
4.7. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	127
4.8. Μέθοδος Εκχύλισης	127
4.8.1. Μέθοδος επεξεργασίας ζωοτροφών	127
4.8.2. Μέθοδος επεξεργασίας λίπους γάλακτος	128
4.9. Προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία	130
4.10. Προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου	130
4.11. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου	131
4.12. Ταυτοποίηση	132
4.13. Προσδιορισμός	133
4.14. Αποτελέσματα και συζήτηση	134
4.14.1. Ορθότητα – Πιστότητα	134
4.14.2. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	145
4.14.3. Διεργαστηριακές Εξετάσεις Ελέγχου Ικανότητας (Proficiency Tests)	146
4.15. Ανάλυση δειγμάτων γάλακτος και ζωοτροφών	147
4.16. Συμπεράσματα	153
5. Ανάπτυξη και επικύρωση μιας γρήγορης και εκλεκτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων με τη χρήση GC-MS/MS σε ζωικά προϊόντα	154
5.1. Εισαγωγή	154
5.2. Υλικά και Αντιδραστήρια	158
5.3. Εξοπλισμός	159
5.4. Επιλογή αναλυτών	159
5.5. Παρασκευή Προτύπων διαλυμάτων Παρακαταθήκης	159
5.6. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	160
5.7. Μέθοδος Εκχύλισης	160
5.8. Προσδιορισμός λίπους	161
5.9. Προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου	161
5.10. Ταυτοποίηση	162
5.11. Προσδιορισμός	162
5.12. Αποτελέσματα και συζήτηση	163
5.12.1. Ορθότητα – Πιστότητα	163

5.12.2. Γραμμικότητα	168
5.12.3. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	170
5.12.4. Διεργαστηριακές Εξετάσεις Ελέγχου Ικανότητας (Proficiency Tests)	171
5.13. Ανάλυση δειγμάτων γάλακτος και κρέατος	172
5.14. Συμπεράσματα	172
6. Ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών ομάδων φυτορμονών σε φυτικά προϊόντα με την χρήση LC-MS/MS	173
6.1. Εισαγωγή	173
6.2. Υλικά και Αντιδραστήρια	175
6.3. Εξοπλισμός	175
6.4. Επιλογή αναλυτών	176
6.5. Επιλογή υποστρωμάτων	182
6.6. Παρασκευή Προτύπων διαλυμάτων Παρακαταθήκης	182
6.7. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	182
6.8. Μέθοδος Εκχύλισης	183
6.9. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου	184
6.10. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία χρόνου πτήσης ιόντων	185
6.11. Ταυτοποίηση	186
6.12. Ποσοτικός προσδιορισμός	186
6.13. Αποτελέσματα και συζήτηση	187
6.13.1. Βελτιστοποίηση παραμέτρων Φασματομέτρου Μάζων	187
6.13.2. Ορθότητα – Πιστότητα	189
6.13.3. Γραμμικότητα	192
6.13.4. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	194
6.13.4. Επίδραση του υποστρώματος	196
6.14. Ανάλυση δειγμάτων	200
6.15. Συμπεράσματα	203
7. Ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών ομάδων Μυκοτοξινών σε ζωοτροφές και γάλα με την χρήση LC-MS/MS και LC-TOF	204
7.1. Εισαγωγή	204
7.2. Υλικά και Αντιδραστήρια	204
7.3. Εξοπλισμός	205
7.4. Επιλογή αναλυτών	205

7.5. Παρασκευή Προτύπων διαλυμάτων Παρακαταθήκης	205
7.6. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας	206
7.7. Μέθοδος Εκχύλισης	206
7.7.1. Μέθοδος επεξεργασίας ζωοτροφών	206
7.7.2. Μέθοδος επεξεργασίας γάλακτος	206
7.8. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου	207
7.9. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία χρόνου πτήσης ιόντων	207
7.10. Ταυτοποίηση	209
7.11. Προσδιορισμός	209
7.12. Αποτελέσματα και συζήτηση	210
7.12.1. Βελτιστοποίηση παραμέτρων Φασματομέτρου Μάζων	210
7.12.2. Ορθότητα – Πιστότητα	211
7.12.3. Γραμμικότητα	213
7.12.4. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)	215
7.13. Ανάλυση δειγμάτων	215
7.14. Συμπεράσματα	220
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	221
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	236

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών έχει παρατηρηθεί μια αλματώδης εξέλιξη αφενός στην ανάπτυξη και βελτίωση των μεθόδων παραγωγής & επεξεργασίας των τροφίμων, και αφετέρου στον τομέα των απαιτούμενων ελέγχων που αφορούν την πιστοποίηση της τήρησης των αποδεκτών πρότυπων ασφαλείας. Τα πρότυπα αυτά καλύπτουν ολόκληρη την τροφική αλυσίδα, συμπεριλαμβανομένης της παραγωγής ζωοτροφών, διασφαλίζοντας την υγεία των καταναλωτών και συμβάλλοντας αποφασιστικά στη διαδικασία παραγωγής ασφαλών τροφίμων. Με δεδομένο ότι πολλοί φυσικοί βιολογικοί και χημικοί παράγοντες είναι δυνατόν να επηρεάσουν την ασφάλεια και καταλληλότητα ενός τροφίμου, η πρωτογενής παραγωγή αποτελεί -για όλα τα μέρη της τροφικής αλυσίδας- το πρώτο στάδιο πιθανής ρύπανσης ενός τροφίμου. Ακολουθεί η βιομηχανική διεργασία της παρασκευής των τροφίμων, η οποία εμπεριέχει ένα πλήθος νέων τεχνολογιών που εμπλέκουν ποικίλους παράγοντες που επηρεάζουν την ασφάλεια ενός τροφίμου, όπως τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, οι ορμόνες, τα καύσιμα, οι χρωστικές, τα φάρμακα κλπ. Επειδή αρκετοί από τους παράγοντες αυτούς δεν παράγονται φυσιολογικά από τα τρόφιμα, αλλά χρησιμοποιούνται κατά τη βιομηχανική επεξεργασία των τροφίμων, η παρουσία τους στο τελικό προς κατανάλωση προϊόν δεν είναι αναμενόμενη υπό κανονικές συνθήκες. Έτσι, ουσίες αυτές χαρακτηρίζονται ως ξеноβιοτικές, και ως χημικοί ρύποι αποτελούν ένα σημαντικό παράγοντα υποβάθμισης της ασφαλείας ενός τροφίμου με χαρακτηριστική ιδιότητα την προσθετική τους ικανότητα. Μέχρι σήμερα, η παρουσία και ανίχνευση ποικίλων χημικών ρύπων όπως φυτοφάρμακα, διοξίνες, μυκοτοξίνες, βαρέα μέταλλα έχει προκαλέσει μεγάλο επιστημονικό και πρακτικό ενδιαφέρον, καθιστώντας επιτακτική τη διενέργεια κατάλληλων επίσημων ελέγχων. Αυτοί πρέπει να πραγματοποιούνται τόσο σε εθνικό όσο και σε κοινοτικό επίπεδο, για να είναι δυνατός ο έλεγχος της ιχνηλασιμότητας τους σε ολόκληρη την τροφική αλυσίδα. Παράλληλα θα πρέπει να εφαρμόζονται ειδικές συνθήκες και μέτρα σε όλα τα στάδια της παραγωγής των τροφών, ώστε να διασφαλίζεται η ασφάλεια και η καταλληλότητα τους. Μια κατηγορία τροφίμων στην οποία δίνεται ιδιαίτερη έμφαση σε σχέση με την ασφάλεια του περιεχομένου τους, είναι οι παιδικές τροφές και γενικότερα τα προϊόντα που προορίζονται για κατανάλωση από παιδιά μικρής ηλικίας. Είναι ευνόητο ότι η κατηγορία αυτή του πληθυσμού είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στους διάφορους επιβλαβείς χημικούς παράγοντες με αποτέλεσμα τα όρια ασφαλείας-ανίχνευσης των επιβλαβών ουσιών στα τρόφιμα αυτά να είναι συνήθως στο όριο του αναλυτικού προσδιορισμού των μεθόδων ανάλυσης. Επιπλέον, δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην παρουσία συγκεκριμένων ξеноβιοτικών

με σημαντική τοξικότητα. Άλλωστε είναι σύνηθες να εξετάζεται και η παρουσία ουσιών των οποίων έχει απαγορευτεί η χρησιμοποίηση στη διαδικασία παραγωγής των τροφίμων ή η παρουσία τους δεν δικαιολογείται από την εφαρμογή των ορθών κανόνων πρακτικής της παραγωγής τροφίμων με βάση την Εθνική ή Κοινοτική Νομοθεσία.

Τα εργαστήρια ανάλυσης τροφίμων αποτελούν τα «μάτια» του όλου συστήματος παρακολούθησης για την ανίχνευση των επιβλαβών για τον άνθρωπο ξενοβιοτικών ουσιών και τον προσδιορισμό της πιθανής τους παρουσίας, σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας από το χωράφι στο πιάτο. Η πρόκληση που έχουν να αντιμετωπίσουν είναι μεγάλη και πολύ ενδιαφέρουσα ερευνητικά, αφού καλούνται να προσδιορίζουν -σε μια μεγάλη γκάμα τροφίμων- αξιόπιστα την ταυτότητα και ποσότητα ενός συνεχώς αυξανόμενου αριθμού ουσιών, σε επίπεδα συγκέντρωσης λίγων $\mu\text{g}/\text{kg}$ ή $\mu\text{g}/\text{g}$. Οι σχετικές αναλύσεις πρέπει να διενεργούνται με γνώμονα τις ισχύουσες νομοθεσίες περί τροφίμων, να είναι οικονομικές, ταχείες και να παρέχουν τη δυνατότητα επεξεργασίας ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Παράλληλα θα πρέπει να εφαρμόζουν τις νομοθετικές και επιστημονικές απαιτήσεις περί διαχείρισης της αβεβαιότητας των μετρήσεων, ώστε οι εκτιμήσεις που πραγματοποιούνται με βάση τα αποτελέσματα τους να είναι αξιόπιστες.

Κύριο αντικείμενο της παρούσας μελέτης είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μιας σειράς νέων αναλυτικών μεθόδων που πληρούν τα παραπάνω κριτήρια και αφορούν τον προσδιορισμό ποικίλων ξενοβιοτικών ουσιών (από διαφορετικές πηγές ρύπανσης), σε παιδικές τροφές και προϊόντα που καταναλώνονται από βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας. Για την επίτευξη των στόχων αυτών ήταν απαραίτητη η χρήση οργάνων που χρησιμοποιούν τεχνολογίες αιχμής για την αναλυτική χημεία (LC/GC-MS/MS, LC-TOF) αλλά και περισσότερο κλασικές τεχνικές (GC-ECD/NPD), οι οποίες είναι δοκιμασμένες και αξιόπιστες.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Παιδικές τροφές και τρόφιμα που προορίζονται για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας

1.1. Τι είναι τρόφιμο ?

Τα τρόφιμα αποτελούν τον πρωταρχικό παράγοντα επιβίωσης του ανθρώπου, αφού αποτελούν πηγή ενέργειας και των απαραίτητων για την ζωή δομικών στοιχείων. Η τροφή είναι αναγκαία για την οικοδόμηση και ανάπτυξη του σώματος, την αντικατάσταση των συνεχών απωλειών, την απαιτούμενη ενέργεια και την καλή υγεία¹. Όμως τι ορίζουμε ως τρόφιμο;

Σύμφωνα με τον Κώδικα Τροφίμων και Ποτών² ως «*τρόφιμο*» ορίζεται:

« Κάθε προϊόν σε στερεή ή υγρή μορφή που χρησιμοποιείται για τη θρέψη του ανθρώπου. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν επίσης τα ποτά, ευφραντικά, το νερό, τα κόμμεα, οι μαστίχες και κάθε ουσία ή μείγμα που προστίθεται στα τρόφιμα.»

Σε Ευρωπαϊκό επίπεδο, σύμφωνα με τον Κανονισμό 178/2002³ για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα ο ορισμός των τροφίμων είναι:

«*τρόφιμα*» (ή «*είδη διατροφής*») νοούνται ουσίες ή προϊόντα, τα οποία είτε έχουν υποστεί πλήρη ή μερική επεξεργασία ή όχι και προορίζονται για βρώση από τον άνθρωπο ή αναμένεται ευλόγως ότι θα χρησιμεύσουν για τον σκοπό αυτόν. Στα τρόφιμα περιλαμβάνονται και ποτά, τσίχλες ή οποιαδήποτε ουσία που ενσωματώνεται σκόπιμα στα τρόφιμα κατά τη διάρκεια παραγωγής, παρασκευής ή επεξεργασίας τους. Περιλαμβάνεται δε και το νερό μετά το σημείο συμμόρφωσης, όπως ορίζεται στο άρθρο 6 της οδηγίας 98/83/ΕΚ, με την επιφύλαξη των απαιτήσεων των οδηγιών 80/778/ΕΟΚ και 98/83/ΕΚ.

Τα τρόφιμα που προορίζονται για να ικανοποιήσουν ιδιαίτερες θρεπτικές απαιτήσεις συγκεκριμένων ομάδων του πληθυσμού καλούνται «*τρόφιμα που προορίζονται για ειδική διατροφή*» ή «*διαιτητικά τρόφιμα*». Γι' αυτό η Ε.Ε. έχει θεσπίσει κατάλληλους κανόνες σύνθεσης, μάρκετινγκ και επισήμανσης. Σύμφωνα με την Οδηγία 1999/41/ΕΚ⁴, οι ομάδες των τροφίμων ειδικής διατροφής για τις οποίες θα θεσπιστούν εξειδικευμένες διατάξεις μέσω ειδικών οδηγιών είναι:

1. Παρασκευάσματα για βρέφη και παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας.
2. Μεταποιημένες τροφές με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά.

3. Τρόφιμα που προορίζονται να χρησιμοποιηθούν σε δίαιτες μειωμένων θερμίδων για απώλεια βάρους.
4. Διαιτητικά τρόφιμα ειδικών ιατρικών χρήσεων.
5. Τρόφιμα που προορίζονται για την αντιμετώπιση της καταβολής έντονης μυϊκής προσπάθειας, ιδίως για αθλητές.
6. Τρόφιμα για άτομα που πάσχουν από διαταραχές του μεταβολισμού των σακχάρων (διαβήτη).

1.2. Έτοιμες παιδικές τροφές

Μία από τις παραπάνω ομάδες πληθυσμού αποτελούν τα βρέφη και τα παιδιά. Με τον όρο «*βρέφη*»^{4,5} ορίζονται τα παιδιά ηλικίας μικρότερης των δώδεκα μηνών και με τον όρο «*παιδιά μικρής ηλικίας*»^{4,5} ορίζονται τα παιδιά ηλικίας μεταξύ ενός και τριών ετών.

Για να εξασφαλιστεί η κατάλληλη θρεπτική σύνθεση και το επιθυμητό επίπεδο ασφάλειας των τροφίμων αυτών, η Ε.Ε. έχει θεσμοθετήσει συγκεκριμένους κανόνες. Αυτοί εξειδικεύονται σε παρασκευάσματα για βρέφη (infant formulae), παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας (follow-on formulae), μεταποιημένες τροφές με βάση τα δημητριακά (processed-cereal based foods), παιδικές τροφές για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας (baby foods for infants and young children) και πρόσθετα που περιέχονται σε παιδικές τροφές για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας.

Σύμφωνα με την Οδηγία 2006/141/EK⁴, ως «*παρασκευάσματα για βρέφη*» ορίζονται τα τρόφιμα που προορίζονται για την ειδική διατροφή των βρεφών κατά τους πρώτους μήνες της ζωής τους και τα οποία επαρκούν για τις ανάγκες διατροφής των βρεφών μέχρι την εισαγωγή επιπλέον συμπληρωματικών τροφών. Ως «*παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας*» ορίζονται τα τρόφιμα για την ειδική διατροφή των βρεφών όταν εισάγονται στο διαιτολόγιό τους κατάλληλες συμπληρωματικές τροφές και αποτελούν το κύριο υγρό στοιχείο ενός διαφοροποιημένου προοδευτικά διαιτολογίου τους.

Σύμφωνα με την Οδηγία 2006/125/EK⁵, οι «*μεταποιημένες τροφές με βάση τα δημητριακά*» κατατάσσονται στις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες:

1. Απλά δημητριακά που έχουν ανασυσταθεί ή πρέπει να ανασυσταθούν με την προσθήκη γάλακτος ή άλλων θρεπτικών υγρών.
2. Δημητριακά στα οποία έχει προστεθεί τροφή πλούσια σε πρωτεΐνες και έχουν ανασυσταθεί ή πρέπει να ανασυσταθούν με την προσθήκη νερού.
3. Ζυμαρικά που χρησιμοποιούνται αφού μαγειρευτούν σε βραστό νερό ή άλλο κατάλληλο υγρό.

4. Φρυγανιές και μπισκότα που χρησιμοποιούνται είτε ως έχουν είτε αφού κονιοποιηθούν και προστεθεί σ' αυτά νερό, γάλα ή άλλο κατάλληλο υγρό.

1.3. Το γάλα

Το γάλα αποτελεί αναμφισβήτητα το σημαντικότερο στοιχείο της διατροφής των βρεφών. Μια επιτυχημένη βρεφική διατροφή με γάλα αγελάδας έχει ως αντικείμενο την κάλυψη των παρακάτω αναγκών⁶:

1. Κάλυψη των διατροφικών αναγκών του παιδιού.
2. Αποφυγή μηχανικών προβλημάτων της πέψης από το πήγμα του γάλακτος.
3. Αποφυγή της μόλυνσης από μικροοργανισμούς.

Σήμερα, τα βρέφη τρέφονται με υποκατάστατα γάλακτος υπό μορφή σκόνης που παρασκευάζονται με βάση ορισμένες ειδικές προδιαγραφές⁷ και διακρίνονται σε γάλατα πρώτης και δεύτερης βρεφικής ηλικίας. Οι εταιρίες παρασκευής τους χρησιμοποιούν ως βάση το αποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα ή ένα μίγμα αποβουτυρωμένου αγελαδινού γάλακτος με πρόσθετη πρωτεΐνης ορού, ενώ το λίπος του γάλακτος αντικαθίσταται από φυτικά έλαια. Τέλος, προστίθενται λακτόζη, βιταμίνες και ανόργανα στοιχεία σε αναλογίες που προσομοιάζουν τη σύσταση και θερμιδική αξία του μητρικού γάλακτος.

Το συνηθισμένο ατροποποιητό γάλα του εμπορίου (αγελαδινό) δεν ενδείκνυται για τη βρεφική διατροφή, αφού είναι ιδιαίτερα φτωχό σε σίδηρο και βιταμίνη C. Έτσι, η κατανάλωσή του δεν συνιστάται πριν από τα πρώτα γενέθλια του παιδιού. Άλλωστε, στο εμπόριο υπάρχει μια μεγάλη ποικιλία βρεφικών γαλάτων που εμπεριέχουν πρωτεΐνες αγελαδινού γάλακτος ή σόγιας. Οι δύο αυτοί τύποι θεωρούνται ισοδύναμοι από διατροφική άποψη, αλλά διαφέρουν όσον αφορά το είδος της πρωτεΐνης και των υδατανθράκων που περιέχουν. Επίσης στο εμπόριο κυκλοφορούν γάλατα εμπλουτισμένα με νουκλεοτίδια, υποαλλεργικά γάλατα (με υδρολυμένη πρωτεΐνη), καθώς και γάλατα δεύτερης βρεφικής ηλικίας απλά ή εμπλουτισμένα με καλλιέργειες προβιοτικών μικροοργανισμών και γάλατα για παιδιά ηλικίας μεγαλύτερης του 1 έτους. Πιστεύεται ότι τα παιδιά δεν χρειάζεται να καταναλώνουν τα παρασκευάσματα αυτά, εκτός εάν δεν προσλαμβάνουν ικανοποιητική ποσότητα στερεών τροφών. Συνήθως τα ειδικά γάλατα του εμπορίου κυκλοφορούν σε μορφή σκόνης, η οποία διαλύεται σε νερό σύμφωνα με τις οδηγίες που αναγράφονται στην συσκευασία. Θα πρέπει όμως να επισημανθεί ότι για την παρασκευή του βρεφικού γάλακτος πρέπει να χρησιμοποιείται πάντα βρασμένο νερό, ενώ όλα τα σκεύη θα πρέπει να καθαρίζονται και να αποστειρώνονται. Μετά τους έξι πρώτους μήνες η αποστείρωση των

σκευών δεν είναι πλέον απαραίτητη. Το παρασκεύασμα για βρέφη όταν ανοιχθεί θα πρέπει να καταναλώνεται εντός του χρονικού διαστήματος που ορίζει η παρασκευάστρια εταιρία.

Σε παθολογικές περιπτώσεις για τις οποίες δεν ενδείκνυται χορήγηση των κοινών βρεφικών γαλάτων, θα πρέπει –ανάλογα με το πρόβλημα- να χορηγούνται ειδικά γάλατα. Συγκεκριμένα, για τα βρέφη με δυσανεξία στη λακτόζη συστήνεται το γάλα σόγιας, στο οποίο αντί για λακτόζη έχει προστεθεί χυμός καλαμποκιού και σακχαρόζη. Το γάλα σόγιας δίνεται και σε βρέφη φυτοφάγων οικογενειών, σε όσα πάσχουν από γαλακτοζαιμία, πρωτοπαθή έλλειψη λακτάσης ή δευτεροπαθή δυσανεξία στη λακτόζη και στα βρέφη με αλλεργία στο αγελαδινό γάλα. Το γάλα σόγιας δεν συστήνεται για βρέφη που έχουν ήδη εμφανίσει αλλεργία σε τρόφιμα, αφού πολλά βρέφη με αλλεργία στο αγελαδινό γάλα εμφανίζουν αλλεργία και στο γάλα σόγιας. Τα πρόωρα βρέφη έχουν διαφορετικές ανάγκες από τα τελειόμηνα, αφού χρειάζονται μια περισσότερο εύπεπτη σύνθεση, η οποία συγχρόνως να είναι πλουσιότερη σε θρεπτικά συστατικά, όπως πρωτεΐνη, ανόργανα στοιχεία και βιταμίνες.

2. Σημασία της διατροφής στην βρεφική και παιδική ηλικία

Η ανάπτυξη των παιδιών δεν αναφέρεται μόνο στο μέγεθος, αλλά περιλαμβάνει και τις αλλαγές στη σύσταση και λειτουργία του σώματος, οι οποίες επηρεάζουν γενικότερα τις διατροφικές απαιτήσεις του. Οι αλλαγές αυτές είναι ουσιαστικότερες κατά τη βρεφική ηλικία, αφού στο στάδιο αυτό η αύξηση είναι ταχύτερη και ολοκληρώνεται σε μεγαλύτερο ποσοστό η λειτουργική ωρίμανση του βρεφικού οργανισμού. Όμως η ανάπτυξη των διαφόρων ιστών του σώματος δεν είναι ομοιόμορφη⁶. Για παράδειγμα, ο εγκέφαλος αυξάνεται απότομα κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης και συνεχίζεται με μικρότερο ρυθμό έως την ηλικία των 2 ετών⁸. Ο λιπώδης ιστός αυξάνει απότομα στη βρεφική ηλικία και λιγότερο κατά την εφηβεία^{9, 10}. Ο λεμφατικός ιστός αυξάνει ταχύτατα κατά την πρώτη βρεφική ηλικία και αργότερα προοδευτικά παύει η αύξησή του. Ως αποτέλεσμα, οι αλλαγές με την ηλικία που έχουν σχέση με την ανάπτυξη των διαφόρων οργάνων ή ιστών, επιβάλουν διατροφικές απαιτήσεις ανάλογα με την φάση της αύξησής⁶.

2.1. Ειδικές διατροφικές απαιτήσεις

Σε σύγκριση με τα ενήλικα άτομα, ένα βρέφος απαιτεί μεγαλύτερη ποσότητα διατροφικών στοιχείων ανά μονάδα βάρους σώματος. Οι διατροφικές απαιτήσεις δεν καλύπτουν μόνο την αύξηση αλλά και τον εντονότερο μεταβολισμό των παιδιών⁶. Με την

αύξηση της ηλικίας, μεταβαίνοντας από το στάδιο του θηλασμού στον απογαλακτισμό, ορισμένες βασικές διαιτητικές συνήθειες των βρεφών αλλάζουν. Ο μηχανισμός της αλλαγής αυτής υπαγορεύεται και από κοινωνικές αντιλήψεις, οι οποίες είναι συνήθως ιδεώδεις από διατροφική άποψη⁶. Μια άλλη βασική διαφορά των παιδιών από έναν ενήλικα αφορά τη μεγαλύτερη ευαισθησία του στο περιβάλλον και τις επιδράσεις του, με αποτέλεσμα να αυξάνει αντίστοιχα και η θνησιμότητά του. Τα παιδιά δεν είναι μόνο ευαίσθητα σε διατροφικούς αλλά και σε λοιμογόνους παράγοντες, οι οποίοι εμφανίζουν αλληλεπιδράσεις και τροποποιούνται ανάλογα με τις οικονομικό-κοινωνικές συνθήκες υπό τις οποίες μεγαλώνουν τα παιδιά. Γι' αυτό η θνησιμότητα στα προηγμένα κράτη είναι μικρότερη σε σύγκριση με τα υπό ανάπτυξη κράτη.

2.2. Διατροφή του βρέφους

Ένα φυσιολογικό βρέφος θηλάζει ή σιτίζεται με βρεφικά γάλατα. Παρότι τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές πρόοδοι στην κατεργασία του γάλακτος αγελάδας που προορίζεται για βρεφική διατροφή, ο θηλασμός θεωρείται ακόμη ως η ιδανική βρεφική διατροφή⁶. Το γάλα της μητέρας περιέχει ως κύρια πρωτεΐνη την γαλατολευκωματίνη και όχι την καζεΐνη του γάλακτος της αγελάδας, με αποτέλεσμα η πέψη-απορρόφηση-ανοχή του μητρικού γάλακτος είναι καλύτερες. Επιπλέον, οι πρωτεΐνες αυτές απορροφούνται από τα βρέφη σε μεγαλύτερο ποσοστό σε σύγκριση τα νεογνά της αγελάδας. Επειδή η πρωτεϊνική περιεκτικότητα του γάλακτος της γυναίκας είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με το γάλα της αγελάδας ενώ η περιεκτικότητα του μητρικού γάλακτος είναι χαμηλότερη σε άλατα και ιχνοστοιχεία, η νεφρική επιβάρυνση του βρέφους είναι μικρότερη κατά το θηλασμό. Το γάλα της αγελάδας είναι πλουσιότερο σε ιχνοστοιχεία και βιταμίνες (εκτός από των D,C και του νικοτινικού οξέος) και φτωχότερο σε υδατάνθρακες (λακτόζη) και πολυακόρεστα λιπαρά οξέα. Η μεγαλύτερη περιεκτικότητα του νατρίου στο γάλα της αγελάδας, σε συνδυασμό με τις πλούσιες σε αλάτι τροφές που χορηγούνται κατά τον απογαλακτισμό, επιβαρύνουν τη νεφρική λειτουργία και αποτελούν πιθανή αιτία εκδήλωσης αρτηριακής υπέρτασης σε μεγαλύτερη ηλικία¹¹. Παρόλο που το ασβέστιο βρίσκεται σε μεγαλύτερη περιεκτικότητα στο γάλα της αγελάδας, η απορρόφησή του είναι μικρότερη, κυρίως εξαιτίας του είδους των λιπών που περιέχονται στο γάλα αυτό. Επίσης, το αγελαδινό γάλα περιέχει περισσότερα λιπαρά οξέα σε σύγκριση με το μητρικό, ενώ γενικά τα λίπη του εμφανίζουν μικρότερη απορρόφηση (60-70%) σε σύγκριση με τα λίπη του μητρικού γάλακτος⁶. Τέλος, το γάλα της μητέρας είναι πλουσιότερο σε πολυακόρεστα λίπη και παλμιτικό οξύ που θεωρείται ένα κορεσμένο λιπαρό οξύ με πολύ καλή απορρόφηση.

Το μητρικό γάλα αποτελεί αναμφισβήτητα ένα ιδανικό τρόφιμο για τα βρέφη, παρότι τα βρεφικά γάλατα του εμπορίου μπορούν να θρέψουν ικανοποιητικά –ως μοναδική τροφή– τα βρέφη που δεν θηλάζονται. Προκειμένου να προαχθεί ο αποκλειστικός μητρικός θηλασμός τουλάχιστον για το πρώτο εξάμηνο της ζωής ενός βρέφους, και να αποθαρρυνθεί η χρήση των υποκατάστατων, έχει εκδοθεί από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας και τη UNICEF ο Διεθνής Κώδικας για τη διακίνηση των υποκατάστατων μητρικού γάλακτος⁷.

2.3. Διατροφή κατά τη βρεφική ηλικία 6 – 12 μηνών

Παρότι με την αύξηση της ηλικίας μειώνεται ο ρυθμός αύξησης, οι διαιτητικές απαιτήσεις παραμένουν υψηλές. Στην ηλικία αυτή τα βρέφη ήδη έχουν αρχίσει ή αρχίζουν να προσλαμβάνουν –εκτός του γάλακτος– και στερεά τροφή, αφού πλέον έχουν αναπτύξει την ικανότητα της μάσησης, κατάποσης και πέψης μιας μεγάλης ποικιλίας τροφίμων. Η προσθήκη στερεάς τροφής στη βρεφική διατροφή γίνεται σταδιακά, ανάλογα με τις πεποιθήσεις γύρω από την διατροφή, την παράδοση και κουλτούρα κάθε περιοχής. Στις περισσότερες χώρες έχει επικρατήσει η άποψη ότι οι στερεές τροφές θα πρέπει να προστίθενται μετά τον τέταρτο μήνα, χωρίς όμως αυτό να σημαίνει ότι ο γενικός κανόνας ακολουθείται πιστά από όλους. Συχνά υποστηρίζεται ότι τα βρέφη που εμφανίζουν κοιλιοκάκη από γλουτένη επιβαρύνονται ακόμη περισσότερο από την πρωιμότερη εισαγωγή στερεών τροφών που είναι πλούσιες σε γλουτένη. Δεν είναι γνωστό εάν η πρόωπη εισαγωγή της γλουτένης στην διαίτα προδιαθέτει στην εμφάνιση της κοιλιοκάκης σε βρέφη που δεν θα την εμφάνιζαν διαφορετικά⁶.

Υπάρχουν 4 λόγοι οι οποίοι αφορούν την ανάπτυξη και υπαγορεύουν την εισαγωγή στερεών και ημι-στερεών τροφών μετά τον 4^ο-6^ο μήνα της ζωής ενός βρέφους⁷.

- ✓ Τα αντανακλαστικά ώθησης της γλώσσας που εξακολουθεί να υπάρχει μέχρι την ηλικία των 4-5 μηνών.
- ✓ Ο εμετός λόγω του γαστροοισοφαγογικού αντανακλαστικού που αυξάνει τον κίνδυνο εισρόφησης και εξακολουθεί να υπάρχει σε περισσότερα από τα μισά βρέφη μέχρι την ηλικία των 4-6 μηνών.
- ✓ Η δυνατότητα ελέγχου του κεφαλιού μετά τον 4^ο μήνα.
- ✓ Η ικανότητα του βρέφους να παράγει παγκρεατική αμυλάση και γαστρική πεψίνη δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως μέχρι τους 9 μήνες.

Η κατάλληλη ηλικία για την εισαγωγή στερεάς τροφής στη διαίτα του βρέφους θεωρείται ο έκτος μήνας. Οι παράγοντες που την καθορίζουν είναι εξατομικευμένοι και αναφέρονται στις ιδιαίτερες απαιτήσεις του σε θρεπτικά συστατικά, το ρυθμό ανάπτυξης του

και τη φυσική του δραστηριότητα. Όμως, σε γενικές γραμμές ένα βρέφος θεωρείται έτοιμο για την αποδοχή στερεάς τροφής όταν⁷:

- ✓ Μπορεί να κάθεται από μόνο του και να ελέγχει τις κινήσεις του κεφαλιού του.
- ✓ Το σωματικό του βάρος έχει διπλασιαστεί.
- ✓ Είναι περίπου 6 μηνών.

Το γάλα εξακολουθεί να αποτελεί την κυριότερη πηγή θρεπτικών συστατικών. Ο μητρικός θηλασμός συνίσταται να συνεχίζεται μέχρι τον 12^ο μήνα. Η εισαγωγή των ημιστερεών και στερεών τροφών στην διατροφή του βρέφους δεν συμβάλλει μόνο στην κάλυψη των διατροφικών του αναγκών, αλλά προάγει και την γενικότερη ανάπτυξη του, αφού η⁷

- ✓ εισαγωγή τροφών διαφορετικής γεύσης και υφής προάγει τη δεξιότητα της μάσησης.
- ✓ μάσηση βελτιώνει το συντονισμό στόματος και γλώσσας, που είναι σημαντικός για την ανάπτυξη της ομιλίας.
- ✓ αποτυχία της εισαγωγής τροφών διαφορετικής γεύσης και υφής μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την άρνηση του βρέφους να καταναλώσει αυτές τις τροφές αργότερα.

Εξάλλου, ο εμπλουτισμός της δίαιτας με στερεές τροφές και μάλιστα σε σημαντικές ποσότητες, ελλοχεύει τον κίνδυνο της παχυσαρκίας. Για τον λόγο αυτό, με την πρόοδο της διατροφής, η προσλαμβανόμενη ποσότητα γάλακτος συνιστάται να βαίνει μειούμενη, όσο αυξάνεται η ποσότητα της προσλαμβανόμενης της στερεάς τροφής. Σε κάθε όμως περίπτωση η πρόσληψη νερού είναι απαραίτητο να παραμείνει σε υψηλά επίπεδα. Είναι μάλιστα προτιμότερη ως πηγή πρόσληψης νερού η αραίωση του χυμού των φρούτων για βελτίωση της γεύσης και λιγότερες θερμίδες, σε σύγκριση με το γάλα που ικανοποιεί το αίσθημα της δίψας και της πείνας, αλλά περιέχει περισσότερες θερμίδες⁶.

Με την έναρξη της χορήγησης των στερεών τροφών συνηθίζεται το βρέφος να συνεχίζει το θηλασμό ή τη διατροφή με γάλα αγελάδας. Η χορήγηση κοινού γάλακτος είναι εξίσου ασφαλής και πολύ οικονομικότερη, αρκεί να υπάρχει πρόνοια για συμπληρωματική χορήγηση των βιταμινών C και D, αφού οι πλέον συνηθισμένες ανεπάρκειες της ηλικίας αυτή είναι η σιδηροπενική αναιμία, η ραχίτιδα και το σκορβούτο.

Στο στάδιο του «απογαλακτισμού», το βρέφος μαθαίνει να δέχεται τροφή με το κουτάλι. Η ποσότητα της τροφής που δίνεται στα βρέφη με το κουτάλι είναι αρχικά πολύ μικρή (1-2 κουταλάκια του γλυκού) και αυξάνεται σταδιακά. Τα πρώτα τρόφιμα έχουν μαλακή υφή και όχι έντονη οσμή και γεύση. Γενικά στα βρέφη από την στιγμή της γέννησης τους, αρέσει η γλυκιά γεύση, δεν αρέσει η πικρή και η ξινή γεύση, ενώ η αλμυρή γεύση τους είναι αδιάφορη. Αρχικά δίνονται κρέμες δημητριακών που αναμιγνύονται με νερό, όπως το γαλακτούχο ρυζάλευρο χωρίς ζάχαρη ή άλλα άλευρα που δεν περιέχουν γλουτένη,

πολτοποιημένα φρούτα και βρασμένα λαχανικά. Σταδιακά, το βρέφος δοκιμάζει νέες γεύσεις, όπως το πολτοποιημένο βραστό κρέας και το κοτόπουλο, καθώς και μια μεγαλύτερη ποικιλία λαχανικών. Στο στάδιο αυτό, δύο έως τρία από τα 5 γεύματα της ημέρας δίνονται με κουτάλι, ενώ η κατανάλωση του γάλακτος -μητρικού ή υποκατάστατου- περιορίζεται στο πρωινό και βραδινό γεύμα. Συνήθως, το δεκατιανό αποτελείται από πολτοποιημένα φρούτα, το μεσημεριανό από σούπα που περιέχει λαχανικά, κρέας ή κοτόπουλο και το απογευματινό από κρέμα. Στη συνέχεια (περίπου στον 8^ο μήνα), αρχίζουν σταδιακά να εισάγονται τρόφιμα με περισσότερο έντονη γεύση, όπως το ψάρι και το αυγό (μόνο ο κρόκος), καθώς και γιαούρτι αντί της απογευματινής κρέμας. Τέλος, τον 10^ο μήνα περίπου μπορεί να δοθεί και το ασπράδι του αυγού. Μέχρι το τέλος του πρώτου έτους, το διαιτολόγιο του βρέφους θα πρέπει να περιλαμβάνει τρόφιμα από όλες τις ομάδες. Η υφή των τροφών που προσφέρονται στο βρέφος θα πρέπει να διαφοροποιείται σταδιακά και από την πολτοποιημένη μορφή θα πρέπει να γίνει μετάβαση στην ψιλοκομμένη μορφή, προκειμένου να ενθαρρυνθεί η μάσηση. Θα πρέπει να δίνονται στο βρέφος τροφές κομμένες σε μικρά κομμάτια, όπως τυρί, ψωμί ή ορισμένα φρούτα, για να μάθει να μασάει. Στο στάδιο αυτό δεν κρίνεται πλέον απαραίτητο η τροφή του βρέφους να παρασκευάζεται χωριστά από την τροφή της υπόλοιπης οικογένειας, θα πρέπει όμως να ψιλοκόβεται. Όσον αφορά τα νέα τρόφιμα, αυτά θα πρέπει να εισάγεται ένα κάθε φορά, με διαφορά μιας εβδομάδας από το προηγούμενο νέο τρόφιμο, ώστε να μπορούν να επισημανθούν τυχόν αλλεργίες ή ευαισθησίες που ενδεχομένως να έχει το βρέφος. Ως παράδειγμα, όταν αρχίζουν να εισάγονται στο διαιτολόγιο εμπλουτισμένα δημητριακά, είναι σκόπιμο να προσφερθεί πρώτα το ρύζι που προκαλεί τα λιγότερα προβλήματα αλλεργίας και τελευταίο το σιτάρι, το οποίο προκαλεί προβλήματα συχνότερα. Για τον ίδιο λόγο, Το ασπράδι του αυγού, τα προϊόντα σόγιας, τα εσπεριδοειδή και το αγελαδινό γάλα πρέπει να εισάγονται αργότερα.⁶

Αργότερα, θα πρέπει να δοθούν σε μικρές ποσότητες τρόφιμα ενηλίκων (μαγειρεμένα χωρίς αλάτι) που έχουν πολτοποιηθεί σε μίξερ. Τα τρόφιμα αυτά μπορούν να συντηρηθούν στο ψυγείο και να καταναλώνονται την επόμενη μέρα, ενώ εναλλακτική λύση -ειδικά για τα ταξίδια- αποτελούν οι προπαρασκευασμένες ημι-στερεές τροφές του εμπορίου, οι οποίες χρειάζεται μόνο να θερμανθούν. Στην περίπτωση αυτή δεν συνιστώνται τα κονσερβοποιημένα λαχανικά, τα οποία περιέχουν συνήθως αλάτι, ενώ ορισμένα θρεπτικά συστατικά έχουν χαθεί κατά την κονσερβοποίηση. Επιπλέον, δεν πρέπει να δίνεται στα βρέφη μέλι για να αποφευχθεί ο κίνδυνος της αλλαντίασης, ένα είδος τροφικής δηλητηρίασης που οφείλεται στους σπόρους του κλωστριδίου της αλλαντίασης (*Clostridium botulinum*) που μπορεί να υπάρχουν στο μέλι. Σε γενικές γραμμές, παρότι τα περισσότερα τρόφιμα μπορούν

να καταναλωθούν από το βρέφος (σε διάφορες μορφές), για ορισμένα από αυτά πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή και είναι καλύτερο να αποφεύγονται⁶:

- ✓ τα ελαφρά βρασμένα αυγά (μελάτα), λόγω πιθανής μόλυνσης από *Salmonella*. Τα αυγά αυτά πρέπει να βράζονται για 2-3 λεπτά.
- ✓ οι ολόκληροι (ή αποφλοιωμένοι) ξηροί καρποί λόγω κινδύνου πνιγμού. Αυτοί είναι προτιμότερο να αποφεύγονται μέχρι την ηλικία των 5 ετών.
- ✓ τα σταφύλια, σταφίδες, κομμάτια λουκάνικου και ωμού καρότου, λόγω κινδύνου πνιγμού.
- ✓ τα καυτερά και πικάντικα τρόφιμα.
- ✓ τα πατέ και μαλακά τυριά, λόγω του έστω και χαμηλού κινδύνου μόλυνσης από *Listeria monocytogenes*.

Τέλος, καλό είναι μην προστίθενται στο φαγητό ζάχαρη και αλάτι.

2.4. Διατροφή παιδιών ηλικίας 1 - 4 ετών

Η χρονική περίοδος από την βρεφική έως την εφηβική ηλικία, δηλαδή μέχρι την στιγμή που αρχίζουν να διαφοροποιούνται από τα δύο φύλα, ονομάζεται παιδική ηλικία. Αυτή χωρίζεται σε τρεις υπό-περιόδους ηλικίας, τη(ν)⁷:

- ✓ νηπιακή (1-3 ετών)
- ✓ προσχολική (4-6 ετών)
- ✓ σχολική (7-10 ετών)

Μετά το πρώτο έτος το παιδί αυξάνεται με αργότερο, αλλά σταθερότερο, ρυθμό έως την προεφηβική ηλικία, οπότε εμφανίζεται η αυξητική αιχμή της εφηβείας. Το γάλα αποτελεί για την ηλικία αυτή στις αναπτυγμένες χώρες μια σπουδαία πηγή θρεπτικών συστατικών, αφού ένα παιδί προσλαμβάνοντας ημερησίως κατά μέσο όρο 400 mL γάλακτος, καλύπτει περισσότερο από το 1/3 των αναγκών του σε θερμίδες, πρωτεΐνες, ασβέστιο και ριβοφλαβίνη. Υπάρχουν βέβαια και παιδιά που καταναλώνουν μικρότερες ποσότητες, χωρίς καμία ιδιαίτερη επίπτωση στην ανάπτυξή τους. Στις υπό ανάπτυξη χώρες δεν υπάρχει οικονομική ευχέρεια για μια τόσο σημαντική πρόσληψη γάλακτος. Επομένως το παιδί δεν προσλαμβάνει αξιόλογα ποσά θερμίδων και πρωτεϊνών, γιατί τα συνηθισμένα υποκατάστατα του γάλακτος είναι φτωχά σε απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία. Άλλωστε, υπολογίζεται ότι γύρω στον 18^ο μήνα, οι δίαιτες των παιδιών περιλαμβάνουν σχεδόν όλες τις τροφές των ενηλίκων¹².

Η υπολακτασία ενηλίκων και παιδιών δημιουργεί προβλήματα στην πέψη και απορρόφηση του γάλακτος, παρότι τα τελευταία φαίνεται ότι ξεπερνιέται τη χρησιμοποίηση σύνθετης λακτάσης, η οποία διασπά τη λακτόζη σε γλυκόζη και γαλακτόζη. Στο εμπόριο

υπάρχουν γάλατα των οποίων η τιμή είναι σχετικά υψηλή και η λακτόζη τους έχει υποκατασταθεί από άλλους υδατάνθρακες⁶.

Μια ισορροπημένη διατροφή, η οποία περιλαμβάνει ποικιλία τροφών από όλες τις κατηγορίες, μπορεί να προσφέρει στο παιδί την ενέργεια και τα θρεπτικά συστατικά που είναι απαραίτητα για την ομαλή ανάπτυξη και διατήρηση της υγείας του. Οι κατηγορίες αυτές είναι:

- ✓ Γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα.
- ✓ Κρέας, ψάρι, κοτόπουλο, αβγό, όσπρια.
- ✓ Ψωμί, ζυμαρικά, ρύζι, πατάτες.
- ✓ Φρούτα και λαχανικά.
- ✓ Ελαιόλαδο.

Οι ευρωπαϊκές οδηγίες-πλαίσιο περί της σωστής διατροφής συνιστούν τα παιδιά να λαμβάνουν επαρκείς μερίδες από όλες τις ομάδες τροφίμων, ανάλογα με τις ανάγκες κάθε ηλικιακής ομάδας. Τα τρόφιμα αυτά θα πρέπει να κατανέμονται σε μικρά και συχνά γεύματα κατά την διάρκεια της ημέρας, ενώ όλες οι γενικές συστάσεις για ποικιλία τροφίμων, περιορισμό κορεσμένων λιπών, λογική χρήση αλατιού, μείωση κατανάλωσης γλυκισμάτων και η προτροπή για έντονη φυσική δραστηριότητα και αυξημένη πρόληψη φρούτων-λαχανικών, που συνιστώνται για τους ενήλικες είναι δυνατόν να προσαρμοστούν και για τα παιδιά. Πλέον συγκεκριμένα, το διαιτολόγιο ενός παιδιού θα πρέπει να περιλαμβάνει:

- ✓ Μια μικρή μερίδα σαλάτα σε κάθε γεύμα και μαγειρεμένα λαχανικά ή χορτόσουπα.
- ✓ 2-4 φρούτα την ημέρα (ωμά πολτοποιημένα ή ως χυμό ή κομπόστα) 2-3 μερίδες γαλακτοκομικών προϊόντων την ημέρα (γάλα, τυρί, γιαούρτι, κρέμα ή παγωτό)
- ✓ 1-2 φορές την εβδομάδα όσπρια
- ✓ 2 φορές την εβδομάδα ψάρι, 4-5 αβγά και 1-3 φορές κρέας και κοτόπουλο
- ✓ Ελαιόλαδο για όλες τις χρήσεις
- ✓ Ανάλατους ξηρούς καρπούς και μικρογεύματα

Η αποδοχή των τροφίμων επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως η κατάσταση θρέψης, ο βαθμός κορεσμού, οι προηγούμενες εμπειρίες και τα ατομικά πιστεύω για συγκεκριμένα τρόφιμα, καθώς και οι οικογενειακές συνήθειες. Επιπλέον, τα χαρακτηριστικά των τροφίμων επηρεάζουν την αποδοχή τους από τα παιδιά, αφού η υφή, το σχήμα, χρώμα και η γεύση, ακόμα και το μέγεθος των μερίδων μπορούν να παίξουν σημαντικό ρόλο για το πως ένα παιδί αποδέχεται ένα συγκεκριμένο τρόφιμο. Σε γενικές γραμμές, ένα παιδί γενικά δεν προτιμά τα πολύ ξηρά και σκληρά τρόφιμα, αλλά αντίθετα επιζητά τα τρυφερά και πλέον

ζουμερά. Πολλές φορές δείχνει ενδιαφέρον για διάφορα τραγανιστά τρόφιμα, όπως τα ωμά λαχανικά που μπορεί να μασάει ή να ακούει διάφορους ήχους που παράγονται κατά την μάσηση και να του κεντρίζουν την προσοχή. Προτιμά τρόφιμα με έντονα ζωηρά χρώματα, αλλά με ήπιες γεύσεις και μυρωδιές, αφού διαθέτει πολλούς γευστικούς κάλυκες με αποτέλεσμα να αντιλαμβάνεται με μεγαλύτερη οξύτητα τη γεύση. Τα διάφορα καρυκεύματα και μπαχαρικά (πιπέρι, αλάτι, ξύδι κ.τ.λ.) πρέπει να προστίθενται με μέτρο στο φαγητό, αν και ορισμένα παιδιά εμφανίζουν μια προτίμηση στις «ελαφρά καυτερές σάλτσες», γεγονός που έρχεται σε αντίθεση με τα παραπάνω (και πιθανότατα σχετίζεται με το παράδειγμα που παίρνουν από τους γονείς). Τέλος, οι μεγάλες μερίδες μπορεί να αποτρέψουν και τρομάξουν το παιδί, ώστε να αρνηθεί το συγκεκριμένο φαγητό. Τα τρόφιμα πρέπει να είναι διαχωρισμένα στο πιάτο, ώστε να διακρίνονται και να αναγνωρίζονται.⁷

Η οικογένεια, ιδιαίτερα κατά την νηπιακή ηλικία, αποτελεί το βασικότερο παράγοντα που επηρεάζει τις συνήθειες του παιδιού στο φαγητό, αφού οι γονείς με το παράδειγμά τους μεταφέρουν συμπεριφορές σε θέματα διατροφής. Πάντως παραμένει άγνωστο σε τι ποσοστό οι επιλογές ή οι συγκεκριμένες προτιμήσεις των τροφίμων από παιδιά οφείλονται σε γενετικούς παράγοντες ή περιβαλλοντικές επιδράσεις. Οι γονείς οφείλουν να προσφέρουν στο παιδί ένα ισορροπημένο διαιτολόγιο χρησιμοποιώντας την επιρροή που ασκούν, η οποία δεν περιορίζεται μόνο στην υγιεινή και ασφάλεια του φαγητού, αλλά συμπεριλαμβάνει την ποικιλία, ποσότητα, το ωράριο των γευμάτων και πολύ περισσότερο την ατμόσφαιρα που υπάρχει γύρω από το τραπέζι. Βέβαια, οι αλλαγές στη δομή της οικογένειας με την μητέρα να απασχολείται πολλές ώρες εκτός σπιτιού είχαν ως αποτέλεσμα τον περιορισμό των γευμάτων στα οποία συνυπάρχουν όλα τα μέλη της οικογένειας, με αποτέλεσμα το παιδί να αναγκάζεται πολλές φορές να τρώει μόνο του. Παρόλα αυτά όμως πάντα υπάρχει η δυνατότητα να αφιερώνουν οι γονείς κάποιο χρόνο για την προετοιμασία του φαγητού, να βρίσκονται όλοι μαζί στο τραπέζι τουλάχιστον για κάποιο γεύμα και να εξασφαλίζουν στο παιδί το κατάλληλο περιβάλλον και την συναισθηματική ασφάλεια που θα του παρέχει τη δυνατότητα να απόλαυση το φαγητό⁷.

Στην σύγχρονη εποχή φαίνεται ότι τα παιδιά από μικρή ηλικία περνούν πολλές ώρες μπροστά στην τηλεόραση, με αποτέλεσμα να γίνονται αποδέκτες μηνυμάτων που μεταφέρονται μέσω είτε προγραμμάτων ή διαφημίσεων. Τα μηνύματα αυτά δεν αφορούν μόνο την αποδοχή και κατανάλωση συγκεκριμένων φαγητών, αλλά και την υιοθέτηση μιας συγκεκριμένης συμπεριφοράς σχετικά με τη διατροφή, αφού τα περισσότερα από τα διαφημιζόμενα τρόφιμα σχετίζονται με προϊόντα που καταναλώνονται κυρίως από παιδιά. Τα περισσότερα από αυτά είναι ιδιαίτερα εύληπτα, πλούσια σε λίπος, ζάχαρη και φτωχά σε φυτικές ίνες, σίδηρο (για παράδειγμα, δημητριακά πρωινού με πρόσθετη ζάχαρη,

αναψυκτικά, μπισκότα, σοκολάτες, γαριδάκια, πατατάκια, κ.α.). Επίσης, αντίστοιχα χαμηλής διατροφικής αξίας είναι και τα διάφορα μικρογεύματα και αναψυκτικά. Συνήθως ένα νήπιο ή παιδί προσχολικής ηλικίας δεν μπορεί να ξεχωρίσει τις διαφημίσεις από το κανονικό πρόγραμμα της τηλεόρασης και συνήθως δίνει περισσότερη προσοχή στις διαφημίσεις, αφού του κεντρίζουν το ενδιαφέρον, αφού εντυπωσιάζεται από τη μουσική, τα χρώματα, σχήματα και τους γοργούς ρυθμούς⁷.

2.5. Διατροφικές συνήθειες βρεφών και παιδιών μικρής ηλικίας σε χώρες εκτός Ευρώπης

Οι Fox και άλλοι μελέτησαν το 2004¹³ τα πρότυπα κατανάλωσης τροφίμων σε βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας των Η.Π.Α. σε δείγμα 3.022 ατόμων από όλη τη χώρα. Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης πραγματοποιήθηκε με τηλεφωνικές συνεντεύξεις και ανακλήσεις 24h. Το ποσοστό των βρεφών και παιδιών μικρής ηλικίας που κατανάλωσε τρόφιμα συγκεκριμένων κατηγοριών εκτιμήθηκε για 6 ηλικιακές ομάδες και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

	Ποσοστό των βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν τουλάχιστον ένα την ημέρα					
	4-6 μηνών	7-8 μηνών	9-11 μηνών	12-14 μηνών	15-18 μηνών	19-24 μηνών
Κατηγορία τροφίμου						
Γάλα (γενικά)	100	100	99.7	98.8	94.6	93.4
Μητρικό γάλα	39.6	25.7	21.3	13.6	4.2	4.5
Φόρμουλα γάλακτος	74.1	82.2	75	21.2	5.1	1.5
Αγελαδινό γάλα	0.8	2.9	20.3	84.8	88.3	87.7
γάλα σόγιας	0	0.5	1.7	1.5	3.9	3.8
κατηγορία αγελαδινού γάλακτος						
πλήρες	0.5	2.4	15.1	68.8	71.1	58.8
με χαμηλά ή καθόλου λιπαρά	0.3	0.5	5.3	17.7	20.7	38.1
μη αρωματισμένο	0.8	2.6	19.5	84	87	86.5
αρωματισμένο	0	0	0.9	1.8	4.4	5.6

Πίνακας 2.1. Ποσοστό βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν διαφορετικούς τύπους γάλακτος

	Ποσοστό των βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν τουλάχιστον ένα την ημέρα					
	4-6 μηνών	7-8 μηνών	9-11 μηνών	12-14 μηνών	15-18 μηνών	19-24 μηνών
Κατηγορία τροφίμου						
Προϊόντα με κύριο συστατικό τα δημητριακά						
65.8	91.5	97.5	97.8	98.6	99.2	
παιδικές τροφές με βάση τα δημητριακά	64.8	81.5	63.8	23.9	9.2	3.1
δημητριακά πρωινού	0.6	18.3	44.3	58.9	60.5	51.9
Χωρίς γλύκανση	0.5	17	37	44.5	40.6	31.9
με γλύκανση	0	1.8	9	17.7	26.4	22.7
Ψωμί	0.6	9.9	24.5	47.3	52.7	53.1
κρακεράκια, πρέτσελ και ρυζογκοφρέτες	3	16.2	33.4	45.3	46.4	44.7
μπάρες δημητριακών	0	1.1	3.4	9.8	10	9.7
τηγανίτες, βάφλες, ψωμί για τoστ	0.1	0.8	7.5	15.1	16.1	15.4

ρύζι και ζυμαρικά	2.3	4.5	18.2	26.2	39	35.9
άλλα	0.2	0.1	2.7	2.8	2.5	4.5
Έτοιμα γεύματα που περιέχουν δημητριακά	0.4	5.3	24.1	48.3	52	55.1
sandwich	0	1.1	8.6	21.5	25.8	25.8
buritto, taco, enchilada, nachos	0	0	1	4.5	2.8	2.1
έτοιμο γεύμα μακαρόνια με τυρί	0.2	1.6	4.9	14.6	15	15
πίτσα	0.1	0.7	2.2	6.8	9	9.4
ζεστές πίττες και έτοιμα γεύματα μικροκυμμάτων	0	0.9	0.5	2	1	1.8
μακαρονάδες, λαζάνια και άλλα παρεμφερή πιάτα	0.1	1.8	9.9	15.3	12.1	8.8

Πίνακας 2.2. Ποσοστό βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν διαφορετικούς τύπους προϊόντων με βάση τα δημητριακά

	Ποσοστό των βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν τουλάχιστον ένα την ημέρα					
	4-6 μηνών	7-8 μηνών	9-11 μηνών	12-14 μηνών	15-18 μηνών	19-24 μηνών
Κατηγορία τροφίμου						
Φρούτα (σύνολο)	41.9	75.5	75.8	77.2	71.8	67.3
παιδικές τροφές με βάση τα φρούτα	39.1	67.9	44.8	16.2	4.2	1.8
έτοιμες τροφές με βάση τα φρούτα	5.3	14.3	44.2	67.1	69.4	66.8
Κατηγορίες μη γευμάτων μη παιδικών τροφών						
Κονσέρβες	1.4	5.8	21.6	31.9	25.1	20.2
σε σιρόπι	0.7	0.7	8.1	14.9	12.7	8.1
σε χυμό ή νερό	0.7	4.5	13.5	18.5	11.3	11.4
άλλα	0	0.7	1.5	1.2	3.1	1.2
φρέσκα φρούτα	4.4	9.5	29.5	52.1	55	54.6
αποξηραμένα φρούτα	0	0.4	2.1	3.5	7.1	9.4
Ανά κατηγορία φρούτου						
μήλα	18.6	33.1	31.6	27.5	19.8	22.4
μπανάνες	16	30.6	34.5	37.8	32.4	30
μούρα	0.1	0.6	5.3	66.6	11.3	7.7
εσπεριδοειδή	0.2	0.4	1.6	4.9	7.3	5.1
πεπόνι	0.6	1	4.4	7.3	7.2	9.6

Πίνακας 2.3. Ποσοστό βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν διαφορετικούς τύπους προϊόντων με βάση τα φρούτα

	Ποσοστό των βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν τουλάχιστον ένα την ημέρα					
	4-6 μηνών	7-8 μηνών	9-11 μηνών	12-14 μηνών	15-18 μηνών	19-24 μηνών
Κατηγορία τροφίμου						
Λαχανικά (σύνολο)	39.9	66.5	72.6	76.5	79.2	81.6
παιδικές τροφές με βάση τα λαχανικά	35.7	54.5	34.4	12.7	3	1.6
μαγειρεμένα λαχανικά	5.2	17.4	45.9	66.3	72.9	75.6
ωμά λαχανικά	0.5	1.6	5.5	7.9	14.3	18.6
Ανά κατηγορία λαχανικού						
"πράσινα" λαχανικά (σπανάκι, μπρόκολο κ.α.)	0.1	2.9	4.2	5	10.4	7.8
"κίτρινα" λαχανικά (καρότα, γλυκοπατάτες κ.α.)	26.5	39.3	29	24	13.6	13.4
πατάτες	3.6	12.4	24.1	33.2	42	40.6
τηγανιτές πατάτες	0.7	2.9	8.6	12.9	19.8	25.5
άλλα αμυλώδη λαχανικά	6.5	10.6	16.9	17.3	20.8	24.2
άλλα λαχανικά	11.2	25.9	35.1	39.1	45.6	43.3

Πίνακας 2.4. Ποσοστό βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν διαφορετικούς τύπους προϊόντων με βάση τα λαχανικά

	Ποσοστό των βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν τουλάχιστον ένα την ημέρα					
	4-6 μηνών	7-8 μηνών	9-11 μηνών	12-14 μηνών	15-18 μηνών	19-24 μηνών
Κατηγορία τροφίμου						
Κρέας και άλλες πηγές πρωτεϊνών	14.2	54.9	79.2	91.3	92.7	97.2
παιδικές τροφές με βάση το κρέας	1.7	4	3.1	1.1	0	0
έτοιμες τροφές με βάση το κρέας	1.5	8.4	33.7	60.3	76.3	83.7
άλλες πηγές πρωτεϊνών	2.7	9.7	36.1	59.2	66.8	68.9
όσπρια και άλλα λαχανικά υποκατάστατα του κρέατος	0.6	1.3	3.3	7	6.6	9.9
αυγά	0.7	2.9	7.3	17	25	25.2
φιστικοβούτυρο, ξηροί καρποί και σπόροι	0	0.5	1.9	8.8	11.6	10.4
τυρί	0.4	2.1	18.5	34	39.1	41.1
γιαούρτι	1.2	4.1	15.7	14.9	20.2	15.3
Πηγές πρωτεϊνών σε έτοιμα γεύματα	11	43.3	46.2	30.1	25.5	20.5
έτοιμα γεύματα παιδικών τροφών	9.5	39.8	33.5	10.2	2.4	1.3
γεύματα νε φασόλια, ρύζι και άλλα παρεμφερή	0	0	0.9	1.2	2.1	2
μίγματα λαχανικών με ρύζι/ζυμαρικά	0.9	1.2	4.7	8.2	9	7.8
σούπες	0.9	3.4	10.1	12.5	13.8	11.5
ανά κατηγορία κρέατος						
βόειο	0.9	2.6	7.7	16.1	16.3	19.3
κοτόπουλο ή γαλοπούλα	2	7.3	22.4	33	46.9	47.3
θαλασσινά	0	0.5	1.9	5.5	8.7	7.1
λουκάνικα	0	2.1	7.1	16.4	20.1	27
χοιρινό	0.3	1.7	4	9.7	11.2	13.9
άλλα	0	0.6	2.5	2.8	2.1	3.9

Πίνακας 2.5. Ποσοστό βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν διαφορετικούς τύπους προϊόντων με βάση το κρέας και άλλες πηγές πρωτεΐνης

	Ποσοστό των βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν τουλάχιστον ένα την ημέρα					
	4-6 μηνών	7-8 μηνών	9-11 μηνών	12-14 μηνών	15-18 μηνών	19-24 μηνών
Κατηγορία τροφίμου						
Επιδόρπια, γλυκίσματα, γλυκά ποτά και αλμυρά σνακ (σύνολο)	10.4	45.8	61.1	78.8	88.8	90.5
Επιδόρπια και ζαχαρωτά	8.4	40.3	53.8	65.4	73	75.1
έτοιμες παιδικές τροφές (επιδόρπια)	4.2	17.7	17	6	2.3	0
κέικ, πίτες, μπισκότα, πάστες	4.3	27	40.9	50.5	60.2	61.6
μπισκότα για βρέφη και μικρά παιδιά	2.8	17.2	18	16.2	13	10.6
άλλα είδη μπισκότου	0.7	8	19.2	28	40.8	36.6
κέικ	0.2	0.6	2.5	3.9	3.5	4.4
πίτες και πάστες	0	0.1	0.8	1.9	2.3	3
ντόνατ, μάφινς	0.3	0.8	3.4	4.8	8.8	11.6
Παγωτά, παγωμένο γιαούρτι, πουτίγκα	0.7	3.2	6.7	10.5	16.5	16.3
άλλα είδη επιδορπίου	0.4	1.3	3.5	5.6	5.5	10.7
ζαχαρωτά	0	1.1	3.2	10.2	15.2	20
άλλα γλυκίσματα	1.7	3.6	7.4	20.9	30.7	28
αρωματισμένο γάλα	0	0	0.1	1.2	2.9	4.6
ζάχαρη, σιρόπι, άλλα γλυκαντικά	1.7	3.6	7.3	20.7	28.3	23.4
Γλυκά ποτά	0.6	7.5	11.2	28.2	36.7	44.3
ανθρακούχα ποτά	0	1.1	1.4	4.1	10.1	11.4
φρουτώδη ποτά	0.6	6.6	9.2	23	29.6	37.5
άλλα	0	0.6	1	31	4	2.9
αλμυρά σνακ	0	2	5.8	15.6	21.2	26.6

Πίνακας 2.5. Ποσοστό βρεφών και μικρών παιδιών που καταναλώνουν διαφορετικούς τύπους επιδορπίων, γλυκισμάτων, γλυκών ποτών και αμυρών σνακ

Αναλυτικότερα, τα βρέφη μέχρι την ηλικία των 7 μηνών επέδειξαν διατροφική συμπεριφορά παρόμοια με αυτή των παιδιών μεγαλύτερης ηλικίας και των ενηλίκων. Το 18 – 33% του πληθυσμού μεταξύ των ηλικιών 7 – 24 μηνών δεν εμφάνισε προτίμηση σε κάποιο ιδιαίτερο είδος λαχανικών και το 23 – 33% δεν καταναλάωνε φρούτα. Οι τηγανιτές πατάτες αποτελούν ένα από τα τρία πλέον δημοφιλή λαχανικά που καταναλώνονται ακόμα και σε ηλικίες 9 – 11 μηνών. Στις ηλικίες 15 – 18 μηνών οι τηγανιτές πατάτες αποτελούν το λαχανικό που καταναλώνεται σε μεγαλύτερο βαθμό. Το 46% του πληθυσμού ηλικίας 7 – 8 μηνών καταναλώνει κάποιο είδος επιδορπίου, γλυκού ή σακχαρώδους ποτού, με το ποσοστό να αυξάνει με την ηλικία. Στις ηλικίες 19 – 24 μηνών το 62% των παιδιών καταναλώνει κάποιο είδος ψημένου επιδορπίου, το 20% καραμέλες και το 44% σακχαρώδη ποτά. Όσον αφορά τα φρούτα και τα λαχανικά, τα πέντε πλέον δημοφιλή προϊόντα που καταναλώνονται σε μεγαλύτερη ποσότητα ανά ηλικιακή ομάδα παρουσιάζονται στους παρακάτω πίνακες:

Φρούτα με υψηλότερη κατανάλωση ανά ηλικιακή ομάδα	Ποσοστό κατανάλωσης τουλάχιστον ένα την ημέρα	Λαχανικά με υψηλότερη κατανάλωση ανά ηλικιακή ομάδα	Ποσοστό κατανάλωσης τουλάχιστον ένα την ημέρα
4-6 μηνών		4-6 μηνών	
πουρές μήλου (παιδική τροφή)	17.5	καρότα (παιδικές τροφές)	9.6
μπανάνες (παιδική τροφή)	13	πατάτες (παιδικές τροφές)	9.1
αχλάδια (παιδική τροφή)	7.5	κολοκύθι (παιδικές τροφές)	8.1
ροδάκινα (παιδική τροφή)	7.4	πράσινα φασόλια (παιδικές τροφές)	7.2
φρέσκια μπανάνα	0.3	αρακάς (παιδικές τροφές)	5
7-8 μηνών		7-8 μηνών	
πουρές μήλου (παιδική τροφή)	29	καρότα (παιδικές τροφές)	14.2
μπανάνες (παιδική τροφή)	25.2	πατάτες (παιδικές τροφές)	12.9
αχλάδια (παιδική τροφή)	18.2	κολοκύθι (παιδικές τροφές)	12.9
ροδάκινα (παιδική τροφή)	13.1	πράσινα φασόλια (παιδικές τροφές)	11.2
φρέσκια μπανάνα	6.6	ανάμικτα λαχανικά (παιδικές τροφές)	10.1
9-11 μηνών		9-11 μηνών	
φρέσκια μπανάνα	19	πράσινα λαχανικά (μαγειρεμένα)	9.7
πουρές μήλου (παιδική τροφή)	17.7	πολτοποιημένες πατάτες	9
μπανάνες (παιδική τροφή)	16.8	τηγανιτές πατάτες	8.6
αχλάδια (παιδική τροφή)	12.4	ανάμικτα λαχανικά (παιδικές τροφές)	8.4
πουρές μήλου (κονσέρβα)	11.1	καρότα (μαγειρεμένα)	8
12-14 μηνών		12-14 μηνών	
φρέσκια μπανάνα	33	πράσινα λαχανικά (μαγειρεμένα)	18.2
πουρές μήλου (κονσέρβα)	15.2	τηγανιτές πατάτες	12.9
φρέσκα σταφύλια	9	καρότα (μαγειρεμένα)	11.5
φρέσκα μήλα	8.8	πολτοποιημένες πατάτες	10.3
ροδάκινα (κονσέρβα)	7.2	αρακάς (μαγειρεμένος)	8.4
ανάμικτα φρούτα (κονσέρβα)	7.2		
15-18 μηνών		15-18 μηνών	
φρέσκια μπανάνα	30.5	τηγανιτές πατάτες	19.8
φρέσκα σταφύλια	13.2	πράσινο φασολάκι (μαγειρεμένο)	16.7
φρέσκα μήλα	11.2	αρακάς (μαγειρεμένος)	13.9
φρέσκες φράουλες	10.6	τομάτες (μαγειρεμένες)/σάλτσα τομάτας	13.7
ροδάκινα (κονσέρβα)	8.9	πολτοποιημένες πατάτες	12.4
19-24 μηνών		19-24 μηνών	
φρέσκια μπανάνα	29.6	τηγανιτές πατάτες	25.5
φρέσκα μήλα	15	πράσινο φασολάκι (μαγειρεμένο)	16.8

φρέσκα σταφύλια	11.2	καλαμπόκι (μαγειρεμένο)	15.2
σταφίδες	9	αρακάς (μαγειρεμένος)	11.4
φρέσκες φράουλες	7.6	τομάτες (μαγειρεμένες)/σάλτσα τομάτας	9.4

Πίνακας 2.6. Τα 5 πιο δημοφιλή προϊόντα (φρούτα και λαχανικά) που καταναλώνονται σε μεγαλύτερη ποσότητα ανά ηλικιακή ομάδα

Οι Briefel και άλλοι μελέτησαν το 2004¹⁴ την εφαρμοσιμότητα των διατροφικών προτύπων που θεσπίστηκαν από τους αρμόδιους φορείς για τα βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας στις Η.Π.Α. Το δείγμα αφορούσε 3.022 βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας ηλικιών (4-24 μηνών), 2.024 από τα οποία ήταν βρέφη ηλικίας 4 – 11 μηνών. Η εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης πραγματοποιήθηκε με τηλεφωνικές συνεντεύξεις και ανακλήσεις 24h. Οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν ο θηλασμός, η περίοδος εισαγωγή στερεάς τροφής στην δίαιτά του και η τήρηση των διατροφικών προτύπων που συστήνονται από τους αρμόδιους φορείς. Τα προϊόντα που βρέθηκε να καταναλώνονται σε μεγαλύτερο ποσοστό από τον υπό μελέτη πληθυσμό παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

Γάλα και προϊόντα γάλακτος	Έτοιμες παιδικές τροφές	Χυμοί και άλλα ποτά	Λαχανικά	Κρέας και άλλα προϊόντα με βάση αυτά	Δημητριακά και άλλα προϊόντα με βάση αυτά	Επιδόρπια
Μητρικό γάλα	Συμβατικές παιδικές τροφές σε συσκευασία βάζου	100% φυσικός χυμός φρούτων ή λαχανικών	φρούτα	κρέας	παιδικές τροφές με βάση τα δημητριακά (σε βάζο)	έτοιμα γεύματα σε βάζο
Φόρμουλα γάλακτος	Βιολογικές έτοιμες παιδικές τροφές	ποτά με ζάχαρη	λαχανικά		έτοιμα για κατανάλωση δημητριακά	έτοιμα επιδόρπια σε βάζο
Φόρμουλα γάλακτος εμπλουτισμένη με σίδηρο		νερό			Ζεστά δημητριακά	
Lipil ή similac φόρμουλες					παιδικά σνακ	
Πλήρες αγελαδινό γάλα					κρακεράκια, πρέτσελ και ρυζογκοφρέτες	
Άπαχο αγελαδινό γάλα						
Τυρί, γιαούρτι						

Πίνακας 2.7. Προϊόντα που παρουσιάζουν την μεγαλύτερη κατανάλωση από το υπό μελέτη δείγμα βρεφών και μικρών παιδιών

Το 76% των βρεφών και παιδιών μικρής ηλικίας βρέθηκε να διατρέφονται αποκλειστικά -ή εν μέρει- με μητρικό γάλα κατά την γέννα. Το ποσοστό αυτό μειώνεται στο 30% κατά τους επόμενους έξι μήνες και στο 16% τους επόμενους δώδεκα μήνες. Συμπερασματικά, η μέση χρονική περίοδος θηλασμού εκτιμάται ότι είναι έξι μήνες, ενώ η εισαγωγή στερεάς τροφής στη διαίτα πραγματοποιείται μεταξύ του 4^{ου}-6^{ου} μήνα για τα 2/3 του πληθυσμού των βρεφών. Οι χρονικές αυτές περιόδους συμπίπτουν με τις συστηνόμενες από την Αμερικάνικη Ακαδημία Παιδιατρικής (AAP). Επιπλέον, το 17% των βρεφών καταναλώνει χυμό πριν την προτεινόμενη από την AAP, ενώ ένα μεγάλο ποσοστό καταναλώνει αγελαδινό γάλα σε καθημερινή βάση (πριν από τον 12 μήνα = προτεινόμενη από την AAP περίοδος) και 1 στα 10 τηγανιτές πατάτες και/ή σακχαρώδη ποτά σε σχεδόν καθημερινή βάση.

3. Ασφάλεια τροφίμων

Σύμφωνα με τα στοιχεία που παρατέθηκαν, οι διατροφικές συνήθειες βρεφών και παιδιών είναι σε άμεση συνάρτηση με τις επικρατούσες σε κάθε χώρα και περιοχή κοινωνικοοικονομικές συνθήκες. Ο παράγοντας αυτός είναι δυναμικός και δεν υπόκειται αποκλειστικά στις επισημάνσεις και τα πορίσματα της επιστημονικής κοινότητας σχετικά με την καταλληλότητα των τροφίμων για την εκάστοτε διατροφή. Αντίθετα, ένας παράγοντας που σχετίζεται με τα τρόφιμα και δεν εξαρτάται από την κουλτούρα και τις διατροφικές συνήθειες είναι η ασφάλεια των τροφίμων. Οι ραγδαίες εξελίξεις στην επιστήμη και τεχνολογία των τροφίμων επιφέρουν συνεχείς αλλαγές στη σχετική νομοθεσία, οι οποίες σε συνδυασμό με τις κοινωνικό-οικονομικές και δημογραφικές μεταβολές είχαν ως αποτέλεσμα σημαντικές μεταβολές στον τρόπο που επιλέγουμε σήμερα τα τρόφιμα. Η εντατικοποίηση της γεωργίας, με την αυξημένη χρήση των φυτοπροστατευτικών, η πλήρης εκβιομηχάνιση της παραγωγικής διαδικασίας των τροφίμων και η χρήση πρόσθετων για τη βελτίωση των οργανοληπτικών τους χαρακτηριστικών (π.χ. γεύση, εμφάνιση και χρόνος ζωής) αποτελούν πηγές ανησυχίας για πολλούς καταναλωτές. Η παγκοσμιοποίηση αποτελεί ακόμα μία κινητήρια δύναμη για αλλαγή, αφού η ποικιλία των διατιθέμενων προϊόντων είναι μεγαλύτερη από κάθε άλλη φορά. Πλέον τα τρόφιμα μπορούν να προέρχονται από οποιαδήποτε περιοχή, ανεξάρτητα από τη νοοτροπία και νομοθεσία σε θέματα ποιότητας και ασφάλειας των τροφίμων¹⁶.

Τα νέα επιτεύγματα στην τεχνολογία και εμπορία των τροφίμων υιοθετήθηκαν από τους καταναλωτές, διαμορφώνοντας μια νέα αντίληψη σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων που καταναλώνουν. Σύμφωνα με σχετική έρευνα που διεξήγαγε η EFSA, η πλειοψηφία των πολιτών συνδυάζει την κατανάλωση τροφίμων με την ευχαρίστηση που τους προσφέρει είτε η επιλογή φρέσκων και εύγευστων τροφίμων (58%) ή η απόλαυση ενός φιλικού ή οικογενειακού γεύματος (54%). Βέβαια, η ασφάλεια των τροφίμων δεν σχετίζεται άμεσα με τα παραπάνω¹⁶ και απασχολεί μόνο περιορισμένο αριθμό πολιτών (11%), αφού το ενδιαφέρον τους εστιάζεται σε άλλους τομείς όπως η οικονομική κρίση (20%) και η περιβαλλοντική μόλυνση (18%). Θα πρέπει βέβαια να επισημανθεί ότι τα ποσοστά της ανησυχίας των πολιτών για τις επιπτώσεις των τροφίμων στην υγεία τους έχουν ανέβει κατά 3 μονάδες σε σχέση με το 2005¹⁶. Από την πλευρά των προσωπικών ενεργειών για την αποφυγή των κινδύνων που σχετίζονται με τα τρόφιμα, ένα μεγάλο ποσοστό έχει την πεποίθηση ότι

είναι σε θέση να πάρει μέτρα που σχετίζονται με την κακή διατροφή (π.χ. αποφυγή κατανάλωσης λιπαρών τροφίμων και καρδιακά προβλήματα) και μικροβιολογικές μολύνσεις (π.χ. σαλμονέλα σε αυγά). Αντίθετα, πιστεύουν ότι είναι εκτεθειμένοι σε κινδύνους από χημικά (<40%) και την εφαρμογή νέων τεχνολογιών στην παραγωγή τροφίμων (<30%)¹⁶.

Η επιλογή των τροφίμων είναι μια έννοια καθαρά υποκειμενική που συναρτάται από τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά του ατόμου, τα κοινωνικό-οικονομικά του κριτήρια κ.λ.π. Η Ε.Ε. έχει προσδιορίσει τις διαστάσεις που αποδίδει στην ποιότητα των τροφίμων, τις οποίες έχει κατηγοριοποιήσει ανάλογα με:

1. Τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά
2. Τη θρεπτική τους αξία
3. Την ασφάλεια των τροφίμων
4. Τη χωρική και τεχνολογική τους διαφοροποίηση
5. Το φιλοπεριβαλλοντικό τρόπο παραγωγής τους

Η ασφάλεια των τροφίμων είναι ίσως ο μόνος από τους παραπάνω παράγοντες της ποιότητας των τροφίμων που νοείται ως υποχρεωτική, καθώς τρόφιμα τα οποία είναι μη ασφαλή δεν θα πρέπει να διατίθενται στην αγορά¹⁷. Ένα τρόφιμο θεωρείται μη ασφαλές όταν εκτιμάται ότι είναι επιβλαβές για την υγεία. Προκειμένου να προσδιοριστεί εάν ένα τρόφιμο είναι ασφαλές για την υγεία θα πρέπει να εξετάζονται οι:

1. άμεσες, βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες συνέπειες του τροφίμου αυτού στην υγεία του ατόμου που το καταναλώνει, αλλά και στις επερχόμενες γενεές.
2. σωρευτικές τοξικές συνέπειες
3. ιδιαίτερες ευαισθησίες όσον αφορά την υγεία συγκεκριμένης κατηγορίας καταναλωτών, όταν το τρόφιμο προορίζεται για την εν λόγω κατηγορία καταναλωτών.

Σύμφωνα με τα πρότυπα HACCP & ISO 22000 οι κίνδυνοι στα τρόφιμα μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε ¹⁸:

1. Βιολογικούς,
2. Φυσικούς, και
3. Χημικούς

Οι βιολογικοί κίνδυνοι αφορούν την παρουσία στα τρόφιμα μικροοργανισμών που προκαλούν αλλοίωση. Από αυτούς, οι σημαντικότεροι από πλευράς ασφάλειας

είναι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι οποίοι διαχωρίζονται σε βακτήρια, μύκητες, ιούς και παράσιτα. Τα βακτήρια διακρίνονται στους παρακάτω δυο τύπους:

1. Τοξικοί: απελευθερώνουν τοξίνες, οι οποίες σε ελάχιστες ποσότητες προκαλούν βλάβες στον άνθρωπο, ακόμα και χωρίς τη λήψη του ίδιου βακτηρίου.

2. Μολυσματικοί: είναι απαραίτητη η λήψη τους για να προκληθεί δηλητηρίαση.

Η παραπάνω διάκριση, όπως και η ύπαρξη σπορίων σε κάποια βακτήρια, είναι σημαντική διότι τα σπόρια και κάποιες από τις τοξίνες είναι ανθεκτικά σε ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος (π.χ. θερμοκρασία)

Οι ιοί, όπως της ηπατίτιδας Α, Ε, ιοί τύπου *Norwalk*, *rotavirus* κ.α. δεν πολλαπλασιάζονται στα τρόφιμα, τα οποία απλώς αποτελούν παράγοντα της μεταφοράς τους. Μερικοί από αυτούς καταστρέφονται κατά το μαγείρεμα ή τη ξήρανση, ενώ άλλοι μπορούν να προκαλέσουν σοβαρά διατροφικές πανδημίες (π.χ. γρίπη των χοίρων ή των πτηνών, ιός ηπατίτιδας Α σε λιαστές τομάτες Τουρκίας).

Τα παράσιτα αποτελούν ξενιστές των ζώων από όπου μολύνεται και ο άνθρωπος μέσω της τροφικής οδού. Οι υγιεινές συνθήκες εκτροφής των ζώων, ο κτηνιατρικός έλεγχος κατά την σφαγή, το μαγείρεμα, η κατάψυξη, η ξήρανση και το αλάτισμα, αποτρέπουν την ανάπτυξη τους. Τα παράσιτα που ενδιαφέρουν την ασφάλεια τροφίμων είναι τα πρωτόζωα (*Toxoplasma gondii*, *Giardia lamblia*, *Cryptosporidium parvum* κ.α.) και οι σκώληκες (*Trichinella spiralis*, *Trichuris trichura*, *Ascaris lumbricoides*, *Taenia saginata*, *Enterobius vermicularis* κ.α.).

Οι μύκητες που αναπτύσσονται εξαιτίας των κακών συνθηκών (υψηλή υγρασία, θερμοκρασία) καλλιέργειας, συγκομιδής, αποθήκευσης και διακίνησης των τροφίμων σχηματίζουν σπόρια τα οποία αντέχουν σε ακραίες περιβαλλοντολογικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία). Από τους εκατοντάδες μύκητες που απαντώνται στο ζωικό ή φυτικό βασίλειο, μόνο μερικοί παράγουν ουσίες με ισχυρή τοξική δράση για τον άνθρωπο ακόμα και σε ελάχιστη ποσότητα. Οι ουσίες αυτές ονομάζονται μυκοτοξίνες και επειδή προέρχονται από βιολογικούς παράγοντες εξετάζονται σε αυτή την κατηγορία κινδύνων. Από αναλυτικής πλευράς, οι κίνδυνοι αυτοί μπορούν να χαρακτηριστούν ως χημικοί, αφού οι τοξίνες είναι ουσίες στις οποίες ο ανθρώπινος οργανισμός είναι ευπαθής. Οι τοξίνες και οι μεταβολίτες τους προσδιορίζονται στα τρόφιμα και γι' αυτές έχει θεσπιστεί κατάλληλη νομοθεσία.

Οι φυσικοί κίνδυνοι περιλαμβάνουν οποιοδήποτε ξένο προς την φύση του προϊόντος υλικό που είναι δυνατόν να εισέλθει κατά την επεξεργασία του και δύναται

να προκαλέσει σωματική βλάβη στον καταναλωτή. Μερικοί από τους πλέον συνηθισμένους φυσικούς κινδύνους είναι το γυαλί, τα μέταλλα, η σκουριά, τα πλαστικά, τα σχοινιά, τα ξύλα, οι πέτρες, τα κόκκαλα, τα χόματα, τα ζώφια (πχ έντομα, τρωκτικά) κ.λ.π.

Τέλος, οι χημικοί κίνδυνοι αποτελούν την κατηγορία που μελετά η διατριβή αναφέρονται στις χημικές ουσίες που μπορούν να βρεθούν στα τρόφιμα, είτε από την φύση τους ή λόγω της επεξεργασίας που υφίστανται και ενδέχεται να είναι επιβλαβείς εάν υπερβούν ένα ορισμένο ποσοτικό όριο. Η διασφάλιση του ορίου αυτού θεσπίζεται μέσω νομοθετικών πράξεων με τον ορισμό ανώτατων επιτρεπτών ορίων για κάθε μία από αυτές. Οι σημαντικότερες κατηγορίες κινδύνων της κατηγορίας αυτής αναφέρονται στην παρουσία φυτοπροστατευτικών προϊόντων, κτηνιατρικών φαρμάκων, τοξικών ουσιών που απελευθερώνονται στο περιβάλλον κατά τις ανθρώπινες δραστηριότητες (PCBs, διοξίνες κ.α.), μετάλλων, χημικών επεξεργασίας (π.χ. καθαριστικά, λιπαντικά, απολυμαντικά, χημικά επεξεργασίας νερού), υλικών συσκευασίας, πρόσθετων, φυσικές τοξινών κλπ.

4. Ποιές είναι οι ξενοβιοτικές ουσίες?

Όπως αναλύθηκε προηγουμένως οι χημικοί κίνδυνοι αποτελούν έναν από τους σοβαρότερους παράγοντες κινδύνου που οφείλεται σε τοξικές ουσίες των οποίων η παρουσία δεν δικαιολογείται η παρουσία στα τρόφιμα. Ένας περισσότερο διευρυμένος όρος για τον χαρακτηρισμό των ουσιών αυτών είναι ως ξενοβιοτικές, από τις λέξεις ξένος και βίος (ζωή). Ως ξενοβιοτική χαρακτηρίζεται μια χημική ουσία που βρίσκεται σε έναν οργανισμό αλλά δεν παράγεται από αυτόν υπό φυσιολογικές συνθήκες ούτε αναμένεται η παρουσία της. Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται και οι ουσίες που υπάρχουν στον οργανισμό σε πολύ υψηλότερα επίπεδα από το φυσιολογικό. Για παράδειγμα, τα αντιβιοτικά χαρακτηρίζονται ως ξενοβιοτικές ουσίες για το ανθρώπινο σώμα αφού δεν παράγονται από τον οργανισμό ούτε αποτελούν μέρος της φυσιολογικής του διατροφής. Ουσίες φυσικής προέλευσης μπορούν επίσης να θεωρηθούν ως ξενοβιοτικές εάν λαμβάνονται από άλλο οργανισμό, όπως η πρόσληψη ορμονών από ψάρια ή οι χημικές ουσίες οι οποίες παράγονται από κάποιους οργανισμούς ως μέσο άμυνας. Τέλος, ο όρος ξενοβιοτικές ουσίες χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό ρυπαντών όπως οι διοξίνες και τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια. Μερικές από τις κυριότερες κατηγορίες των

ξενοβιοτικών ουσιών αναφέρθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο (ασφάλεια τροφίμων-χημικοί κίνδυνοι). Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν συγκεκριμένες κατηγορίες ξενοβιοτικών ουσιών η ανίχνευση των οποίων αποτέλεσε αντικείμενο της διατριβής.

4.1. Μυκοτοξίνες

Ο όρος «μυκοτοξίνες» προτάθηκε για πρώτη φορά το 1962 όταν ξέσπασε στο Λονδίνο μια ασυνήθιστη κτηνιατρική κρίση με αποτέλεσμα να αποβιώσουν 100.000 γαλοπούλες. Οι μαζικοί αυτοί θάνατοι αποδόθηκαν σε διατροφή που περιείχε φιστίκια μολυσμένα με δευτερογενείς μεταβολίτες του *Aspergillus flavus* (αφλατοξίνες)¹⁹.

Ως μυκοτοξίνες ορίζονται οι φυσικοί δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται από μύκητες οι οποίοι προσβάλλουν τα αγροτικά προϊόντα στον αγρό ή υπό ποίκιλες συνθήκες υγρασίας και ξήρανσης κατά την αποθήκευση. Έως σήμερα έχουν καταγραφεί μερικές εκατοντάδες διαφορετικές μυκοτοξίνες, με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες και διαφορετική δομή. Οι πλέον συνηθισμένες μυκοτοξίνες - λόγω της εκτεταμένης παρουσίας τους σε τροφές και της σοβαρότητας των επιπτώσεών τους στην υγεία των ζώντων οργανισμών είναι οι:^{20,21} αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες (παράγονται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus sp.*), φουμονισίνες, τριχοθεσίνες, η ζεαραλενόνη (παράγεται κυρίως από τους μύκητες *Fusarium sp.*), η πατουλίνη (παράγεται από τους μύκητες *Penicillium sp.*) και οι εργοτοξίνες (παράγονται από τα σκληρώτια των μυκήτων *Claviceps sp.*). Αυτές χαρακτηρίζονται από μια υψηλή -με ευρύ πεδίο- τοξική δράση στους οργανισμούς, όπως η κυτταρό-, νεφρό-, νεύρο-τοξική, η καρκινογένεση, οι μεταλλάξεις, η καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος και οι οιστρογονικές διαταραχές. Παρότι η τοξικότητα στις ουσίες αυτές είναι άμεση, ποικίλλοντας ανάλογα με την ποσότητα τροφής και το είδος της τοξίνης που προσλαμβάνονται, δεν θα πρέπει να υποτιμάται ο κίνδυνος μεταφοράς τους σε τρόφιμα όπως το γάλα, τα κρέας ή τα αυγά. Δομικά, οι μυκοτοξίνες μπορεί να είναι είτε απλά μόρια όπως οι μονιλιφορμίνες ή περισσότερο πολύπλοκα μόρια όπως οι φομοψίνες (τοξίνες από μύκητες του είδους *phomopsis leptostromiformis*) και οι τρεμοργενίνες (τοξίνες από μύκητες του είδους *Penicillium*)²².

Παρά την συστηματική παρουσία των μυκοτοξινών στα τρόφιμα, μόνο ένα μέρος τους αποτελεί ουσιαστικό κίνδυνο για τους έμβιους οργανισμούς^{11,23,24}. Οι

επιπτώσεις τους ποικίλουν με χαρακτηριστικότερες την καρκινογένεση²³ (αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες, φουμονισίνες), τις μεταλλαξιογόνες (αφλατοξίνες, στεριγματοκυστίνες) και τερατογόνες ιδιότητες (ωχρατοξίνες), τις οιστρογονικές αναταράξεις (ζεαραλενόνη), την αιμορραγία (τριχοθεσίνες), την προσβολή του ανοσοποιητικού συστήματος (αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες), των νεφρών (ωχρατοξίνες), του ήπατος (αφλατοξίνες, φομοψίνες), του δέρματος (τριχοθεσίνες) και του νευρικού συστήματος (εργοτοξίνες). Επίσης, είναι δυνατόν να αναστείλουν τον σχηματισμό όγκων ή την ανάπτυξη μικροβίων. Στον άνθρωπο η πρόσληψη των μυκοτοξινών πραγματοποιείται μέσω της κατανάλωσης φυτικών προϊόντων που περιέχουν αυτές ή από υπολείμματα-μεταβολίτες τους που περιέχονται σε ζωικά προϊόντα (π.χ. αφλατοξίνη Μ στο γάλα). Οι ασθένειες που προκαλούνται από την πρόσληψη μυκοτοξινών ονομάζονται μυκοτοξικότητες. Η επίδραση των μυκοτοξινών στην υγεία εξαρτάται από την ποσότητα της ουσίας που καταναλώνεται (οξεία ή χρόνια τοξικότητα), το σωματικό βάρος, την παρουσία άλλης τοξίνης (συνεργιστική δράση) και λοιπές διατροφικές συνήθειες²⁵. Ο Hsieh υποστηρίζει ότι είναι απαραίτητη η ικανοποίηση όλων των παρακάτω κριτηρίων για να είναι εφικτή η σύνδεση μιας ασθένειας με μια συγκεκριμένη μυκοτοξίνη²⁶

1. Παρουσία της μυκοτοξίνης στα τρόφιμα που καταναλώθηκαν
2. Έκθεση του ανθρώπου στην μυκοτοξίνη
3. Συσχέτιση μεταξύ έκθεσης και συμπτώματος
4. Ενδοδιεργαστηριακή επαναληψιμότητα των συμπτωμάτων σε εργαστηριακές συνθήκες

5. Παρόμοιος τρόπος δράσης σε ανθρώπους και πειραματόζωα

Μερικές από τις πλέον διαδεδομένες μυκοτοξίνες είναι οι:

1. Μυκοτοξίνες από μύκητες του γένους *Aspergillus* (αφλατοξίνες Β, G, Μ, ωχρατοξίνη Α, στεριγματοκυστήνη and κυκλοπιαζονικό οξύ)
2. Μυκοτοξίνες από μύκητες του γένους *Penicillium* (πατουλίνη, ωχρατοξίνη Α, κιτρινίνη, πενιτρεμίνη Α, κυκλοπιαζονικό οξύ)
3. Μυκοτοξίνες από μύκητες του γένους *Fusarium* (δεοξινιβαλενόνη-DON, νιβαλενόνη, ζεαραλενόνη, T-2 τοξίνη, μονιλιφορμίνη)
4. Μυκοτοξίνες από μύκητες του γένους *Alternaria* (τενουαζονικό οξύ, αλτερναριόλη και ο μεθύλαιθέρας της)
5. Μυκοτοξίνες από μύκητες του γένους *Claviceps* (εργοτοξίνες)
6. Μυκοτοξίνες από μύκητες του είδους *Phomopsis leptostromiformis*

7. Μυκοτοξίνες από μύκητες του είδους *Diplodia maydis*

Η πλέον διαδεδομένη κατηγορία μυκοτοξινών είναι οι αφλατοξίνες που αντιπροσωπεύουν μια από τις γνωστότερες χημικές ομάδες με καρκινογόνες ιδιότητες. Το IARC (International Agency for Research on Cancer) τις έχει κατατάξει στην κατηγορία Α ως προς την καρκινογενετική τους ικανότητα. Οι ουσίες αυτές παράγονται από τα είδη των μυκήτων *Aspergillus Flavus* και *Aspergillus parasiticus* σε διάφορα προϊόντα (δημητριακά, σύκα, ελαιόσποροι, ξηρούς καρπούς, καπνός και άλλα)²⁷. Η αφλατοξίνη Β1 είναι η κύρια πηγή καρκίνου του ήπατος σε ζώα αν και η δράση της ποικίλει ανάλογα με το είδος, φύλλο, ηλικία και διατροφικές συνήθειες του ζώου. Ιδιαίτερα ευπαθείς σε αυτές είναι οι πέστροφες, πάπιες, χοίροι και σε μικρότερο ποσοστό τα μηρυκαστικά. Σε παγκόσμια κλίμακα η παρουσία αφλατοξινών έχει ανιχνευτεί σε μια μεγάλη κατηγορία προϊόντων όπως το καλαμπόκι και τα προϊόντα του, ο βαμβακόσπορος, το ρύζι, τα φιστίκια, τα βραζιλιάνα καρύδια, οι ξηροί καρποί, οι σπόροι κολοκύθας, οι ηλιόσποροι, τα σύκα, τα πεκάν, τα αμύγδαλα. Από τα παραπάνω οι περισσότερες αναφορές για υψηλές συγκεντρώσεις έχουν γίνει σε αραχίδες, καλαμπόκι, ξηρούς καρπούς και σπόρους (π.χ. βαμβακόσπορος), οι οποίες έχουν προκαλέσει ανησυχίες τόσο στις χώρες που εισάγουν τέτοια προϊόντα όσο και στις χώρες που τα εξάγουν. Κατά την περίοδο 1978-1983 στις Η.Π.Α. σημαντικός αριθμός δειγμάτων που ελέγχθηκαν για μυκοτοξίνες βρέθηκαν θετικά στην παρουσία αφλατοξινών σε επίπεδα 5-20 μg/kg. Για τα υπόλοιπα δημητριακά και τα προϊόντα τους τα επίπεδα κυμαίνονταν κάτω των 20 μg/kg²⁴. Η ρύπανση των προϊόντων καλαμποκιού από αφλατοξίνη κυμαίνεται ανάλογα με τη χρονιά και την περιοχή. Η καλλιέργεια του καλαμποκιού στις κέντρο-δυτικές επαρχίες των Η.Π.Α. είναι περισσότερο επιρρεπείς στην προσβολή από κατηγορίες μυκήτων που παράγουν αφλατοξίνες, σε σύγκριση με τις αντίστοιχες νοτιο-ανατολικές επαρχίες. Το έτος 1983 καταγράφηκαν υψηλά επίπεδα αφλατοξινών στις επαρχίες αυτές, ενώ το 1988 η ρύπανση επιδεινώθηκε λόγω μειωμένης υγρασίας²³. Το περιστατικό είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας νέας μορφής επαγρύπνησης για τον πιθανό κίνδυνο των αφλατοξινών για την ανθρώπινη υγεία μέσω της παρουσίας τους στην τροφική αλυσίδα²⁸. Η αραχίδα και τα προϊόντα αυτής είναι μια άλλη ευπαθής κατηγορία που υπόκειται προσβολή από μύκητες *A. flavus* και συνεπώς από ρύπανση με αφλατοξίνες²⁹.

Από τα αποτελέσματα της εφαρμογής των προγραμμάτων παρακολούθησης των επιπέδων των τοξινών προκύπτει ότι στο 90% των δειγμάτων τα επίπεδα των

αφλατοξινών είναι κάτω από 20 µg/kg. Αν και το ποσοστό αυτό δηλώνει ότι τα αντίστοιχα προγράμματα πρόληψης είναι αποτελεσματικά, εντούτοις οι τοξίνες αυτές ρυπαίνουν τα τρόφιμα και σε χαμηλότερα επίπεδα,²⁴ όπως η αφλατοξίνη M1 που συνήθως απαντάται στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα³⁰. Η παρουσία της συνδέεται με την κατανάλωση από τα ζώα γαλακτοπαραγωγής ζωοτροφών που περιέχουν αφλατοξίνες. Για τον λόγο αυτό είναι αναγκαία η θέσπιση-τήρηση αυστηρών προγραμμάτων ελέγχου των επιπέδων της αφλατοξίνης B1 στις ζωοτροφές. Πολλές χώρες μέσω της εθνικής τους νομοθεσίας έχουν θεσπίσει ανώτατα όρια παρουσίας της αφλατοξίνης B1 στις ζωοτροφές που προορίζονται για την κατανάλωση ζώων γαλακτοπαραγωγής. Για παράδειγμα, στις Η.Π.Α ενώ τα ανώτατα όρια των επιπέδων των αφλατοξινών στις ζωοτροφές είναι 100 µg/kg, σε αυτές που προορίζονται για την εκτροφή των ζώων γαλακτοπαραγωγής το όριο αναπροσαρμόζεται σε 20 µg/kg³⁰.

Η ωχρατοξίνη A είναι η πιο διαδεδομένη από τις ωχρατοξίνες και παράγεται από μια μεγάλη ομάδα μυκήτων των ειδών *Aspergillus* και *Penicillium*. Το IARC (International Agency for Research on Cancer) έχει ταξινομήσει την ουσία αυτή στην κατηγορία 2B ως προς την καρκινογενετική της ικανότητα. Προκαλεί νεφροπάθειες, και σε ορισμένα είδη ζώων καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, το οποίο συμβάλει και στην μείωση της παραγωγικότητας των ζώων. Η τοξίνη αυτή απαντάται και στα γαλακτοκομικά προϊόντα και συνδέεται με τη θανατηφόρο ενδημική νεφροπάθεια Balkan³¹. Επειδή παγκοσμίως, πολλοί μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* προσβάλλουν τα αποθηκευμένα προϊόντα³², η παρουσία της ωχρατοξίνης A είναι συνήθης σε δημητριακά (σιτάρι, κριθάρι, βρώμη, ρύζι) και ζωοτροφές κατά την διάρκεια της αποθήκευσης τους, σε επίπεδα που ορισμένες φορές αγγίζουν τα 1000 µg/kg²⁴. Η παρουσία της έχει αναφερθεί και σε άλλα προϊόντα όπως τα φασόλια, ο καφές, οι ξηροί καρποί και οι ελιές. Στα ζωικά προϊόντα απαντάται στο ροκφόρ, τα αλιεύματα, στο χοιρινό κρέας, τη σκόνη γάλακτος και το ψωμί, ενώ η προέλευσή της στα ζωικά προϊόντα δεν οφείλεται αποκλειστικά στις συνθήκες αποθήκευσης. Η ωχρατοξίνη A έχει αποδειχθεί ότι συνδέεται στενά στον ορρό του αίματος με συνέπεια να έχει ένα μεγάλο χρόνο ημιζωής εντός των ζωικών οργανισμών, ενώ αποτελεί μια από τις μυκοτοξίνες που εμφανίζει υπολείμματα στο ζωικό ιστό και τα βιολογικά υγρά³³. Έτσι, μπορεί να μεταφερθεί στην τροφική αλυσίδα εάν η διατροφή περιλαμβάνει τέτοια προϊόντα με

αποτέλεσμα η παρουσία υπολειμμάτων της να έχει αναφερθεί στους νεφρούς, τον ορρό του αίματος και τα λουκάνικα από χοιρινό³⁴.

Οι τριχοθεσίνες αποτελούν μια μεγάλη ομάδα μυκοτοξινών που παράγονται από διάφορα είδη μυκήτων του γένους *Fusarium*³⁵ και είναι πιθανοί αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης²⁰. Επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει ότι οι κυρίαρχοι τύποι Α και Β των τριχοθεσινών βρίσκονται στα δημητριακά ως φυσικοί ρυπαντές, ενώ οι μακροκυκλικοί τύποι τους εμφανίζονται σπανίως στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Οι πλέον διαδεδομένες μυκοτοξίνες της ομάδας αυτής είναι η δεοξυνιβαλενόνη (DON), η νιβαλενόνη, η 3- (ή 15-)ακετυλοδεοξυνιβαλενόνη (AcDON), η φουζαρενόνη X, η T-2 τοξίνη, η HT-2 τοξίνη και η διακετοξυσκιπενόλη (DAS). Μερικές από τις ουσίες αυτές απαντώνται ταυτόχρονα³⁶ στα τρόφιμα με αποτέλεσμα να προκαλούν συνεργιστικές δράσεις³⁷. Η παρουσία της DON κυριαρχεί παγκοσμίως στα σιτηρά και παρότι απαντάται σε πολλά προϊόντα τα οποία χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων και ζωοτροφών αποτελεί μια τις λιγότερο τοξικές τριχοθεσίνες, η οποία όμως θα πρέπει να αντιμετωπίζεται με σοβαρότητα αφού απαντάται σε μεγάλη συχνότητα στα σιτηρά³⁸.

Η τοξικότητα μεταξύ των διαφόρων τριχοθεσινών ποικίλει όμως είναι σχεδόν πάντα υψηλή και οξεία. Οι επιπτώσεις τους στην υγεία επικεντρώνονται σε αιματολογικές ανωμαλίες, στην καταστολή του ανοσοποιητικού συστήματος, σε ερεθισμούς στο δέρμα, σε διάρροια και εσωτερική αιμορραγία. Μια εκτεταμένη τοξικολογική εκτίμηση των τριχοθεσινών σε ζωοτροφές έγινε από τους Eriksen and Eriksen (2004)³⁹ δείχνοντας ότι είναι τοξικές σε όλα τα είδη με τον βαθμό της τοξικότητάς τους να μεταβάλλεται ανάλογα με το είδος του ζώου και την τοξίνη. Αν και τα πουλερικά είναι περισσότερο ευαίσθητα στις τοξίνες αυτές σε σύγκριση με τα μηρυκαστικά, οι χοίροι αποδείχτηκαν οι πλέον ευαίσθητοι με συμπτώματα όπως η μειωμένη λήψη τροφής-απώλεια βάρους και η δυσλειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος.

Η ζεαραλενόνη παράγεται επίσης από μύκητες του γένους *Fusarium* και έχει ισχυρή οιστρογονική δράση, η οποία οδηγεί σε μείωση της γονιμότητας, στειρότητα για τα θηλυκά και μείωση της ποιότητας του σπέρματος για τα αρσενικά ζώα. Λόγω της δομικής τους ομοιότητας με την οιστραδιόλη μπορεί να δεσμευτεί από τους υποδοχείς των οιστρογόνων στα κύτταρα των θηλαστικών με αποτέλεσμα να χαρακτηρίζεται ως μη στεροειδές οιστρογόνο (ή μυκοοιστρογόνο, φυτοοιστρογόνο).

Αν και η βιολογική δραστηριότητα της ζεαραλενόλης είναι υψηλή, η τοξική της δράση είναι χαμηλή⁴⁰.

Ο εργοτίαση είναι από τις παλιότερες μυκοτοξικώσεις, αφού κρούσματα σε ανθρώπους που σχετίζονται με μόλυνση του ρυζάλευρου από τον μύκητα *Claviceps purpurea* έχουν παρατηρηθεί κατά τον μεσαίωνα στην Κεντρική και Νότια Ευρώπη. Τη σύγχρονη εποχή η ασθένεια αυτή δεν αποτελεί πλέον σοβαρό κίνδυνο για τον άνθρωπο αν και παρουσιάζονται ακόμα μεμονωμένα περιστατικά, όπως η εμφάνιση 150 κρουσμάτων στην Αιθιοπία⁴¹. Η έξαρση της ασθένειας εκτιμάται ότι οφειλόταν στην παρατεταμένη υγρή περίοδο και την ανάπτυξη ζιζανίων αγριάδας (*Avena abyssinica*) στις καλλιέργειες κριθαριού. Ο εργοτισμός εκδηλώνεται με δυο τρόπους που αναφέρονται σε: (α) εμετούς, κεφαλαλγίες, ρινορραγίες, γαγγραινώδεις εξελκώσεις και γενικότερα συμπτώματα παρόμοια με εκείνα της λέπρας (*ergotismus gangraenosus*), και (β) σπασμούς, επιληπτικές κρίσεις, παραισθήσεις (*ergotismus convulsivus*). Στη γαγγραινώδη μορφή της ασθένειας είχαν δοθεί διάφορες λαϊκές ονομασίες, από τις οποίες η γνωστότερη είναι το "φωτιά του Αγίου Αντωνίου". Η ονομασία αυτή οφείλεται στο αίσθημα του καψίματος στα άκρα, που νιώθουν οι ασθενείς και το γεγονός ότι κατά το μεσαίωνα οι μοναχοί του Τάγματος του Αγίου Αντωνίου είχαν "ειδικευθεί" κατά κάποιο τρόπο στη νοσηλεία των ασθενών, χρησιμοποιώντας κατάλληλα καταπραϋντικά και εκχυλίσματα βοτάνων που διεγείρουν την κυκλοφορία του αίματος. Κατά τον 17^ο αιώνα διαπιστώθηκε ότι η αιτία της δηλητηρίασης ήταν τα δημητριακά που είχαν προσβληθεί από ερυσιβώδη όλυρα με αποτέλεσμα να αρχίσει η καταπολέμηση-εξάλειψή της. Παρότι η τελευταία μεγάλη επιδημία εργοτισμού σημειώθηκε στη Νότια Ρωσία το διάστημα 1926-7, περιστατικά ομαδικών δηλητηριάσεων από εργοτισμό σημειώνονται ακόμα και σήμερα στις πολύ φτωχές χώρες. Τα σκληρώτια του μύκητα *Claviceps sclerotia* περιέχουν ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών τοξικών χημικών ουσιών (100 περίπου ενώσεις)⁴² με χαρακτηριστικότερη το λυσεργικό οξύ, τα παράγωγα του οποίου διακρίνονται σε απλά αμίδια (π.χ. εργομπτρίνη) και πεπτιδικά παράγωγα όπως η εργοτιξίνη, εργοταμίνη ή αλκαλοειδή της οικογένειας της εργολίνης.

Οι πλέον πρόσφατα μελετηθείσες μυκοτοξίνες που σχετίζονται με θέματα υγείας του ανθρώπου και των ζώων είναι οι φουμονισίνες. Αναφέρθηκαν για πρώτη φορά στην Αφρική το 1988⁴³ και παράγονται από μύκητες του γένους *Fusarium*, ειδικότερα από τα είδη *Fusarium verticilliodides*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium nygamai* και *Alternaria sp.* Οι τοξίνες αυτές ευθύνονται για προβλήματα στο ήπαρ⁴⁴,

νεφρούς^{45,46} και το ανοσοποιητικό σύστημα⁴⁵. Η πλέον συνήθης από αυτές είναι η φουμονισίνη B1.

4.2. Φυτορμόνες

Η βελτίωση των φυτών έχει εκτρέψει τη φυσική εξέλιξή τους προς μια κατεύθυνση ωφέλιμη για τον άνθρωπο, αλλά το γενετικό δυναμικό των φυτών δεν είναι απεριόριστο. Στη διαδικασία αυτή οι μεταβολές στη βιοχημεία, φυσιολογία και μορφολογία των καλλιεργούμενων φυτών είναι σχετικά μικρές. Όμως σήμερα η επιστήμη έχει πλέον τη δυνατότητα της μεταβολής του μοντέλου της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών προς όφελος του ανθρώπου μέσω της χρήσης φυτοορμονών ή φυτορυθμιστικών ουσιών⁴⁷.

Ως φυτοορμόνη ορίζεται μια χημική ένωση που δεν αποτελεί θρεπτικό συστατικό, δηλαδή δεν παρέχει στο φυτό ενέργεια ούτε απαραίτητα μεταλλικά στοιχεία τα οποία σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (<1mM) προάγουν, παρεμποδίζουν ή τροποποιούν ποιοτικά την αύξηση και ανάπτυξη του φυτού⁴⁸. Οι φυτορμόνες μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις φυσικές και τις συνθετικές. Οι φυσικές είναι εκείνες που παράγονται σε ορισμένα μέρη του φυτού και μπορούν από εκεί να μεταφέρονται σε άλλους ιστούς προκαλώντας ειδικές βιοχημικές, φυσιολογικές ή μορφολογικές αντιδράσεις. Δρουν είτε στους ιστούς από τους οποίους παράγονται ή και σε διαφορετικούς. Οι συνθετικές είναι μόρια που παράγονται συνθετικά και δρουν με παρόμοιο με τις φυσικές μηχανισμό, δηλαδή ως χημικοί αγγελιοφόροι μέσα στο ίδιο το φυτό.

Οι φυτορμόνες είναι δυνατόν να κατηγοριοποιηθούν σε μεγάλες ομάδες με βάση τη φυσιολογική τους δράση ή τη χημική τους δομή ή σε ορισμένες περιπτώσεις με συνδυασμό των παραπάνω. Έτσι, οι γνωστότερες έως σήμερα φυτορμόνες κατατάσσονται στις παρακάτω κατηγορίες (για κάθε κατηγορία αναφέρεται και ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα):

1. Αυξίνες (φυσικές: IAA, συνθετικές: IBA)
2. Γιββερρελίνες (φυσικές: gibberillic acid, συνθετικές: γιββερελλιν A4)
3. Κυτοκινίνες (φυσικές: zeatin, συνθετικές: N-6-benzyladenine)
4. Αμπσισικό οξύ (φυσικές: abscisic acid, συνθετικές: -)
5. Αιθυλένιο (φυσικές: αιθυλένιο, συνθετικές: ethephon)
6. Φυτόχρωμα (φυσικές: φυτόχρωμα, συνθετικές: -)

7. Μπρασιτοστεροειδή (φυσικές:brassinolide, συνθετικές:-)
8. Πολυαμίνες (φυσικές:putracine, συνθετικές:-)
9. Μορφακτίνες (φυσικές:-, συνθετικές:chlorflurenol)
- 10.Επιβραδυντές αύξησης (φυσικές:-, συνθετικές:chlormequat)
- 11.Παρεμποδιστές της κυτταρικής διαίρεσης (φυσικές:-, συνθετικές:propham)
- 12.Γαμετοκτόνα (φυσικές:-, συνθετικές:RH-531)
- 13.Καταστροφείς των κορυφών των βλαστών (φυσικές:-, συνθετικές:maieic hydrazine)
- 14.Αποφυλλωτικά (φυσικές:-, συνθετικές:thiadiazuron)
- 15.Αποξηραντικά (φυσικές:-, συνθετικές:diquat)
- 16.Αντίδοτα ζιζανιοκτόνων (φυσικές:-, συνθετικές:R-25788)
- 17.Αντιδιαπνευστικά (φυσικές:CO₂, συνθετικές:silicone)

Στο παρελθόν η εφαρμογή των φυτορμονών στην γεωργική πράξη δεν ακολούθησε το ρυθμό ανάπτυξης των άλλων κατηγοριών των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι λόγοι ποικίλουν και σχετίζονται με: το κόστος ανάπτυξής τους σε σχέση με το προσδοκώμενο οικονομικό όφελος, τοξικολογικά προβλήματα και προβλήματα προστασίας του περιβάλλοντος, δυσκολίες στην απόκτηση εγκρίσεων κυκλοφορίας, αστάθεια στα επιταχυνόμενα αποτελέσματα κ.λ.π.

Σήμερα η εφαρμογή των φυτορμονών συνδέεται άμεσα με κάθε δραστηριότητα της γεωργικής παραγωγής. Στην καλλιέργεια του αμπελιού -μια καλλιέργεια ιδιαίτερα διαδεδομένη στην Ελλάδα- οι φυτορμόνες χρησιμοποιούνται για τον περιορισμό της πρώιμης βλάστησης (chlormequat, ethephon), ευκολότερη αποκοπή των σταφυλιών κατά την συγκομιδή (ethephon), πρωιμότερη ωρίμανση την παραγωγής (ethephon), αύξηση μεγέθους παρασταφυλιών (gibberellic acid) κ.α. Στην καλλιέργεια των μηλοειδών (μηλιές, αχλαδιές) χρησιμοποιούνται για την πρόληψη της καρπόπτωσης κατά την ωρίμανση (NAA), βελτίωσης της καρπόδεσης (2,4D), αύξηση της καρπόδεσης σε δύσκολα επικονιαζόμενες ποικιλίες (gibberellic acid), υποκίνηση ριζοβολείας (IBA) κ.λ.π. Στα εσπεριδοειδή συμβάλλουν στον αποπρασινισμό των ώριμων καρπών (ethephon), επιτάχυνση της ωρίμανσης (ethephon), αύξηση της περιόδου αποθήκευσης και βελτίωση της μετασυλλεκτικής ποιότητα των καρπών (gibberellic acid, pinolene). Στην ελιά βελτιώνουν την καρπόδεση (chlormequat chloride), συμβάλλουν στην ομοιόμορφη ωρίμανση των καρπών (ethephon, etacelasil) και μειώνουν την παρεννιαυτοφορία (ethephon). Αρκετά

διαδεδομένη είναι και στις κηπευτικές καλλιέργειες με χαρακτηριστικά παραδείγματα της χρήσης τους την πρωίμηση-αύξηση της παραγωγής της αγκινάρας (gibberellic acid), βελτίωση της καρπόδεσης (β-NOA), αύξηση της παραγωγής σπόρων υβριδίων (ethephon, gibberillic acid) στην καλλιέργεια του αγγουριού, την αύξηση της καρπόδεσης (ethephon) και το σχηματισμό άσπερμων καρπών σε αγγουράκια για τουρσί (chlorfurecol methyl), την αύξηση του μεγέθους των καρπών στην καλλιέργεια του καρπουζιού (gibberillic acid), την παρεμπόδιση της βλάστησης ξερών κρεμμυδιών κατά την αποθήκευση (maleic hydrazine), την αύξηση του βάρους (gibberellic acid) και την καθυστέρηση της γήρανσης του φυλλώματος (gibberellic acid) των φυτών του μαρουλιού

4.3. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα συμπεριλαμβάνεται μια μεγάλη κατηγορία συνθετικών χημικών με ποικίλους τρόπους δράσης (μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα κ.λ.π.). Ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα αναφέρονται τα δραστικά μόρια και σκευάσματα που περιέχουν μία ή περισσότερες δραστικές ουσίες. Αυτά προσφέρονται με τη μορφή που παραδίδονται στον χρήστη και προορίζονται για να:

- ✓ προστατεύσουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς.
- ✓ επηρεάσουν της βιολογικές διεργασίες των φυτών, εκτός αν πρόκειται για θρεπτικές ουσίες.
- ✓ καταστρέφουν τα ανεπιθύμητα φυτά.
- ✓ καταστρέφουν μέρη των φυτών, να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίζουν την ανεπιθύμητη ανάπτυξη των φυτών.

Η χρησιμοποίηση χημικών ενώσεων από τον άνθρωπο για την καταπολέμηση των ασθενειών είναι διαδικασία γνωστή από αρχαιότατων χρόνων αφού μαρτυρίες από την Ομήρου Ιλιάδα και Οδύσσεια φανερώνουν ότι οι αρχαίοι Έλληνες από την εποχή εκείνη παρότι δεν γνώριζαν τη φύση των ασθενειών, χρησιμοποιούσαν χημικά για την αντιμετώπισή τους. Ο Δημόκριτος (470 π.χ.) συνιστούσε το ψεκάσμο των φυτών με υγρά απόβλητα των ελαίων (κατσίγαρος) για την προστασία τους από το ωίδιο. Ο Ρωμαίος Cato (200 π.χ.) συνιστούσε υποκαπνισμούς της αμπέλου με μίγμα ασφάλτου και θείου, ενώ ο Ρωμαίος Plinius (70 μ.Χ.) στην εργασία του ‘*Historia Naturalis*’ αναφέρεται σε ασθένειες δέντρων, αμπέλου και σιτηρών και μεθόδους για

την αποφυγή τους, όπως την εμβάπτιση του σπόρου αραβόσιτου σε κρασί ή την ανάμιξη του με κτυπημένα φύλλα κυπαρισσιού πριν από την σπορά. Κατά την περίοδο 1600-1850 δεν ήταν ακόμη γνωστός ο ρόλος των μικροοργανισμών ως παθογόνων, όμως γίνονταν προσπάθειες αντιμετώπισής τους με χημικά μέσα. Ο Remnant (1650 μ.χ.) και ο Schulthess (1761 μ.χ.) συνιστούσαν την εμβάπτιση του σπόρου σίτου σε NaCl και CuSO₄ αντίστοιχα, προφανώς για την αντιμετώπιση του άνθρακα. Ο Prevost (1807) αξιολόγησε την επίδραση του CuSO₄ και της θερμοκρασίας στη βλάστηση των τελειοσπορίων του δαυλίτη και ο Robertson (1824) υποστήριξε ότι το θειάφι είναι το καταλληλότερο για την καταπολέμηση του ωιδίου της ροδακινιάς. Τέλος, ο Knight (1834) συνιστούσε το θειασβέστιο για την καταπολέμηση του εξώασκου και ο κύκλος αυτός ολοκληρώθηκε με την καθοριστική δημοσίευση του καθηγητή De Barry (1853) για τον ρόλο των μυκήτων σαν παθογόνων των φυτών με βάση τις ανακαλύψεις του Paster⁴⁹.

Στην συνέχεια ακολούθησε η περίοδος του βορδιγάλειου πολτού (θειικός χαλκός = άσβεστος), που άρχισε με την δημοσίευση του Millardet (1885) για την αποτελεσματικότητά του στην καταπολέμηση του περονοσπόρου της αμπέλου. Ακολούθησαν οι ανακοινώσεις του Riehm (1913) για απολύμανση του σπόρου του σίτου με χρήση ενώσεων υδραργύρου, ενώ το 1932 εμφανίστηκαν οι χαλκούχες ενώσεις με μικρότερη διαλυτότητα σε σύγκριση με το θεικό χαλκό που εμφάνιζαν λιγότερα προβλήματα φυτοτοξικότητας. Το 1934 ανακαλύφθηκαν οι μυκητοκτόνες ιδιότητες των διθειοκαρβαμιδικών από τους Tisdale και Williams, ανοίγοντας την εποχή των οργανικών προστατευτικών μυκητοκτόνων (1930-1965). Ακολούθησε η ανακάλυψη του chloranil, του dichlone (1940) και του captan (1952), ενώ το 1954 χρησιμοποιήθηκε η στρεπτομυκίνη για την καταπολέμηση του βακτηριακού καψίματος των μηλοειδών και τέλος το 1964 είχαμε την ανακάλυψη του chlorothalonil⁴⁹.

Κατά την διάρκεια του Β' παγκοσμίου πολέμου, οι Γερμανοί επιστήμονες εξέλιξαν για τις ανάγκες του πολέμου οργανοφωσφωρικές ενώσεις δημιουργώντας ποικίλα οργανοφωσφωρικά εντομοκτόνα και υψηλού κίνδυνου νευρο-τοξικά αέρια όπως το sarin και το tabun που όμως δεν χρησιμοποιήθηκαν στον πόλεμο. Τα οργανοφωσφωρικά εντομοκτόνα αποτέλεσαν μόρια-οδηγούς για μια σειρά ενώσεων που ανεδείχθησαν ως τα κύρια όπλα στο οπλοστάσιο κατά των παρασίτων - εντόμων που παίζουν σημαντικό ρόλο στη γεωργία, τη δημόσια υγιεινή και την ιατρική. Βέβαια τα πρώτα μέλη της ομάδας αυτής που ήταν εμπορικά διαθέσιμα τα πρώτα

μεταπολεμικά χρόνια είχαν περιορισμένες εφαρμογές λόγω της σημαντικής τους τοξικότητας στα σπονδυλωτά⁴⁹.

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα δρουν στο ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση το οποίο βρίσκεται στην περιοχή της μετασυναπτικής μεμβράνης που συμβάλλει στη μεταφορά του νευρικού ερεθίσματος μέσω του συναπτικού χάσματος η οποία λαμβάνει χώρα με χημικό τρόπο. Η τελική απόληξη του συναπτικού χάσματος έχει στην επιφάνεια της πλήθος από κυστίδια που περιέχουν νευρικούς νευροδιαβιβαστές. Ένας από αυτούς είναι η ακετυλοχολίνη, η οποία ελευθερώνεται όταν η νευρική ίωση φτάσει στα κομβία. Οι νευροδιαβιβαστές διαχέονται και δρουν σε ορισμένα σημεία του μετασυναπτικού κυττάρου τους υποδοχείς. Έτσι δημιουργείται ένα δυναμικό ενέργειας στο συναπτικό χάσμα και μεταβιβάζεται το νευρικό ερέθισμα μεταξύ των νευρικών κυττάρων. Μόλις η ακετυλοχολίνη φτάσει στους υποδοχείς (μετασυναπτική μεμβράνη) απελευθερώνεται μια ελάχιστη ποσότητα ενός ενζύμου της ακετυλοχολινεστεράσης η οποία υδρολύει την ακετυλοχολίνη⁴⁹. Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα προκαλούν φωσφορλίωση της ακετυλοχολινεστεράσης παρεμποδίζοντας τη δράση της, με αποτέλεσμα να συσσωρεύεται ο χημικός νευροδιαβιβαστής στο ένα άκρο του συναπτικού χάσματος και να παρεμποδίζεται η διαβίβαση του νευρικού ερεθίσματος⁵⁰.

Μια άλλη κατηγορία εντομοκτόνων είναι οι οργανοχλωριωμένες ενώσεις, οι οποίες πλέον δεν χρησιμοποιούνται σε ευρεία κλίμακα για την φυτοπροστασία στις αναπτυγμένες χώρες. Όμως η εκτεταμένη χρήση τους στις αναπτυσσόμενες χώρες, η υψηλή τοξικότητά τους σε συνδυασμό με την σταθερότητα που παρουσιάζουν στο περιβάλλον καθιστά την ανίχνευσή τους στα τρόφιμα αναγκαία. Τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα διαιρούνται σε τρεις κύριες κατηγορίες οι οποίες αναφέρονται σε παράγωγα του DDT, στο HCH-γ και σε παράγωγα που σχετίζονται με το aldrin. Πολλά μέλη της πρώτης και τρίτης κατηγορίας περιέχουν και άλλα χημικά στοιχεία εκτός από άνθρακα, υδρογόνο και χλώριο (όπως οξυγόνο, θειάφι ή και τα δύο). Όλα τα οργανοχλωριωμένα έχουν παραπλήσια νευροτοξική δράση, με σημαντικότερη διαφορά την αρχική δράση του DDT η οποία επηρεάζει το περιφερειακό νευρικό σύστημα, σε αντίθεση με το HCH-γ και το aldrin τα οποία επηρεάζουν το κεντρικό νευρικό σύστημα. Παρά τις παραπάνω διαφορές η δράση των μορίων αυτών αποσκοπεί στην αποσταθεροποίηση της νευρικής δραστηριότητας η οποία διακρίνεται από μια υπερβολική αφιθυμία των νευρών και των μυών.

Μια άλλη μεγάλη κατηγορία φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι τα καρβαμιδικά που διαθέτουν μυκητοκτόνες και εντομοκτόνες ιδιότητες⁵⁰ και διακρίνονται σε:

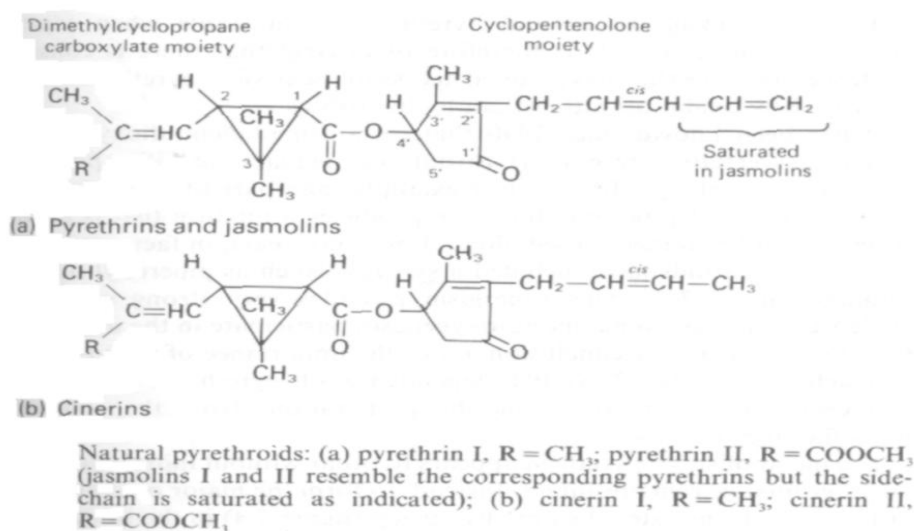
- ✓ αρυλ-N-μεθυλκαρβαμιδικούς εστέρες των φαινολών
- ✓ N-μεθυλο και N-διμεθυλο καρβαμιδικούς εστέρες των ετεροκυκλικών φαινολών.
- ✓ αλδεϋδικά παράγωγα και οι θειόλες τους

Τα μόρια κυρίως της τρίτης κατηγορίας είναι ενδεικτικά του τρόπου με τον οποίο οι ενώσεις αυτές σχεδιάστηκαν αφενός για να προσομοιάζουν στην ακετυλοχολίνη και αφετέρου να έχουν ένα αυξημένο λιπόφιλο χαρακτήρα έτσι ώστε να έχουν τη δυνατότητα να εισέλθουν στον οργανισμό του εντόμου. Έτσι παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα και στα θηλαστικά. Από χημική άποψη, τα μόρια της πρώτης και τρίτης κατηγορίας δεν μοιάζουν με το μόριο της ακετυλοχολίνης όμως διαθέτουν συγκεκριμένα δομικά χαρακτηριστικά (διατομικές αποστάσεις, ηλεκτρονιακές κατανομές) οι οποίες συμβάλλουν στην τοξικότητά τους, ανάλογα με το πόσο η δομή τους αντιγράφει το ενεργό κέντρο της ακετυλενοχολινεστεράσης⁵⁰.

Τα καρβαμιδικά υδρολύονται αργά σε ουδέτερο ή ελαφρώς όξινο υδάτινο περιβάλλον, ενώ στο αλκαλικό περιβάλλον υδρολύονται ταχύτατα. Έτσι, ο χρόνος ημιζωής των καρβαμιδικών σε υδάτινο περιβάλλον με pH =7 είναι περίπου δέκα ημέρες και μόνο μερικά λεπτά σε pH=11. Ο τρόπος δράσης των καρβαμιδικών και οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων είναι παρεμφερής με τα οργανοφωσφορικά να προκαλούν φωσφοριλίωση της ακετυλοχολινεστεράσης και η δράση των καρβαμιδικών να εστιάζεται στον ανταγωνισμό της ακετυλοχολίνης για το ενεργό κέντρο του ενζύμου (ακετυλοχολινεστεράσης) προκαλώντας καρβαμίδωση⁵⁰.

Μια άλλη ιδιαίτερα δημοφιλής κατηγορία φυτοπροστατευτικών προϊόντων που απαντώνται είτε ως φυσικά ή συνθετικά μόρια είναι οι πυρεθρίνες. Τουλάχιστον έξι φυσικά προϊόντα της κατηγορίας αυτής απομονώνονται από τα ξερά άνθη του φυτού *Chrysanthemum cinerariaefolium*, το οποίο καλλιεργείται σε εμπορική κλίμακα για τη παραγωγή εντομοκτόνων σε Κένυα, Τασμανία και διάφορες άλλες χώρες. Τα μόρια αυτά χαρακτηρίζει η εκπληκτική αποτελεσματικότητα σε ιπτάμενα έντομα με αποτέλεσμα να αποτελούν τα δραστικά συστατικά πολλών οικιακών εντομοκτόνων. Υπάρχουν τέσσερα κύρια ενεργά συστατικά των πυρεθρινοειδών γνωστά ως πυρεθρίνες I,II και κινερίνες I,II. Από χημική άποψη τα μόρια αυτά είναι εστέρες μιας καρβοξυλομάδας που ευρίσκεται σε τρικυκλικό δακτύλιο ενώ διαθέτουν

και μια υδροξυλομάδα σε πενταμελή δακτύλιο. Η δομική μονάδα της πυρεθρίνης I είναι το χρυσανθεμικό οξύ, ενώ της πυρεθρίνης II το πυρεθρικό οξύ. Η ένωση των δύο παραπάνω οξέων από την πλευρά της αλκοόλης δημιουργεί μια πλάγια αλυσίδα η οποία αποτελείται από πέντε άτομα C (πυρεθρίνες και ζαμολίνες) ή τέσσερα άτομα C (κινερίνες). Οι χημικοί τύποι των φυσικών πυρεθρινών, γιασμολινών και κινερινών απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα:



Σχήμα 4.1. Χημικοί τύποι φυσικών πυρεθρινών (a), γιασμολινών (a) και κινερινών (b)

Η διαλεύκανση της δομής των φυσικών πυρεθρινών έκαναν εφικτή την παρασκευή συνθετικών αναλόγων τους που έχουν καλύτερη εντομοκτόνο ικανότητα και είναι σταθερότερες⁵⁰.

Η πρώτη συνθετική πυρεθρίνη ήταν η allethrin, μόριο που εμπεριέχει μια συνθετική αλκοόλη και ένα ρακεμικό μίγμα χρυσανθεμικού οξέος, αλλά διαθέτει τοξικότητα παρόμοια με αυτή των φυσικών πυρεθρινών και μειωμένη δράση. Η αποτελεσματικότητά της μπορεί να βελτιωθεί οριακά με την προσθήκη προσθετικών ουσιών. Αργότερα, το 1966 συντέθηκε το bioresmethrin που είναι εκατό φορές τοξικότερη στις οικιακές μύγες σε σύγκριση με τις αντίστοιχες φυσικές πυρεθρίνες. Η επιτυχία της στηρίζεται όχι στη προσπάθεια μίμησης της δομής των φυσικών πυρεθρινών αλλά στην ομοιότητα της γεωμετρικής τους δομής⁵⁰.

Με γνώμονα το έυρημα ότι η παρουσία μιας α-κυανομάδας επηρεάζει σε ένα μικρό βαθμό τις τοξικολογικές επιπτώσεις –σε σπονδυλωτά και ασπόνδυλα- οι πυρεθρίνες είναι δυνατό να χωριστούν στις παρακάτω δυο ομάδες:

A→ οι συνθετικές πυρεθρίνες (πυρεθρινοειδή) που δεν διαθέτουν α-κυανομάδα και οι φυσικές πυρεθρίνες. Χαρακτηριστικό επακόλουθο της δράσης τους είναι το τρέμουλο.

B→ οι συνθετικές πυρεθρίνες που διαθέτουν α-κυανομάδα στη δομή τους και προκαλούν σφαδασμούς & άφθονη εκροή σάλιου στα τρωκτικά.

Πολλοί ερευνητές πιστεύουν ότι η διαφορετική συμπτωματολογία οφείλεται στο διαφορετικό σημείο δράσης τους στο νευρικό σύστημα.

Τα παράγωγα της ουρίας είναι μια ομάδα με διαφορετικό τρόπο δράσης από τα ανωτέρω αφού δεν δρουν στο νευρικό σύστημα των οργανισμών-στόχων. Τα μέλη της ομάδας αυτής παρουσιάζουν ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που συμβάλλουν στην αποτελεσματικότερη καταπολέμηση των εντόμων χωρίς σοβαρές παρενέργειες. Ο μηχανισμός δράσης τους περιλαμβάνει την παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης της χιτίνης (πολυσακχαρίτης σημαντικός για το σχηματισμό του εξωτερικού περιβλήματος των εντόμων), η οποία επιφέρει ανωμαλίες στην ανάπτυξη του εντόμου. Παράλληλα έχει χαμηλή τοξικότητα στα ανώτερα ζώα που δεν διαθέτουν παρόμοιο βιοχημικό σύστημα⁵⁰. Αναλυτικότερα, ο μηχανισμός δράσης των συγκεκριμένων μορίων εμπλέκεται με τη βιοσύνθεση της χιτίνης ο οποίος είναι κρίσιμος για τα έντομα αφού ο βιολογικός τους κύκλος περιλαμβάνει την γέννηση των ωών-εκκόλαψη σε λάρβα - λάρβα δευτέρου σταδίου - νύμφωση-ακμαίο, στάδια που έχουν την ανάγκη ενός εξωσκελετού ο οποίος αναγεννάτε συνέχεια μετά από κάθε έκδυση. Η χιτίνη αποτελεί ένα σημαντικό συστατικό διότι παρέχει στον εξωσκελετό αντοχή-ανθεκτικότητα και σε συνδυασμό με το κερί και τις πρωτεΐνες προστατεύει τα έντομα από την είσοδο των επιβλαβών ουσιών στο σώμα τους⁵⁰.

Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να σημειωθεί ότι -σε παγκόσμια κλίματα- ο αριθμός των ομάδων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ξεπερνά τις εκατόν είκοσι οι οποίες έχουν διαφορετικές χημικές δομές και μηχανισμούς βιολογικής δράσης.

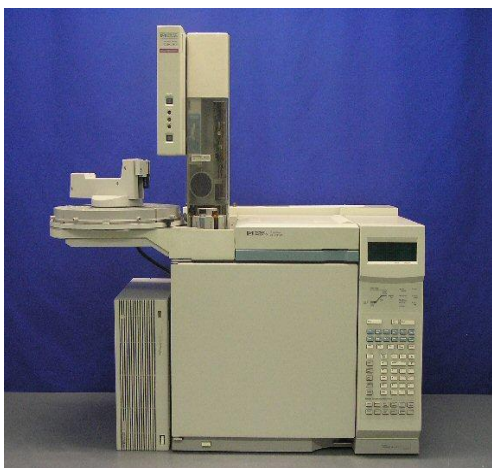
5. Τεχνικές της Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός μορίων με διαφορετική χημική δομή στα τρόφιμα που αποτελούν μια μεγάλη και πολύπλοκη κατηγορία υποστρωμάτων απαιτεί τη χρησιμοποίηση μιας πληθώρας διαφορετικών μεθόδων που βασίζονται είτε σε ανοσοχημικές τεχνικές (π.χ. ELISA) ή βιοαισθητήρες (π.χ. βιοαισθητήρες υποδοχέων-δεσμευτικών πρωτεϊνών) ή σε μη επεμβατικές οπτικές τεχνικές και τεχνικές της ενόργανης ανάλυσης. Οι τελευταίες συνθέτουν μια μεγάλη ομάδα μεθόδων που είναι αρκετά διαδεδομένες στον τομέα της ανάλυσης τροφίμων με κυριότερη τη χρωματογραφία συνδυασμένη με τη φασματομετρία μαζών.

Η χρωματογραφία ανακαλύφθηκε και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από τον Ρώσο βοτανολόγο Tswett (1903), στην προσπάθεια του να διαχωρίσει τις χρωστικές των φύλλων. Η προσπάθειά του αναφερόταν στην εκχύλιση των πράσινων μερών των φύλλων με πετρελαϊκό αιθέρα και τη διαβίβαση του εκχυλίσματος μέσα από στήλη από κονιορτοποιημένο CaCO_3 , διαδικασία που επιτρέπει το διαχωρισμό των συστατικών σε διακριτές έγχρωμες ζώνες. Εξαιτίας αυτού του γεγονότος η τεχνική ορίστηκε διεθνώς ως «Χρωματογραφία».

5.1. Αεριοχρωματογραφία

Στην αέρια χρωματογραφία χρησιμοποιείται μια αέρια κινητή φάση σε συνδυασμό με μια στερεή (αέρια-στερεή χρωματογραφία, GSC) ή μια υγρή (αέρια-υγρή χρωματογραφία, GLS) στατική φάση. Στη GSC ο διαχωρισμός οφείλεται στην προσρόφηση ή το μοριακό αποκλεισμό των συστατικών του μίγματος στη στατική φάση. Στην GLS ή απλώς αέρια χρωματογραφία (GC), ο διαχωρισμός των συστατικών (αέριων ή πτητικών) βασίζεται στην κατανομή τους μεταξύ ενός μη πτητικού (στατική φάση) που είναι καθηλωμένο στο στερεό φορέα ή τα τοιχώματα των ανοικτών τριχοειδών στηλών και ενός αερίου (κινητή φάση-φέρων αέριο). Ο διαχωρισμός οφείλεται στη διέλευση των συστατικών μέσα από την στήλη με διαφορετικές ταχύτητες. Ο ταχύτητα διαχωρισμού των συστατικών μέσα στην στήλη εξαρτάται από τις τάσεις ατμών των συστατικών και τις αλληλεπιδράσεις τους με την στατική φάση⁵¹.



Σχήμα 5.1. Σύστημα αέρια χρωματογραφίας με κλίβανο, αυτόματο δειγματολήπτη και ανιχνευτή ECD, συνδεδεμένο με Η/Υ (Agilent 6890)

5.1.1 Οργανολογία

Ένα τυπικό σύστημα αέριας χρωματογραφίας αποτελείται από τα ακόλουθα μέρη:

α) *Φέρον αέριο.* Το φέρον αέριο βρίσκεται σε υψηλή πίεση –από 100 έως 200 ατμόσφαιρες- σε οβίδες από ανοξείδωτο υλικό⁵². Το φέρον αέριο είναι χημικά αδρανές και καθαρό.

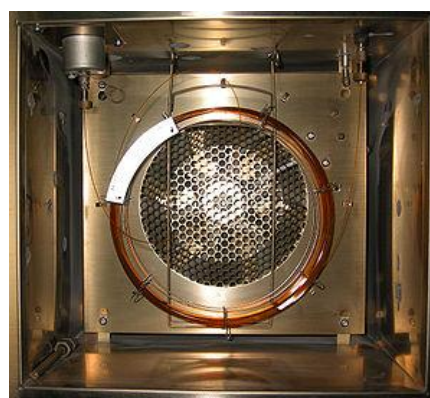
Τα πλέον συνήθη αέρια που χρησιμοποιούνται στη GC είναι το ήλιο, άζωτο, υδρογόνο και το αργό. Αυτά είναι σχετικά φθηνά, κυκλοφορούν στο εμπόριο και εκτός του υδρογόνου, το οποίο είναι εύφλεκτο και απαιτεί ειδικές προφυλάξεις, είναι ακίνδυνα στη χρήση τους. Επίσης επειδή είναι αδρανή, οι αλληλεπιδράσεις των μορίων του δείγματος με τα μόρια του φέροντος αερίου μπορούν να αγνοηθούν. Η επιλογή του φέροντος αερίου εξαρτάται από τις απαιτήσεις του ανιχνευτή και η ροή του στη στήλη οφείλεται στην διαφορά πίεσης μεταξύ της εισόδου και της εξόδου⁵¹.

β) *Ρυθμιστής πίεσης – Ροόμετρο.* Το φέρον αέριο διαβιβάζεται από τις οβίδες στο ρυθμιστή πίεσης ο οποίος με σύστημα βαλβίδων και ενδιάμεσων θαλάμων μειώνει δραστικά την πίεση. Στην συνέχεια το φέρον αέριο διέρχεται μέσα από ένα ροόμετρο που μετρά με ακρίβεια την ταχύτητα του. Η ακριβής μέτρηση της ταχύτητας ροής του φέροντος αερίου είναι απαραίτητη, ιδίως για την ταυτοποίηση ενώσεων, επειδή οι χρόνοι κατακράτησης εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από την ταχύτητα⁵².

γ) *Θερμοστατούμενο σύστημα εισαγωγής δείγματος.* Αναλύεται σε ξεχωριστή ενότητα παρακάτω.

δ) *Κλίβανος*. Η λειτουργία του κλιβάνου μπορεί να είναι ισόθερμη ή κυμαινόμενης θερμοκρασίας. Στην κυμαινόμενη, η θερμοκρασία της στήλης μεταβάλλεται κατά την διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης με βάση ένα καθορισμένο πρόγραμμα. Με τον τρόπο αυτό εμφανίζονται διακριτές κορυφές για τις ενώσεις, των οποίων τα σημεία ζέσεως βρίσκονται σε ευρεία περιοχή θερμοκρασιών και σε πολύ μικρότερο χρόνο σε σύγκριση με την ισόθερμη λειτουργία της στήλης. Επιπλέον, οι κορυφές είναι οξύτερες και περισσότερο ομοιόμορφες (έτσι τα ύψη τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για κατασκευή καμπύλης αναφοράς για ποσοτική ανάλυση)⁵².

Σχήμα 5.2. Κλίβανος στήλης συστήματος αέρια χρωματογραφίας



ε) *Στήλη και προστήλη*. Αναλύεται σε ξεχωριστή ενότητα παρακάτω.

στ) *Ανιχνευτής*. Αναλύεται σε ξεχωριστή ενότητα παρακάτω.

ζ) *Ενισχυτής*. Το σήμα που προέρχεται από τον ανιχνευτή είναι πολύ ασθενές και πρέπει να ενισχυθεί πριν την καταγραφή του. Ο μόνος περιορισμός κατά την επιλογή του βαθμού ενισχύσεως είναι ότι η τιμή του λόγου S/N πρέπει να είναι μεγαλύτερη από 3^{52} .

η) *Καταγραφέας ή ηλεκτρονικός υπολογιστής*. Η χρήση του ηλεκτρονικού υπολογιστή εκτός από εξοικονόμηση χρόνου συμβάλλει και στην καλύτερη - πλέον αξιόπιστη επεξεργασία των χρωματογραφημάτων. Η εξομάλυνση των δεδομένων, η διόρθωση της απόκλισης της γραμμής βάσης, ο υπολογισμός του εμβαδού των κορυφών και ο προσδιορισμός του χρόνου κατακράτησης κάθε κορυφής, απαιτούν σημαντικό αριθμό υπολογισμών, οι οποίοι απλοποιούνται με τη χρήση ενός μικρού υπολογιστή για την επεξεργασία μόνο των τελικών δεδομένων και τον εφοδιασμό κάθε χρωματογράφου με το δικό του ψηφιακό ολοκληρωτή⁵¹.

Τέλος, το σύστημα περιλαμβάνονται και ροόμετρα.

5.1.2. Τεχνικές εισαγωγής δείγματος στην αέρια χρωματογραφία

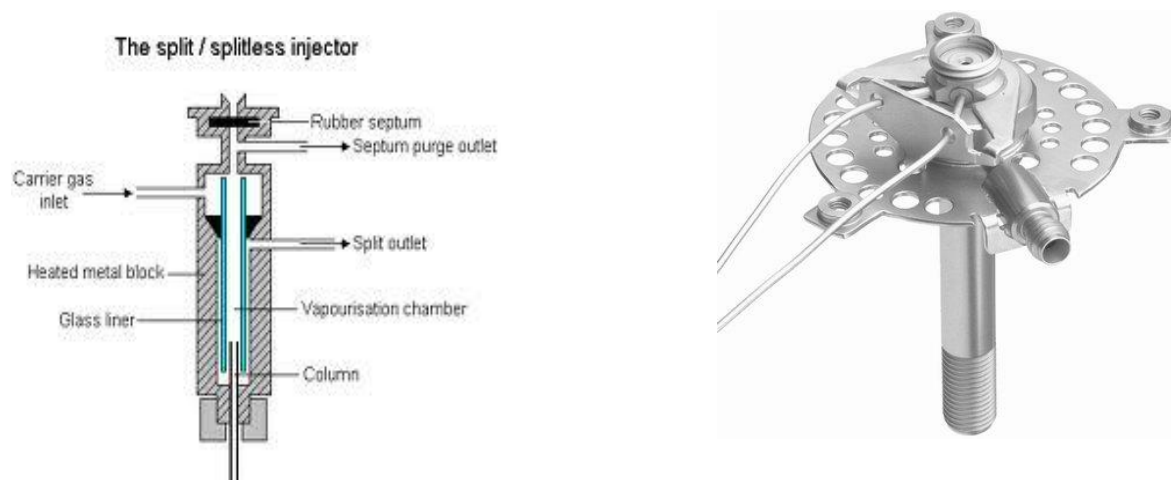
Η εισαγωγή του δείγματος πραγματοποιείται σε πολύ μικρό χρόνο και στο μικρότερο δυνατό όγκο. Ο θάλαμος του δείγματος είναι προθερμασμένος σε υψηλή θερμοκρασία για γρήγορη εξαέρωση των υγρών δειγμάτων και έχει σχεδιαστεί ώστε το φέρον αέριο να μεταφέρει το δείγμα σχεδόν ακαριαία στην στήλη. Η μη τήρηση των παραπάνω προϋποθέσεων ενδέχεται να προκαλέσει την διασπορά του δείγματος προτού αρχίσει η διαδικασία του διαχωρισμού (το δείγμα απλώνεται). Το μέγεθος του δείγματος καθορίζεται από πολλούς παράγοντες όπως την ποσότητα που διαθέτουμε, τη χωρητικότητα της στήλης, του γυάλινου σωλήνα εισαγωγής δείγματος και την ευαισθησία του ανιχνευτή⁵¹. Για τις αναλύσεις των ξενοβιοτικών ουσιών στα τρόφιμα τα δείγματα βρίσκονται σε υγρή μορφή και εισάγονται στη στήλη με γρήγορη και συνεχή κίνηση εμβόλου μιας μικροσύριγγας με κατάλληλη χωρητικότητα μέσα από ένα λεπτό ελαστικό δίσκο⁵¹.

Σύστημα εισαγωγής δείγματος χωρίς διαμοιρασμό (splitless injection)

Ο εγχυτής αποτελείται από ένα θερμαινόμενο θάλαμο που περιέχει στο εσωτερικό του έναν υάλινο σωλήνα εντός του οποίου εγχύεται το δείγμα μέσω ενός διαφράγματος. Ο θάλαμος θερμαίνεται ανεξάρτητα από το χρωματογραφικό κλίβανο και η θερμοκρασία του είναι συνήθως ελαφρώς υψηλότερη από την τελική θερμοκρασία έκλουσης του χρωματογράφου. Το φέρον αέριο που εισέρχεται στο θάλαμο είναι δυνατόν να εξέλθει με τρεις διαφορετικούς τρόπους. Το δείγμα που εγχύεται εξατμίζεται τάχιστα και σχηματίζει ένα μίγμα που περιέχει το φέρον αέριο, το διαλύτη και τις διαλυμένες σε αυτόν ουσίες⁵¹.

Η βαλβίδα διαμερισμού παραμένει κλειστή κατά την διάρκεια της ένεσης με αποτέλεσμα όλη η ποσότητα του δείγματος να εισέρχεται στη στήλη, επιτυγχάνοντας υψηλότερη ευαισθησία. Προϋπόθεση αποτελεί ο όγκος των ατμών του εξαερωμένου δείγματος να μην υπερβαίνει τον όγκο του θαλάμου αφού σε αντίθετη περίπτωση έχουμε υπερφόρτωση του σωλήνα εξαέρωσης και οι ατμοί να διαχυθούν στο σύστημα σωληνώσεων του μηχανήματος. Αυτοί εμφανίζονται μετά από ορισμένο χρονικό διάστημα ως άγνωστες κορυφές και διακυμάνσεις της γραμμής βάσης⁵¹. Εάν αναλογιστούμε τον όγκο του εγχυτήρα και την ταχύτητα ροής του μίγματος προς την στήλη, είναι προφανές ότι για να περάσει όλος ο όγκος του μίγματος στη στήλη

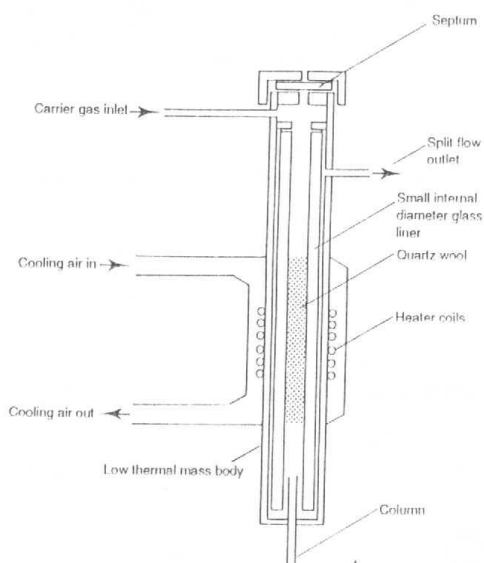
απαιτείται χρονικό διάστημα της τάξης των δεκάτων του δευτερολέπτου. Στην πράξη η βαλβίδα διαμερισμού ανοίγει μετά από ένα καθορισμένο χρονικό διάστημα για την έξοδο των υπολειμμάτων των ατμών, αφού στην αντίθετη περίπτωση οι ουσίες αυτές θα εξακολουθήσουν να διέρχονται από τη στήλη και να λαμβάνονται εσφαλμένα αποτελέσματα⁵¹.



Σχήμα 5.3. Σύστημα εισαγωγής δείγματος split/splitless (αριστερά: σχηματικό διάγραμμα, δεξιά: εγχυτής split/splitless Siltek)

Σύστημα εισαγωγής δείγματος προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας εξαέρωσης (PTV injection)

Μία παραλλαγή του split/splitless εγχυτή είναι ο εγχυτής προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας εξαέρωσης (PTV). Σε αντίθεση με τον προηγούμενο, αυτός έχει μικρότερο μέγεθος οπότε εισέρχεται στη στήλη μειωμένη μάζα από το θερμαινόμενο αέριο και δεν υπάρχει απώλεια της ευαισθησίας. Το σώμα του εγχυτή και η μικρότερη εσωτερική διάμετρος του δίνει την δυνατότητα ταχείας ψύξης και θέρμανσης με ομοιόμορφη θέρμανση του θαλάμου εξαέρωσης. Ο σωλήνας εξαέρωσης περιέχει χαλαζιοβάμβακα ο οποίος κατακρατεί τα σταγονίδια υγρού από το άκρο της σταγόνας. Η αρχική θερμοκρασία έκχυσης είναι κατά 10 °C μικρότερη από το σημείο ζέσης του διαλύτη. Μερικά δευτερόλεπτα μετά την έξοδο της βελόνας της σύριγγας, σε 20-30 sec η θερμοκρασία αυξάνεται στους 300 °C. Επειδή ο διαλύτης εξαερώνεται πριν από τις διαλυμένες σε αυτόν ουσίες, είναι εφικτή η απομάκρυνση των ατμών του κατά την διάρκεια του διαμερισμού, ενώ όταν αρχίσει η εξαέρωση των υπολοίπων ουσιών η βαλβίδα κλείνει⁵¹.



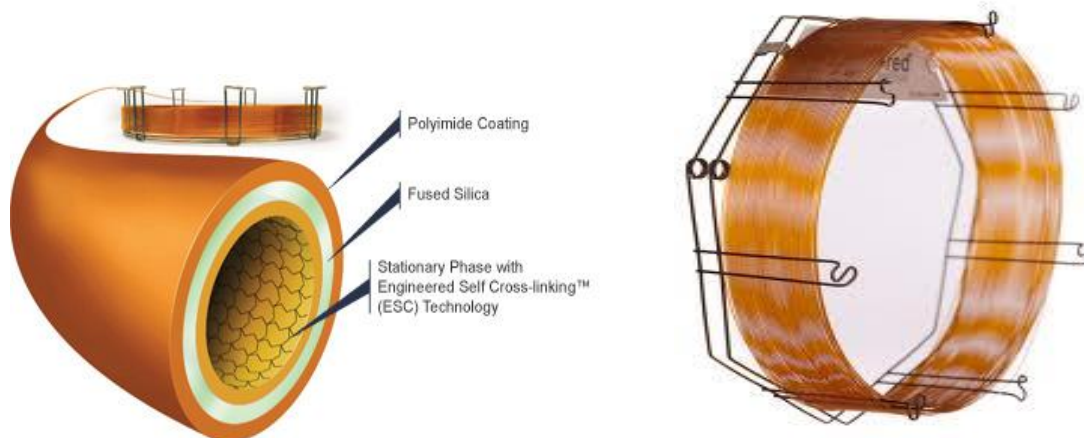
Σχήμα 5.4. Εγχυτής προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας εξαέρωσης (αριστερά: σχηματικό διάγραμμα, δεξιά: εγχυτής PTV GERSTEL)

5.1.3. Στήλες

Η στήλη αποτελεί το σπουδαιότερο τμήμα του αεροχρωματογράφου αφού σε αυτή λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών του μίγματος. Τα κύρια χαρακτηριστικά ποιότητας μιας στήλης είναι :

- ✓ Η διαχωριστικότητα
- ✓ Ο αριθμός των θεωρητικών πλακών
- ✓ Η χωρητικότητα
- ✓ Ο απαιτούμενος χρόνος για την ανάλυση

Υπάρχουν δυο είδη στηλών, οι πληρωμένες ή πακεταρισμένες στήλες και οι τριχοειδείς στήλες. Η στήλη αποτελείται από έναν επιμήκη σωλήνα -συνήθως σε μορφή σπειράματος ή U- για να καταλαμβάνει το δυνατόν μικρότερο χώρο. Είναι από ανοξείδωτο χάλυβα, χαλκό, αργίλιο, ύαλο ή πλαστικό, έχει μήκος από ένα έως δυο (για της πληρωμένες στήλες) έως αρκετές εκατοντάδες μέτρα (οι τριχοειδείς)⁵¹.



Σχήμα 5.5. Τριχοειδής στήλη αέρια χρωματογραφίας (αριστερά: σχηματική περιγραφή της εσωτερική κατανομής των διαφορετικών στρώσεων υλικών, δεξιά: στήλη GC τύπου DB5-MS (μήκους 30 m. Εσωτερικής διαμέτρου 0.32mm και με πάχος επίστρωσης 0.25 μm)

Οι προπληρωμένες στήλες περιέχουν ένα στερεό υπόστρωμα, συνήθως από γη διατομών (πυριτικός σκελετός των αλγών) ή κονιοποιημένο πυρίμαχο υλικό ή πορώδη οργανικά πολυμερή, διαποτισμένα με κατάλληλο υγρό το οποίο αποτελεί την υγρή στατική φάση. Το στερεό υπόστρωμα είναι χημικά αδρανές (αδρανοποιείται με πυριτοποίηση, δηλαδή εισαγωγή της αδρανούς ομάδας $(\text{CH}_3)_3\text{Si}$ - στην θέση του ενεργού -H της πολικής ομάδας του πυριτικού σκελετού), διαθέτει μεγάλη επιφάνεια και η κοκομετρική σύστασή του καλύπτει στενή περιοχή.

Οι τριχοειδείς στήλες είναι κατασκευασμένες από ύαλο, μέταλλο ή οργανικά πολυμερή. Συνήθως δεν έχουν στερεό υπόστρωμα (η υγρή στατική φάση συγκρατείται απευθείας στα τοιχώματα του σωλήνα με την μορφή λεπτότατου υμενίου) και γι' αυτό η χωρητικότητά τους είναι πολύ μικρή. Το μειονέκτημα αυτό αντιμετωπίζεται με την επικάλυψη των τοιχωμάτων με πορώδες υλικό στο οποίο προσροφάτε η υγρή φάση. Εξαιτίας της μικρής αντίστασης τους στη ροή του φέροντος αερίου και της μικρής κατά μήκος πίεσης, είναι δυνατή η δημιουργία τριχοειδών στηλών μήκους μεγαλύτερου από 1000 μέτρα. Βασικά πλεονεκτήματα των στηλών αυτών είναι η δυνατότητα χρησιμοποίησης εξαιρετικά μικρών δειγμάτων (τάξης 1μg) και η υψηλή διαχωριστικότητά τους που οφείλεται στον πολύ μεγάλο αριθμό θεωρητικών πλακών (σε σύγκριση με τις πεπληρωμένες στήλες), η οποία ανέρχεται έως 10^6 .

Οι ουσίες που χρησιμοποιούνται για την υγρή στατική φάση διαφέρουν ως προς τον βαθμό πολικότητας και την περιοχή θερμοκρασιών στην οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Η υγρή φάση πρέπει να είναι :

✓ σταθερή και να έχει αμελητέα τάση ατμών στην θερμοκρασία στην οποία θα χρησιμοποιηθεί, γιατί διαφορετικά εκλούεται βραδέως από το υπόστρωμα και μολύνει τη στήλη.

✓ αδρανής έναντι των διαχωριζόμενων ενώσεων και του φέροντος αερίου, το οποίο πρέπει να είναι αδιάλυτο στην υγρή φάση.

✓ καλός διαλύτης για τα συστατικά του δείγματος και οι συντελεστές κατανομής των διαχωριζόμενων ενώσεων να διαφέρουν μεταξύ τους σε σημαντικό βαθμό, χωρίς όμως να είναι εξαιρετικά μικροί ή μεγάλοι.

✓ αρκετά ρευστή στην περιοχή των θερμοκρασιών που χρησιμοποιούνται

✓ διατίθεται στο εμπόριο σε τυποποιημένη μορφή, κατά προτίμηση ως μια καθαρή ένωση γνωστού μοριακού βάρους.

Οι στατικές φάσεις χωρίζονται συνήθως στις παρακάτω τέσσερις κατηγορίες (ανάλογα με τη δομή και τη διαχωριστική τους ικανότητα):

✓ μη πολικές → υδρογονάνθρακες και φθοριοπαράγωγά τους [SE-30 (μεθυλιωμένο διοξείδιο του πυριτίου), σκουαλένιο]

✓ μέσης πολικότητας → πυριτιούχα και εστέρες (τετραχλωροφθαλικό διβουτύλιο, φθαλικό διεννύλιο)

✓ πολικές → πολυεστέρες και αιθέρες μεγάλου μοριακού βάρους (zonyl E-7, XE-60)

✓ υψηλής πολικότητας → αιθέρες και αμίνες (carbowax 20M, versamid 900)

Η ποσότητα της υγρής στατικής φάσης κυμαίνεται στο 1 έως 10 % κατά βάρος του στερεού υποστρώματος και επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της στήλης και το μέγεθος του δείγματος που μπορεί να εισαχθεί σε αυτή⁵¹.

5.2. Υγρή χρωματογραφία

5.2.1 Οργανολογία

Η υγρή χρωματογραφία είναι ιδιαίτερα χρήσιμη για δείγματα που περιέχουν μεγάλα μόρια ή ιονισμένα σωματίδια με χαμηλές τάσεις ατμών και για θερμικά ασταθείς ενώσεις που δε μπορούν να εξαερωθούν χωρίς να διασπαστούν. Στην υγρή χρωματογραφία η κινητή φάση είναι υγρή ενώ η στατική στερεά. Η διαβίβαση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση αντλιών υψηλής πίεσης, όταν η στατική φάση αποτελείται από πολύ μικρής διαμέτρου (επομένως μεγάλης αντίστασης) σωματίδια υψηλής διαχωριστικής απόδοσης (Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης ή Απόδοσης - HPLC). Η χρησιμοποίηση των υλικών πλήρωσης σωματιδίων μεγέθους 2-10 μm στη σύγχρονη υγρή-χρωματογραφία απαιτεί την ανάπτυξη πιέσεων από τις αντλίες της τάξης μερικών χιλιάδων psi για να γίνει δυνατή η επίτευξη ικανοποιητικών ταχυτήτων ροής του υλικού έκλουσης⁵³.



Σχήμα 5.6. Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) με 2 παλινδρομικές αντλίες, αυτόματοδειγματολήπτη, κλίβανο στήλης και ανιχνευτή UV/VIS (Varian Prostar Prep HPLC)

Έτσι, η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη και δαπανηρότερη. Αποτελείται δε από τα παρακάτω βασικά μέρη⁵³:

α) *Δοχεία διαλυτών*. Αρχικά ένα σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με ένα ή περισσότερα υάλινα ή ανοξείδωτα δοχεία τα οποία περιέχουν τους διαλύτες έκλουσης.

β) *Απαερωτές*. Τα δοχεία αυτά είναι συχνά εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης των διαλυμένων αερίων -συνήθως οξυγόνου και αζώτου- που παρεμποδίζουν το σχηματισμό φυσαλίδων στη στήλη και τον ανιχνευτή των συστημάτων. Οι φυσαλίδες αυτές προκαλούν την διεύρυνση των κορυφών ή ακόμα τη φραγή της ροής της κινητής φάσης. Οι απαερωτές αποτελούνται από ένα σύστημα άντλησης κενού, ένα σύστημα απόσταξης και από συστήματα εισαγωγής μικρών φυσαλίδων αδρανούς αερίου χαμηλής διαλυτότητας. Συχνά τα συστήματα αυτά περιλαμβάνουν και φίλτρα απομάκρυνσης σκόνης & αιωρούμενων σωματιδίων από τους διαλύτες για να προληφθούν πιθανές βλάβες στις αντλίες ή στα συστήματα έγχυσης.

γ) *Σύστημα άντλησης*. Οι απαιτήσεις ενός συστήματος άντλησης περιλαμβάνει την ανάπτυξη πιέσεων έως 600 psi, απαλλαγή από παλμούς ροής, ταχύτητες ροής που κυμαίνονται από 0,1–10 mL/min, έλεγχο ροής και επαναληψιμότητα ροής 0,5% ή καλύτερη και τμήματα ανθεκτικά στη διάβρωση. Οι τύποι αντλιών που χρησιμοποιούνται είναι παλινδρομικές αντλίες, αντλίες εκτόπισης και πνευματικές αντλίες. Το 90% των εμπορικών συστημάτων χρησιμοποιούν παλινδρομικές αντλίες που συνήθως αποτελούνται από ένα μικρό θάλαμο στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα μηχανικά κινούμενο έμβολο. Δύο σφαιρικές βαλβίδες ανοίγουν και κλείνουν εκ περιτροπής ελέγχοντας τη ροή του διαλύτη μέσα και έξω από τον κύλινδρο, ενώ ο διαλύτης βρίσκεται σε άμεση επαφή με το έμβολο. Εναλλακτικά μπορεί να μεταδίδεται πίεση στο διαλύτη μέσω ενός εύκαμπτου διαφράγματος αντλούμενο πνευματικά από ένα παλινδρομικό έμβολο.

δ) *Σύστημα ελέγχου ροής*. Πολλά εμπορικά όργανα είναι εφοδιασμένα με συσκευές ελεγχόμενες από υπολογιστή για τη μέτρηση της ταχύτητας ροής, η οποία υπολογίζεται από την πτώση της πίεσης σε ένα αναστολέα τοποθετημένο στην έξοδο της αντλίας. Κάθε παρατηρούμενη διαφορά στο σήμα από μια προκαθορισμένη τιμή χρησιμοποιείται ακολούθως για την αύξηση ή μείωση της ταχύτητας του κινητήρα της αντλίας.

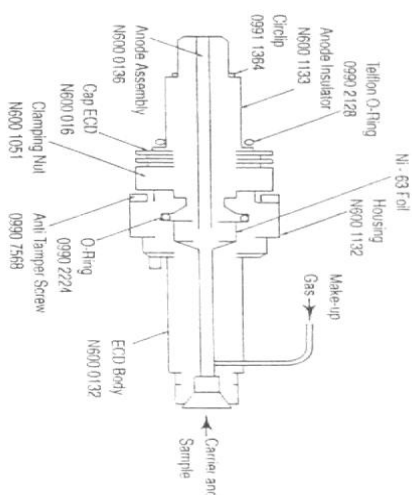
ε) *Σύστημα έγχυσης δείγματος*. Συχνά ο περιοριστικός παράγοντας στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων στην υγρή χρωματογραφία είναι ο τρόπος εισαγωγής των δειγμάτων στη στήλη. Οι όγκοι πρέπει να είναι οι ελάχιστοι δυνατοί - από μερικά έως 500 μL - και η εισαγωγή θα πρέπει να επιτυγχάνεται χωρίς να προκαλείται αποσυμπίεση του συστήματος. Ο παλαιότερος και πλέον απλός τρόπος εισαγωγής του δείγματος ήταν η έγχυση με σύριγγα μέσω ενός ελαστικού διαφράγματος. Σήμερα, η πλέον συνηθισμένη μέθοδος εισαγωγής δείγματος βασίζεται στην βαλβίδα δειγματοληψίας που δίνουν δυνατότητα έγχυσης από 0,5-500 μL .

στ) *Αναλυτικές στήλες*. Οι στήλες της υγρής χρωματογραφίας είναι συνήθως κατασκευασμένες από σωλήνες ανοξείδωτου χάλυβα μικρής διαμέτρου, ευθύγραμμες με μήκος από 5-150cm. Περιστασιακά χρησιμοποιούνται και σπειροειδείς στήλες των οποίων όμως η αποτελεσματικότητα λόγω σχήματος δεν είναι καλή. Η εσωτερική διάμετρος τους είναι συνήθως 4-10mm και το μέγεθος των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10 μm . Στην υγρή χρωματογραφία χρησιμοποιούνται δυο βασικοί τύποι υλικών πλήρωσης, τα σφαιροειδή και τα πορώδη. Τα πρώτα αποτελούνται από σφαιρικά, μη πορώδη σωματίδια από ύαλο ή πολυμερές διαμέτρου 30-40 μm . Στην επιφάνειά τους αποτίθεται ένα λεπτό πορώδες στρώμα από διοξείδιο του πυριτίου, αλουμίνα, συνθετική ρητίνη πολυστυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή μια ιοντοανταλλακτική ρητίνη. Για μερικές εφαρμογές προστίθεται ένα επιπλέον στρώμα αποτελούμενο από μια υγρή στατική φάση που συγκρατείται με προσρόφηση. Το υλικό πλήρωσης της δεύτερης κατηγορίας αποτελείται από μικροσωματίδια διαμέτρου 3-10 μm με ιδιαίτερη επιμέλεια για την ελαχιστοποίηση του εύρους περιοχής μεγεθών.

5.3. Ανιχνευτές

5.3.1. Ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD)

Η λειτουργία του ανιχνευτή βασίζεται στη μεταβολή της αγωγιμότητας του αερίου που διέρχεται απ' αυτόν, εξαιτίας των ηλεκτρονίων που παράγονται από μια ραδιενεργή πηγή η οποία υπάρχει μέσα στον ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων αποκρίνεται στη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Στον ανιχνευτή το έκλουσμα της στήλης εισάγεται μέσα στο θάλαμο που έχει δυο μεταλλικούς οπλισμούς συνδεδεμένους με μια πηγή σταθερής τάσης. Η αγωγιμότητα μεταξύ των οπλισμών αποκαθίσταται μέσω της σταθερής ροής ηλεκτρονίων που προέρχονται από μια ραδιενεργή πηγή ακτινών β, η οποία αποτελείται από έλασμα τιτανίου στο οποίο έχει απορροφηθεί τρίτιο, ή από έλασμα που περιέχει ^{63}Ni . Όταν το έκλουσμα περιέχει οργανικά μόρια προκαλείται ελάττωση της αγωγιμότητας του χώρου μεταξύ των οπλισμών, εξαιτίας της σύλληψης ηλεκτρονίων από αυτά και της ελάττωσης του ρεύματος. Το ρεύμα που καταγράφεται είναι πολύ ασθενές και ενισχύεται για την καταγραφή του. Βασικά πλεονεκτήματα του ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων είναι η εξαιρετικά μεγάλη ευαισθησία του, ιδίως στις αλογονούχες ενώσεις⁵¹.

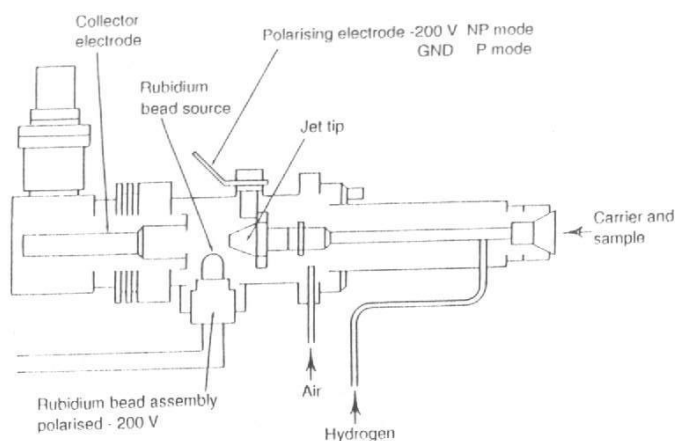


Σχήμα 5.7. Ανιχνευτής σύλληψης ηλεκτρονίων (αριστερά: σχηματικό διάγραμμα, δεξιά: ανιχνευτής ECD)

5.3.2. Ανιχνευτής Αζώτου φωσφόρου (NPD)

Ο ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (nitrogen-phosphorus detector, NPD) συχνά αναφέρεται στη βιβλιογραφία και ως θερμοϊονικός ανιχνευτής (thermionic detector, TID). Ο ανιχνευτής αυτός χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό για τις αναλύσεις υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων αφού ανιχνεύει μόρια που περιέχουν άζωτο ή φωσφόρο.

Στον ανιχνευτή NPD ένα άλας αλκαλικών μετάλλων, κυρίως πυριτικό άλας ρουβιδίου, είναι τοποθετημένο στην φλόγα. Η διάταξη αυτή δεν έχει επιπτώσεις στην ευαισθησία του σχετικά με την ανίχνευση ποικίλων οργανικών μορίων και αυξάνει την ευαισθησία του ανιχνευτή απέναντι σε συστατικά τα οποία περιέχουν άζωτο και φωσφόρο. Τα βασικά σημεία της οργανολογίας του NPD είναι ένα ακροφύσιο φλόγας, μία πηγή άλατος αλκάλειος και ένα θερμαινόμενο ηλεκτρόδιο συλλογής.



Σχήμα 5.8. Ανιχνευτής αζώτου-φωσφόρου (αριστερά: σχηματικό διάγραμμα, δεξιά: ανιχνευτής NPD)

Για τη συλλογή των ιόντων απαιτείται μια τάση περίπου 300V στο συλλεκτικό ηλεκτρόδιο, που επιτυγχάνεται με χρήση των αλκάλειων κάλιο (K), ρουβίδιο (Rb), καίσιο (Cs) και νάτριο (Na). Έχει διαπιστωθεί ότι η αξιοπιστία του ανιχνευτή μειώνεται κατά τη σειρά $K > Rb > Cs$ ενώ η ευαισθησία αυξάνεται με τον ατομικό

αριθμό, ενώ η καθαρότητα και συγκέντρωση του αλκαλικού άλατος επηρεάζουν την απόδοση της ανίχνευσης.

Το έκλουσμα της στήλης αναμιγνύεται με αέριο υδρογόνο και διέρχεται από τη φλόγα που δημιουργείται από το μίγμα υδρογόνου-αέρα. Τα άτομα του αλκάλειου που σχηματίζονται με τη βοήθεια της φλόγας ιονίζονται με την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Τα ηλεκτρόνια που απελευθερώνονται συλλέγονται, ενώ ταυτόχρονα παράγουν μία ροή ανάλογη του αριθμού των ιόντων. Η παρουσία αζώτου ή φωσφόρου (ακόμα και αλογόνων), ο ιονισμός των οποίων αυξάνεται από την παρουσία του αλκάλειου, αυξάνει το ρυθμό ροής και έτσι αυξάνεται το σήμα. Πάντως ο μηχανισμός της λειτουργίας του NPD αποτελεί ακόμα αντικείμενο μελετών. Όσον αφορά τα χαρακτηριστικά του, ο NPD είναι -όπως προαναφέραμε- ιδιαίτερα ευαίσθητος στο άζωτο και τον φώσφορο, με όρια ανίχνευσης στο επίπεδο των 10^{-14} g/s, επιτρέποντας τον προσδιορισμό ιχνών. Η γραμμικότητα κυμαίνεται από 10^2 έως 10^5 εξαρτώμενη από τη φύση του μορίου. Μειονέκτημα του NPD είναι η ανάγκη συχνής βαθμονόμησης. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί ότι η εξειδίκευση και η ευαισθησία επηρεάζονται σημαντικά από το ρυθμό ροής του υδρογόνου (Σχήμα 5.8), από τη θέση του άκρου του αλκάλειου και από τη θέση του ηλεκτροδίου.

5.3.3. Φασματομέτρα μαζών

Η φασματομετρία μαζών είναι ίσως η τεχνική με τη μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, σε σχέση με όλες τις άλλες αναλυτικές τεχνικές, αφού παρέχει πληροφορίες σχετικά με την στοιχειακή κατάσταση του εξεταζόμενου δείγματος, τις δομές των ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων, τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών και την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα⁵³. Σήμερα χρησιμοποιούνται διάφοροι τύποι οργάνων για το φασματομετρικό προσδιορισμό των μοριακών μαζών.



Σχήμα 5.9. Σύστημα φασματομετρίας μαζών απλού τετραπόλου σε συνδυασμό με υγρή (Agilent) (πάνω) και με αέρια (Shimatzu) (κάτω) χρωματογραφία



Τα κύρια τμήματα των φασματομέτρων μαζών είναι:

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
2. Χρωματογραφικό σύστημα
3. Πηγή ιόντων (αεριοχρωματογραφία) ή διασύνδεση (υγρή χρωματογραφία)
4. Αναλυτής μαζών
5. Ανιχνευτής
6. Επεξεργαστής σήματος και σύστημα καταγραφής και ανάγνωσης των πληροφοριών

Ρόλος του συστήματος εισόδου είναι να επιτρέπει την εισαγωγή ενός πολύ μικρού ποσοστού από το δείγμα να εισέλθει στο φασματόμετρο μαζών, όπου τα συστατικά του μετατρέπονται σε ιόντα σε αέρια κατάσταση. Συχνά το σύστημα εισαγωγής περιλαμβάνει και ένα σύστημα εξαέρωσης στερεών ή υγρών δειγμάτων, ενώ οι πηγές ιόντων που χρησιμοποιούνται στα φασματόμετρα μαζών μετατρέπουν τα συστατικά του δείγματος σε ιόντα. Σε πολλές περιπτώσεις το σύστημα εισαγωγής και η πηγή ιόντων συνδυάζονται σε μια ενιαία μονάδα. Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το λόγο μάζα προς φορτίο (m/z). Ένας ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να είναι σε θέση να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους και να επιτρέπει τη διέλευση αρκετών ιόντων, ώστε να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Στο φασματόμετρο μαζών περιλαμβάνεται και ένας μεταλλάκτης ιόντων που μετατρέπει την δέσμη των ιόντων σε ηλεκτρικό σήμα.

Το πρώτο στάδιο σε μια μέτρηση με φασματομετρία μαζών είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αερίου αναλύτη, διαδικασία καθοριστική για τους στόχους της μέτρησης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Πράγματι η μορφή του φάσματος μαζών ενός μορίου συνδέεται άμεσα με την τεχνική παραγωγής ιόντων. Οι πηγές χωρίζονται σε δυο μεγάλες κατηγορίες, τις πηγές αέριας φάσης και τις πηγές εκρόφησης.

Στις πηγές αέριας φάσης το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιονίζεται. Αυτές βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή όταν η τεχνική συνδυάζεται με αέρια χρωματογραφία. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες σχετικές τεχνικές είναι:

1. Ιονισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI)
2. Χημικός ιονισμός (CI)

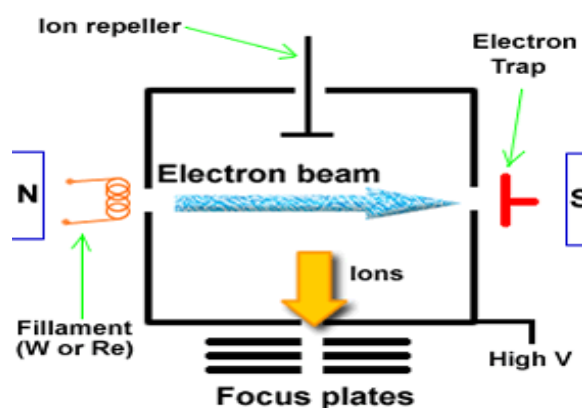
Στις πηγές εκρόφησης το δείγμα βρίσκεται σε υγρή κατάσταση και μετατρέπεται απευθείας σε εξαερωμένα ιόντα. Η τεχνικές αυτές συνδυάζονται κυρίως με υγρή χρωματογραφία. Οι πλέον χρησιμοποιούμενες σχετικές τεχνικές είναι:

1. Ιονισμός πεδίου (FI)
2. Εκρόφησης πεδίου (FD)
3. Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)
4. Ιονισμός εκρόφησης με την βοήθεια υλικού μήτρας (MALDI)
5. Εκρόφησης πλάσματος (PD)
6. Βομβαρδισμού με άτομα μεγάλης ταχύτητας (FAB)
7. Δευτερογενούς ιόντος (SIMS)
8. Ιονισμός με θερμοψεκασμό (TS)

Στην συνέχεια θα αναφερθούμε στις δυο τεχνικές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διενέργεια του πειραματικού μέρους της διατριβής, την τεχνική πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) η οποία συνδυάστηκε με αέρια χρωματογραφία και τον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI) στην υγρή χρωματογραφία.

Ιονισμός πρόσκρουσης ηλεκτρονίων

Στην τεχνική αυτή τα ηλεκτρόνια εκπέμπονται από ένα θερμαινόμενο νήμα βολφραμίου ή ρηνίου και επιταχύνονται με μια τάση περίπου 70V, η οποία εφαρμόζεται μεταξύ του νήματος και μιας ανόδου.

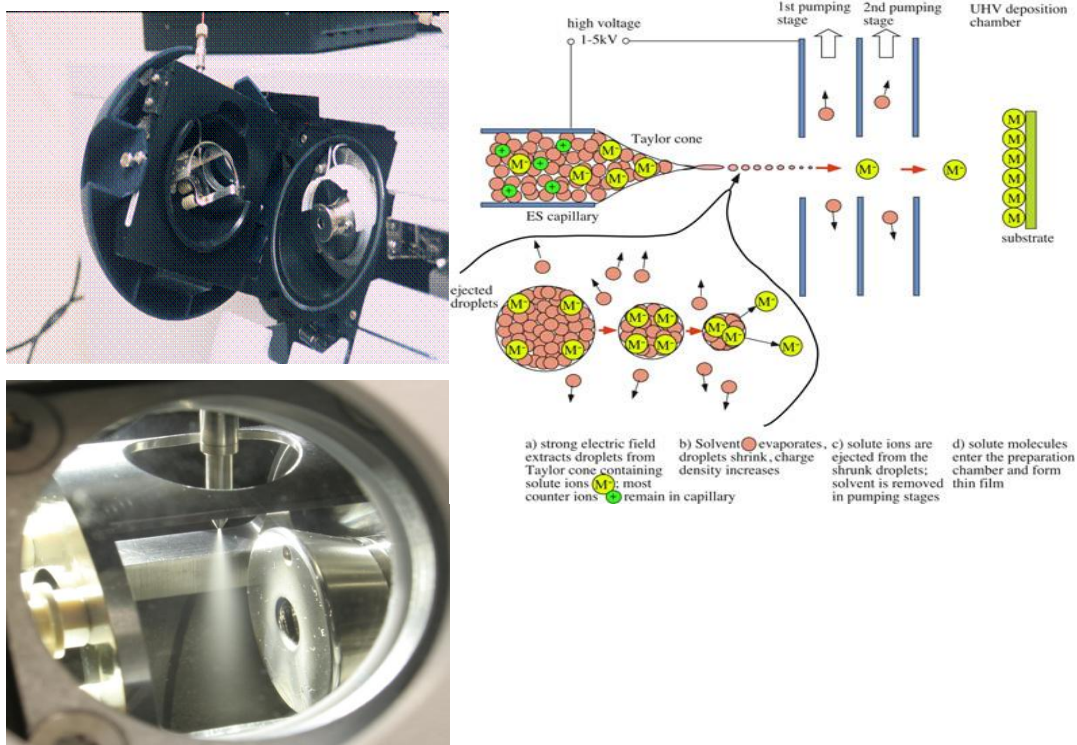


Σχήμα 5.10. Πηγή ιονισμού EI/CI συστήματος GC-MS (Bruker Daltonics) (αριστερά), Σχηματικό διάγραμμα διαδικασία δημιουργίας ιόντων (δεξιά)

Οι διαδρομές των ηλεκτρονίων και των μορίων σχηματίζουν μια ορθή γωνία και διασταυρώνονται στο κέντρο της πηγής όπου γίνεται η πρόσκρουση και ο ιονισμός. Τα πρωταρχικά προϊόντα που δημιουργούνται είναι ιόντα φορτισμένα θετικά, ως αποτέλεσμα της επίδρασης των ηλεκτρονίων μεγάλης ενέργειας στα μόρια η οποία προκαλεί –λόγω ηλεκτροστατικής άπωσης- την απόσπαση ηλεκτρονίων από αυτά. Τα θετικά ιόντα που παράγονται από την πρόσκρουση με τα ηλεκτρόνια οδηγούνται στον αναλυτή μαζών με μια μικρή τάση (περίπου 5V). Οι πηγές αυτές είναι εύχρηστες και παράγουν μεγάλα ρεύματα ιόντων, οπότε παρέχουν μεγάλες ευαισθησίες. Παρόλα αυτά μόνο ένας μικρός αριθμός μορίων ιονίζεται (ένα στα 10^3 έως 10^6). Η εκτεταμένη θραύση και επομένως ο μεγάλος αριθμός κορυφών είναι ένα πλεονέκτημα επειδή συχνά κάνει δυνατή τη χωρίς αμφιβολία ταυτοποίηση μιας ουσίας. Ωστόσο η έντονη θραύση αποτελεί πολλές φορές μειονέκτημα αφού εξαφανίζει τη κορυφή του μοριακού ιόντος, οπότε δεν μπορεί να καθοριστεί το μοριακό βάρος μιας ουσίας⁵³.

Ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό

Ο ιονισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Το διάλυμα του δείγματος αντλείται μέσω μιας ανοξείδωτης τριχοειδούς βελόνας ή τριχοειδούς σωλήνα εάν η πηγή είναι συνδεδεμένη με υγρο χρωματογράφο, με ταχύτητα $\mu\text{L}/\text{min}$. Η βελόνα βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που περιβάλλει τη βελόνα. Οι φορτισμένες μικρές σταγόνες που παράγονται διέρχονται μέσω ενός τριχοειδούς, όπου ο διαλύτης εξατμίζεται και τα μόρια του αναλύτη φορτίζονται⁵³.



Σχήμα 5.11. Πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό (Varian 1200L, LC-QqQ) (πάνω αριστερά), Πηγή ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό σε λειτουργία (Agilent 6400 LC-QqQ), Σχηματικό διάγραμμα διαδικασία εκνώφωσης και φημιουργείας ιόντων (πάνω δεξιά)

Καθώς η διάμετρος της σταγόνας μειώνεται λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη, η πυκνότητα του φορτίου αυξάνει (δυνάμεις Coulomb) και λαμβάνει χώρα η εκρόφηση των ιόντων σε αέριο περιβάλλον. Ενδιαφέρον χαρακτηριστικό είναι ότι η θραύση μεγάλων και θερμικά ασταθών βιομορίων είναι περιορισμένη. Επιπλέον τα παραγόμενα ιόντα είναι πολυσθενή, οπότε οι τιμές είναι αρκετά μικρές και ανιχνεύονται εύκολα με τετραπολικούς αναλυτές μαζών που καλύπτουν περιοχή μοριακών βαρών έως 1500.

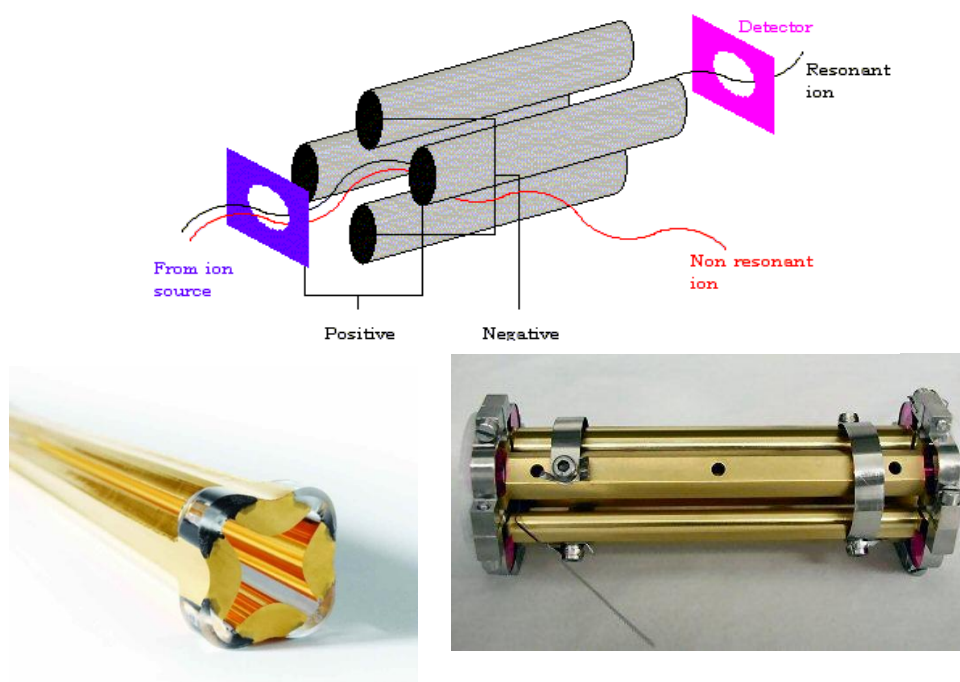
Αναλυτές μαζών

Για το διαχωρισμό των ιόντων με διαφορετικούς λόγους μάζας προς φορτίο έχουν αναπτυχθεί ποικίλες διατάξεις. Ένας ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους ενώ παράλληλα να επιτρέπει τη διέλευση αρκετών ιόντων για να παραχθεί ένα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Στην

συνέχεια του κεφαλαίου θα επικεντρωθούμε στα είδη των αναλυτών που χρησιμοποιήθηκαν για τη διενέργεια της παρούσας μελέτης.

Φασματομετρία μαζών τετραπολικού ανιχνευτή μαζών

Ο συνηθέστερος τύπος φασματομέτρου μαζών είναι ο τετραπολικός αναλυτής μαζών. Το όργανο αυτό έχει μικρό μέγεθος, μικρότερο κόστος και είναι μηχανικά ανθεκτικότερος από τους περισσότερους τύπους αναλυτών⁵³.



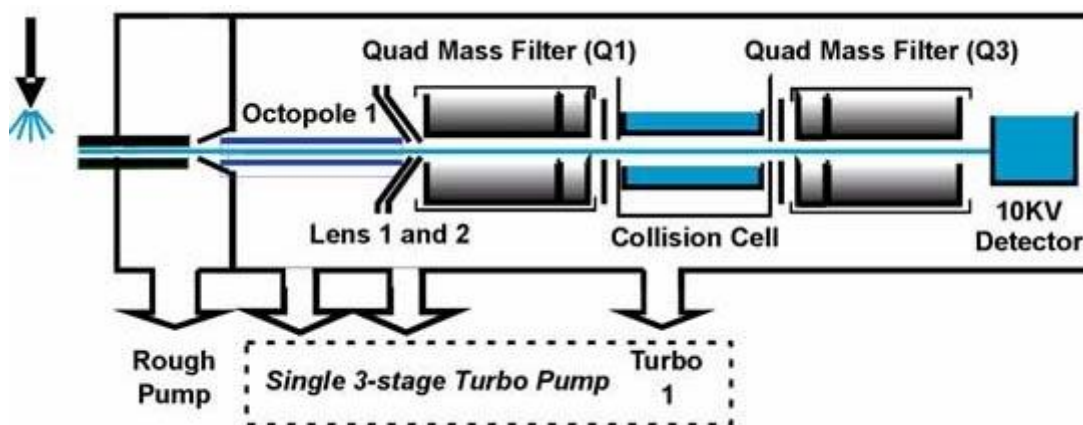
Σχήμα 5.12. Σχηματικό διάγραμμα διαδικασία διαχωρισμού ιόντων (πάνω), τετραπολικός αναλυτής μαζών (κάτω αριστερά και δεξιά)

Έχει το πλεονέκτημα των υψηλών ταχυτήτων σάρωσης με αποτέλεσμα το πλήρες φάσμα μαζών να λαμβάνεται σε χρόνο μικρότερο των 100 ms^3 . Τα κυριότερα μέρη ενός τετραπολικού φασματομέτρου αποτελούν οι τέσσερις παράλληλες κυλινδρικές ράβδοι που δρουν ως ηλεκτρόδια. Από αυτές, οι διαγώνιες συνδέονται ηλεκτρικά μεταξύ τους. Το ένα ζεύγος συνδέεται με τον θετικό πόλο μιας πηγής μεταβλητής τάσης DC, ενώ το άλλο με τον αρνητικό πόλο της. Επιπλέον, σε κάθε ζεύγος ράβδων εφαρμόζονται μεταβλητές τάσεις AC, οι οποίες μεταξύ τους έχουν διαφορά φάσης 180° . Για να ληφθεί ένα φάσμα τα ιόντα επιταχύνονται στο χώρο ανάμεσα των ράβδων με ένα δυναμικό 5-10 V. Τα εναλλασσόμενα και συνεχή

δυναμικά των ράβδων αυξάνουν συγχρόνως διατηρώντας το λόγο τους σταθερό. Σε κάποια χρονική στιγμή όλα τα ιόντα -εκτός όσων έχουν μια συγκεκριμένη τιμή λόγω m/z - φτάνουν στις ράβδους και μετατρέπονται σε ουδέτερα μόρια. Έτσι φτάνουν στο μεταλλάκτη μόνα τα ιόντα, των οποίων οι τιμές m/z βρίσκονται σε μια στενή περιοχή τιμών του λόγου m/z .

Συζευγμένη φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου

Οι πληροφορίες που μας παρέχει ένα σύστημα απλής φασματομετρίας μαζών μπορούν να ενισχυθούν με το συνδυασμό 2 αναλυτών μαζών σε ένα σύστημα.



Σχήμα 5.13.
Σχηματικό διάγραμμα διαδικασίας διαχωρισμού ιόντων (πάνω), σύστημα φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου (κάτω).



Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών επιτρέπει τη λήψη του φάσματος μιας χρωματογραφικής κορυφής η οποία παράγεται από την θραυσματοποίηση ενός ιόντος (προδρομο) στα θραύσματα του (παραγόμενα). Μετά το διαχωρισμό ενός συγκεκριμένου ιόντος (μητρικό ιόν) σε έναν αναλυτή μαζών, στο ιόν εφαρμόζεται συγκεκριμένη ενέργεια με στόχο τη θραυσματοποίησή του σε θυγατρικά ιόντα, τα

οποία στην συνέχεια διαχωρίζονται μέσω ενός δεύτερου αναλυτή μαζών. Η τεχνική αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με δυο τρόπους: στο χώρο, χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικούς αναλυτές μαζών (τεχνική τριπλού τετραπόλου) ή στο χρόνο (αναλυτής παγίδας ιόντων).

Η τεχνική του τριπλού τετραπόλου περιλαμβάνει δυο τετραπολικούς αναλυτές μαζών μεταξύ των οποίων παρεμβάλεται ένα στοιχείο που ονομάζεται κελί θραυσματοποίησης (ή 2^ο «τετράπολο»). Η τεχνική αυτή μπορεί να λειτουργήσει με τέσσερεις διαφορετικούς τρόπους:

1. Παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων στο πρώτο τετράπολο και πλήρους σάρωσης στο τρίτο τετράπολο

2. Πλήρους Σάρωσης στο πρώτο τετράπολο και παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων στο τρίτο τετράπολο

3. Πλήρους Σάρωσης στο πρώτο τετράπολο και πλήρους σάρωσης στο τρίτο τετράπολο

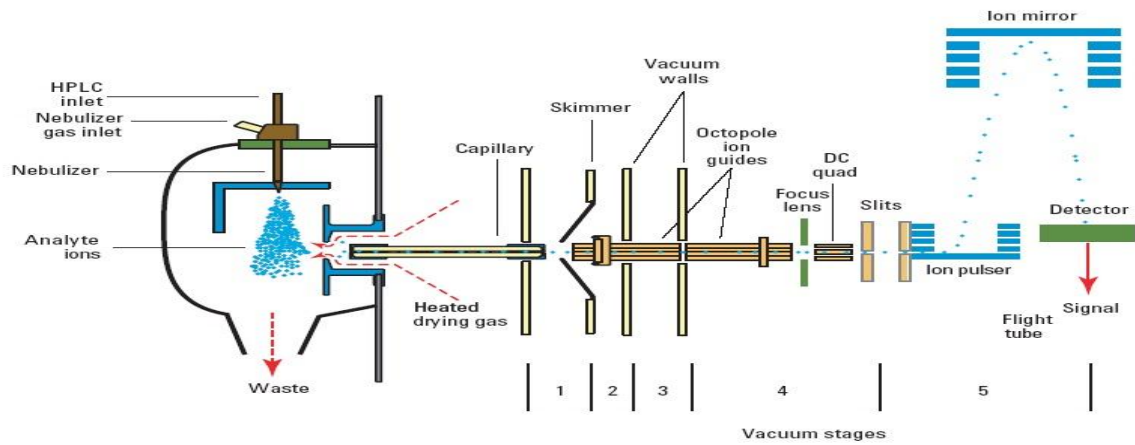
4. Παρακολούθησης επιλεγμένων ιόντων στο πρώτο τετράπολο και επιλεγμένων ιόντων στο τρίτο τετράπολο ή παρακολούθηση πολλαπλών μεταπτώσεων (MRM)

Κατά την τεχνική πολλαπλών μεταπτώσεων (MRM) ένα συγκεκριμένο μητρικό ιόν σαρώνεται στο πρώτο τετράπολο, θραυσματοποιείται στο κελί θραυσματοποίησης και τα θυγατρικά ιόντα του σαρώνονται στο τρίτο τετράπολο.

Φασματομετρία μαζας χρόνου πτήσης ιόντων

Στα όργανα χρόνου πτήσης ιόντων τα ιόντα που παράγονται επιταχύνονται σε παλμικό ηλεκτρικό πεδίο $10^3 - 10^4$ V. Τα επιταχυνόμενα σωματίδια διέρχονται μέσω ενός σωλήνα πορείας, ο οποίος είναι απαλλαγμένος από πεδία και έχει μήκος περίπου ένα μέτρο. Επειδή όλα τα ιόντα έχουν την ίδια κινητική ενέργεια τη στιγμή που εισέρχονται στον σωλήνα, οι ταχύτητές τους στο σωλήνα πρέπει να είναι αντιστρόφως ανάλογες των μαζών τους. Τα ελαφρύτερα σωματίδια φτάνουν στον ανιχνευτή πριν από τα βαρύτερα, με ένα τυπικό χρόνο «πτήσης» σωματιδίου να κυμαίνεται από 1-30 μ s. Ο αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης ιόντων προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους υπόλοιπους, κυρίως ως προς τη σταθερότητα, απλότητα, ευκολία προσέγγισης της πηγής ιόντων και το σχεδόν απεριόριστο εύρος μαζών. Παλαιότερα συστήματα δεν εξασφάλιζαν ικανοποιητική

διακριτική ικανότητα, ενώ σήμερα η πρόδος της τεχνολογίας επιτρέπει υψηλή διακριτική ικανότητα ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών.



Σχήμα 5.14. Σχηματικό διάγραμμα διαδικασία διαχωρισμού ιόντων (πάνω), σύστημα φασματομετρίας μαζών χρόνου πτήσης ιόντων (Agilent 6200) (κάτω).

6. Επικύρωση Μεθόδου

Η αξιοπιστία και καταλληλότητα μιας μεθόδου για το σκοπό που προορίζεται εξασφαλίζεται μέσω της διαδικασίας της επικύρωσης. Η πλήρης επικύρωση μιας μεθόδου γίνεται αξιολογώντας την ορθότητα, πιστότητα, αβεβαιότητα, ευαισθησία, ανθεκτικότητα και εξειδίκευσή της.

6.1. Ορθότητα – Πιστότητα

Η ορθότητα αναφέρεται στη διαφορά της μέσης τιμής $\bar{x} - \mu$ (σφάλμα), μεταξύ της μέσης τιμής x μιας σειράς μετρήσεων και της αληθούς τιμής μ της μετρούμενης ποσότητας. Η ορθότητα εκφράζεται ως:

$$\frac{100 * (\bar{x} - \mu)}{\mu}$$

Η ανάκτηση υπολογίζεται από τον λόγο των τιμών των συγκεντρώσεων που μετρήθηκαν κατά τον προσδιορισμό σε εμβολιασμένα δείγματα (προσθήκη γνωστής ποσότητας του αναλυτή σε δείγματα μάρτυρα) και των συγκεντρώσεων εμβολιασμού. Για την εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου απαιτούνται τουλάχιστον πέντε επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο^{54,55}.

Η πιστότητα εκφράζει τη συμφωνία μεταξύ των επαναλαμβανόμενων αποτελεσμάτων της μεθόδου και αποτελεί μέτρο της διασποράς μιας σειράς μετρήσεων είτε μεταξύ δυο μετρήσεων ή μέσα στην ίδια σειρά μετρήσεων. Ως μέτρο της επαναληψιμότητας χρησιμοποιείται η σχετική τυπική απόκλιση (relative standard deviation, SDr) η οποία δίνεται από τον τύπο⁵⁶:

$$SDr(\%) = 100 * \frac{s}{\bar{x}}$$

Όπου s είναι η τυπική απόκλιση των μετρήσεων και ο \bar{x} μέσος όρος των μετρήσεων.

Η πιστότητα μιας μεθόδου εκτιμάται μελετώντας την ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα, η οποία αποτελεί το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και ίδια μέρα.

6.2. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα πρέπει να ελέγχεται σε όλο το εύρος της περιοχής μια αναλυτικής μεθόδου. Η γραμμικότητα αποδεικνύεται με την εξέταση του διαγράμματος της απόκρισης του ανιχνευτή ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του αναλύτη. Από το διάγραμμα αυτό υπολογίζεται η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης (regression line) με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (least square method). Η κατασκευή του διαγράμματος πραγματοποιείται με μια σειρά εγχύσεων προτύπων σε υπόστρωμα σε διάφορες συγκεντρώσεις, ανάλογα με το εύρος της μεθόδου. Οι καμπύλες παλινδρόμησης χρησιμοποιούνται για τον υπολογισμό της άγνωστης συγκέντρωσης C_{pred} ενός αναλύτη σε ένα δείγμα στο οποίο παρουσιάζεται κορυφή με επιφάνεια y_{obs} . Η συγκέντρωση C_{pred} υπολογίζεται από τον τύπο:

$$C_{pred} = (y_{obs} - a) / b$$

Ο υπολογισμός της αβεβαιότητας (**Su**) προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης υπολογίζεται από τον τύπο:

$$S_u = \frac{S_{Area/C}}{b}$$

Όπου $S_{Area/C} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n-2}}$, n είναι ο αριθμός των σημείων της γραμμής παλινδρόμησης, $(y_i - \bar{y})$ είναι το y -υπόλειμμα το οποίο αντιστοιχεί στο i^{th} σημείο και b η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης⁵⁶.

Η συνεισφορά της αβεβαιότητας τη καμπύλης βαθμονόμησης στην συνολική αβεβαιότητα της μεθόδου υπολογίζεται για το μεσαίο σημείο της καμπύλης για κάθε αναλύτη ξεχωριστά.

6.3. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίζεται ως το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα, με αποδεκτή δηλαδή ορθότητα και πιστότητα. Η παράμετρος η οποία ελέγχθηκε είναι το σήμα / θόρυβος (S/N). Στο LOQ πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10^{54,55}$.

6.4. Διεργαστηριακές Εξετάσεις Ελέγχου Ικανότητας

Οι εργαστηριακές εξετάσεις ελέγχου ικανότητας είναι από τους καλύτερους τρόπους για ένα αναλυτικό εργαστήριο να ελέγξει την απόδοση του. Ουσιαστικά οι εργαστηριακές αυτές ασκήσεις αξιολογούν την ικανότητα ενός εργαστηρίου μέσα σε μια ομάδα εργαστηρίων που συμμετέχουν, μέσω στατιστικής εκτίμησης των στοιχείων που προκύπτουν από την ανάλυση διαμνηυμένων υλικών. Τα αποτελέσματα της διεργαστηριακής δοκιμής κάθε δείγματος αποστέλλονται από τα συμμετέχοντα εργαστήρια στο φορέα που οργανώνει και συντονίζει τις διεργαστηριακές δοκιμές σε ειδικές φόρμες. Ακολουθεί η στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση της επίδοσης των εργαστηρίων από το φορέα. Για τη σύγκριση των αποτελεσμάτων κάθε αναλύτη προσδιορίζεται μια «εκτιμήτρια τιμή», η οποία συνοδεύεται από την αντίστοιχη αβεβαιότητα. Η «εκτιμήτρια τιμή» είναι ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων των συμμετεχόντων εργαστηρίων σε κάθε κύκλο της διεργαστηριακής εξέτασης, απορρίπτοντας τα αποτελέσματα που διαφέρουν σημαντικά από τα υπόλοιπα. Τα εργαστήρια αξιολογούνται με βάση την απόκλισή τους από την εκτιμήτρια τιμή και υπολογίζεται ο βαθμός επίδοσης εργαστηρίου με βάση τα παρακάτω στατιστικά εργαλεία:

1. Αξιολόγηση του υλικού ελέγχου για ικανοποιητική ομοιογένεια με εκτίμηση της διακύμανσης της δειγματοληψίας για τυχαία δείγματα και της διακύμανσης της ανάλυσης των τυχαίων δειγμάτων από τον διοργανωτή.

2. Εκτίμηση της απόκλισης σ .
3. Εκτίμηση των απόμακρων τιμών
4. Υπολογισμός των βαθμών (z-scores)

Το πηλίκο της απόκλισης μιας τιμής προς την τυπική απόκλιση ονομάζεται μετατροπή σε τυπικές τιμές ή βαθμούς (z-scores) και υπολογίζονται από τον τύπο:

$$z = \frac{(x - \bar{x})}{\sigma}$$

Όπου x η τιμή το αποτέλεσμα του εκάστοτε εργαστηρίου, \bar{x} ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων του συνόλου των εργαστηρίων και σ η τυπική απόκλιση αυτών. Οι τυπικές τιμές εκφράζουν την απόσταση (απόκλιση) μιας τιμής από τον μέσο όρο σε τυπικές αποκλίσεις (και όχι στην αρχική μονάδα μέτρησης). Η τιμή $z=0$ είναι η βέλτιστη τιμή.

Τα εργαστήρια που είναι σε θέση να ανιχνεύσουν ένα επαρκώς υψηλό ποσοστό αναλυτών στο δείγμα (τουλάχιστον 90%), δεν αναφέρουν λανθασμένους θετικά αποτελέσματα και είναι σε θέση να αναλύουν όλους τους υποχρεωτικούς αναλύτες του πεδίου της δοκιμής κατατάσσονται στην κατηγορία Α. Τα υπόλοιπα κατατάσσονται στην Κατηγορία Β. Ο παραπάνω τρόπος αξιολόγησης αφορά εργαστήρια ελέγχου υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.Ελεγχοι Καταλληλότητας Αναλυτικών Συστημάτων

Πριν από την διεξαγωγή οιασδήποτε ανάλυσης είναι απαραίτητο να πιστοποιηθεί η ορθή και αξιόπιστη λειτουργία του αναλυτικού εξοπλισμού, η οποία εξασφαλίζεται με τη διενέργεια ορισμένων –ανάλογα με το σύστημα- παρακάτω σταδίων ελέγχου:

1. Παρακολούθηση παραμέτρων Διαλυμάτων Ελέγχου Ποιότητας
2. Παρακολούθηση της ευαισθησίας
3. Συντονισμός και βαθμονόμηση συστημάτων φασματογράφων μάζας
4. Παρακολούθηση της ακρίβεια μάζας (αφορά μόνο συστήματα TOF)

1.1. Παρακολούθηση παραμέτρων Διαλυμάτων Ελέγχου Ποιότητας

Η δημιουργία ενός διαγράμματος μέσης τιμής έχει σκοπό την εδραίωση ενός ελεγκτικού μηχανισμού για τη διαπίστωση ότι ο αναλυτικός εξοπλισμός, όπως οι χρωματογράφοι, είναι «υπό στατιστικό έλεγχο», δηλαδή η ακρίβεια και η αξιοπιστία τους να βρίσκεται εντός των επιθυμητών ορίων. Με τον τρόπο αυτό ελέγχεται ο αναλυτικός εξοπλισμός ως σύνολο.

Για την δημιουργία ενός διαγράμματος μέσης τιμής απαιτείται ένα κατάλληλο διάλυμα ελέγχου ποιότητας (ΔΕΠ), το οποίο διαφέρει ανάλογα με το χρωματογραφικό σύστημα. Τα ΔΕΠ που χρησιμοποιήθηκαν για τον έλεγχο καταλληλότητας των συστημάτων που χρησιμοποιήθηκαν είναι:

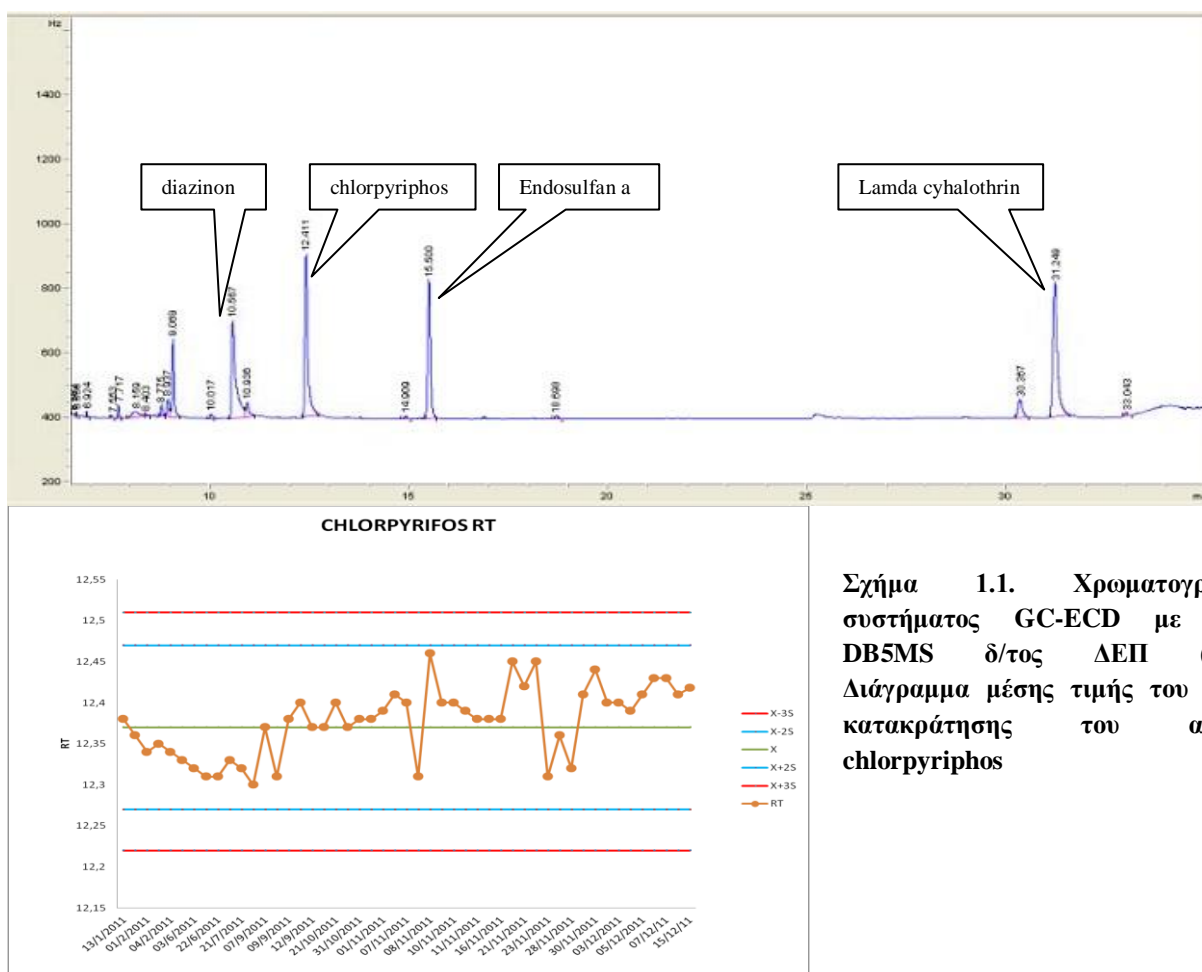
1. GC-ECD, GC-NPD, GC-MSMS: Πρότυπο δ/μα συγκέντρωσης 10 µg/mL των αναλυτών diazinon, chlorpyrifos, endosulfan a και lamda cyhalothrin.
2. LC-MSMS: Πρότυπο δ/μα συγκέντρωσης 10 µg/mL των αναλυτών oxamyl, diazinon, tebuconazole, etoxazole.
3. LC-TOF: Πρότυπο δ/μα συγκέντρωσης 10 µg/mL του αναλύτη atrazine.

Η επιλογή των αναλυτών των ΔΕΠ έγινε με τρόπο ώστε να έχουν διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες που καλύπτουν τους αναλύτες του πεδίου εκάστης μεθόδου και να εκλούνται σε διαφορετικά σημεία καθ' όλη τη διάρκεια του χρωματογραφικού προγράμματος.

Για τη δημιουργία ενός διαγράμματος μέσης τιμής είναι απαραίτητη η πραγματοποίηση τουλάχιστον 15 ανεξάρτητων εγχύσεων του ΔΕΠ και ο υπολογισμός της μέσης τιμής (\bar{x}) και της τυπικής απόκλισης (s). Στην συνέχεια ορίζονται τα παρακάτω όρια:

1. όριο ελέγχου: τιμές που αντιστοιχούν στην περιοχή $\bar{x} \pm 3 s$ (επίπεδο εμπιστοσύνης 95%)
2. όριο προειδοποίησης: τιμές που αντιστοιχούν στην περιοχή $\bar{x} \pm 2 s$ (επίπεδο εμπιστοσύνης 95%)

Οι παράμετροι που ελέγχονται είναι ο χρόνος κατακράτησης και η αναλογία ιόντων (στο TOF) ή μεταπτώσεων (στο MS-MS). Από τα διαγράμματα ελέγχεται εάν τα αποτελέσματα είναι εντός των ορίων, γεγονός που πιστοποιεί την καλή κατάσταση του συστήματος για την πραγματοποίηση των αναλύσεων. Η διαδικασία αυτή εφαρμόζεται σε όλα τα χρωματογραφικά συστήματα. Στα συστήματα GC-ECD και GC-NPD παρακολουθείται μόνο ο χρόνος κατακράτησης. Στα παρακάτω σχήματα παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα ΔΕΠ σε σύστημα GC-ECD και το αντίστοιχο διάγραμμα μέσης τιμής του χρόνου κατακράτησης του αναλύτη chlorpyrifos.



Σχήμα 1.1. Χρωματογράφημα συστήματος GC-ECD με στήλη DB5MS δ/τος ΔΕΠ (πάνω), Διάγραμμα μέσης τιμής του χρόνου κατακράτησης του αναλύτη chlorpyrifos

Για μια αξιόπιστη ποσοτικοποίηση πρέπει το σήμα προς θόρυβο (S/N) της χρωματογραφικής κορυφής να είναι μεγαλύτερο ή ίσο του 10. Η παράμετρος αυτή καταγράφεται για κάθε αναλύτη και για κάθε ιόν. Όταν πληρείται η παραπάνω προϋπόθεση ακολουθεί η διενέργεια των αναλύσεων.

1.3. Συντονισμός συστημάτων φασματογράφων μάζας (tuning)

Η επίτευξη υψηλής ποιότητας φάσματος μάζων προϋποθέτει τη βελτιστοποίηση της ευαισθησίας και της αποδεκτής ακρίβειας του αναλυτή μάζων. Οι παράμετροι που ρυθμίζονται με τη διαδικασία αυτή σχετίζονται με τη μεταφορά, διαχωρισμό και ανίχνευση των ιόντων. Τα μέρη του φασματομέτρου που επηρεάζονται είναι ο αποκορυφωτής (nebulizer), το οκτάπολο, οι ηλεκτροστατικοί φακοί (lens), ο αναλυτής μάζων (mass analyzer) -τετραπολικός ή χρόνου πτήσης- και ο ηλεκτροπολλαπλασιαστής (electron multiplier). Η διαδικασία πραγματοποιείται με την απευθείας εισαγωγή στην πηγή ιονισμού -μέσω ενός τριχοειδούς σωλήνα με σταθερή ροή- ενός διαλύματος ιόντων των οποίων οι ακριβείς μάζες (και οι χρόνοι πτήσης) είναι γνωστές. Στον **Πίνακα 1.1** παρουσιάζονται οι ακριβείς μάζες και χρόνοι πτήσης ενός δ/τος κατάλληλου για συντονισμό και βαθμονόμηση.

m/z	Χρόνοι πτήσης (μs)
118.0863	20.79841
322.0481	33.53829
622.029	46.12659
922.0098	55.88826
1521.971	71.45158
2121.933	84.14302
2721.895	95.13425

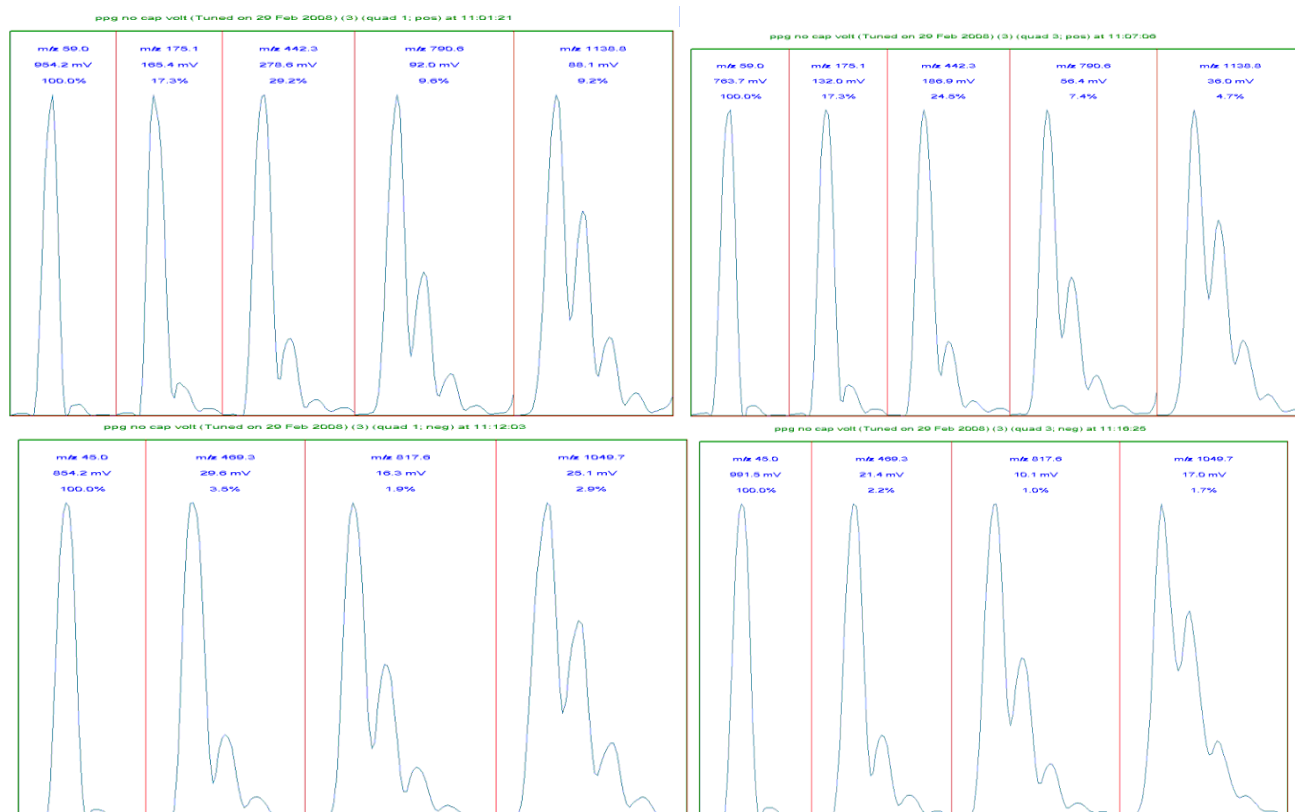
Πίνακας 1.1. Ακριβείς μάζες και χρόνοι πτήσεων ιόντος δ/τος βαθμονόμησης και συντονισμού συστημάτων Agilent 6410 LC-ESI-MSMS και Agilent 6200 LC-ESI-TOF (Η ακρίβεια των τεσσάρων δεκαδικών των μάζων και οι χρόνοι πτήσεις είναι στοιχεία που αξιοποιούνται από το LC-TOF)

Τα διαλύματα αυτά ποικίλουν ανάλογα με το σύστημα (GC-MS/MS, LC-MS/MS, LC-TOF), τον κατασκευαστή, τον τρόπο ιονισμού (ESI⁺ ή ESI⁻) και από το

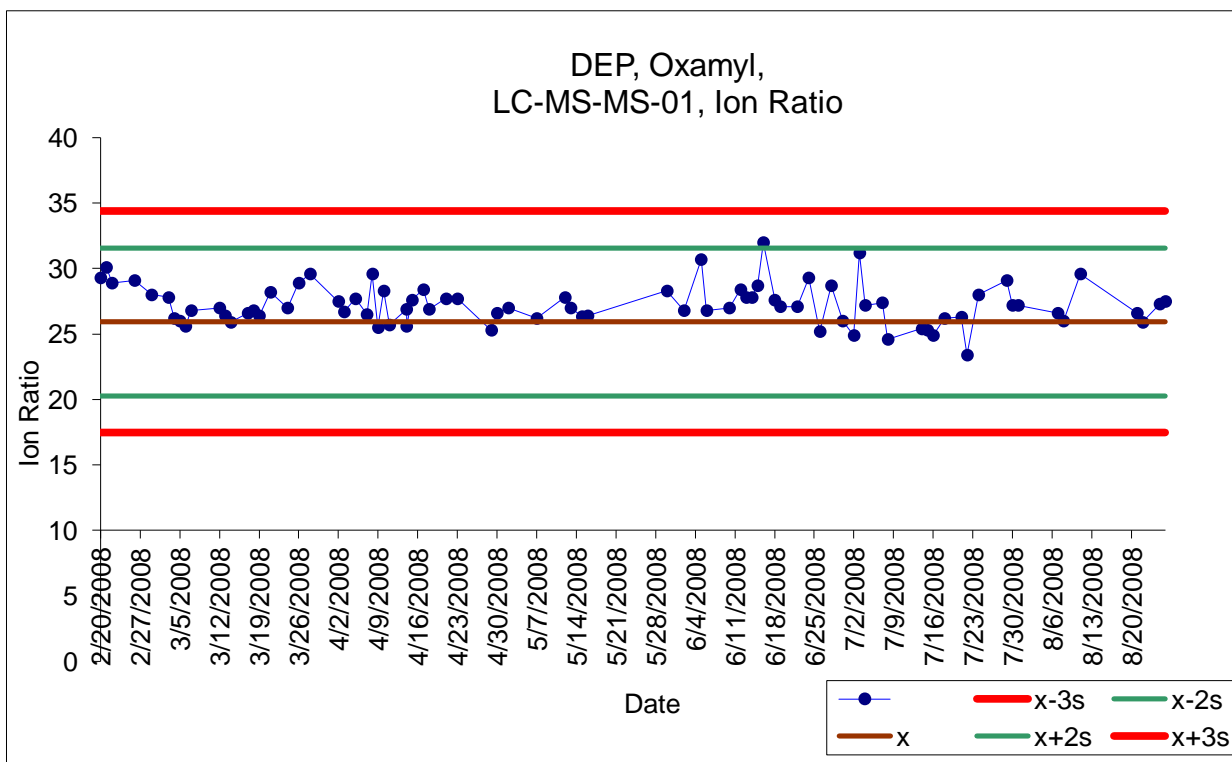
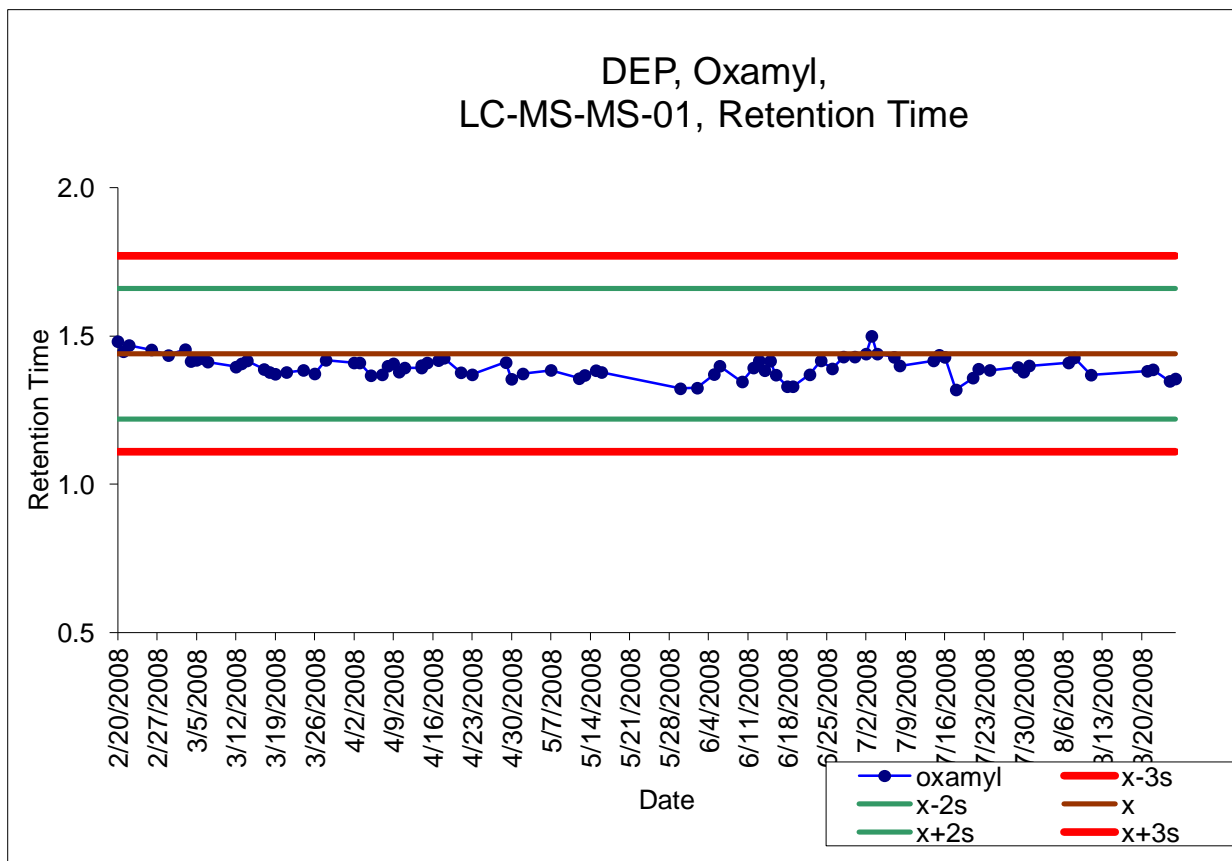
επιθυμητό εύρος μαζών. Η ρύθμιση των παραμέτρων πραγματοποιείται στα παρακάτω τρία μέρη του φασματομέτρου:

- α) οπτικά μέρη (τριχοειδής σωλήνας, αποκορυφωτής, φακοί),
- β) αναλυτής μάζας, και
- γ) συλλέκτης ιόντων (ηλεκτροπολλαπλασιαστής).

Αρχικά, χρησιμοποιώντας τα ιόντα αυτά οι τάσεις στα οπτικά μέρη του συστήματος ρυθμίζονται ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη μεταφορά ιόντων σε όλο το εύρος των μαζών. Στη συνέχεια, για τους τετραπολικούς αναλυτές το εύρος ζώνης των ιόντων ρυθμίζεται σε μια προκαθορισμένη τιμή με την μεταβολή των δυναμικών AC και DC για να επιτευχθεί μια ικανοποιητική ακρίβεια. Ομοίως και για τους αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης ιόντων, για τους οποίους το εύρος της ζώνης των ιόντων ρυθμίζεται λαμβάνοντας υπόψη τις προκαθορισμένες τιμές των χρόνων πτήσης των ιόντων του δ/τος. Τέλος, το δυναμικό στον συλλέκτη ιόντων ρυθμίζεται ώστε να επιτυγχάνεται η βέλτιστη ένταση σήματος. Ο άξονας μαζών βαθμονομείται χρησιμοποιώντας τα ιόντα 118 και 2121 ώστε τα συστήματα να ρυθμιστούν για μετρήσεις ιόντων εντός αυτού του εύρους μαζών.



Σχημα 1.2. Αποτελέσματα συντονισμού και βαθμονόμησης συστήματος LC-MSMS Varian 1200L στο 1^ο (αριστερά) και 3^ο τετράπολο (δεξιά) σε θετικό (πάνω) και αρνητικό (κάτω) ιονισμό



Σχήμα 1.3. Διαγράμματα μέσης τιμής του χρόνου κατακράτησης (πάνω) και της αναλογίας μεταπτώσεων (κάτω) για τον αναλύτη oxamyl σε σύστημα LC-MSMS.

1.4. Παρακολούθηση της ακρίβεια μάζας

Η βαθμονόμηση και ο συντονισμός δεν είναι από μόνα τους επαρκή κριτήρια για την επιθυμητή ακρίβεια μάζας σε ένα σύστημα υψηλής διακριτικής ικανότητας όπως το LC-TOF, καθώς μια ελάχιστη διακύμανση στην εφαρμοζόμενη ενέργεια των ιόντων μπορεί να προκαλέσει μεγάλη διολίσθηση στην υπολογιζόμενη μάζα. Για το λόγο αυτό ένα **διάλυμα αναφοράς** το οποίο περιέχει ιόντα γνωστής μάζας εισάγεται συνήθως με έναν δεύτερο εκνεφωτή μαζί με το δείγμα καθ' όλη την διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης. Με τον τρόπο αυτό το σύστημα ρυθμίζει αυτόματα τυχόν αποκλίσεις πέραν των επιτρεπτών ορίων. Οι μάζες που χρησιμοποιούνται είναι των $C_5H_5N_4$ (121.050873) και $C_{18}H_{19}O_6N_3P_3F_{24}$ (922.009798). Επιπλέον η παράμετρος της ακρίβειας μάζας παρακολουθείται μέσω του διαγράμματος μέσης τιμής. Σύμφωνα με τις απαιτήσεις της E.E. το όριο των 5ppm θεωρείται ως ικανοποιητική ακρίβεια μάζας⁵⁵.

2. Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS τον προσδιορισμό είκοσι πέντε φυτοπροστατευτικών ουσιών σε παιδικές τροφές με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας

2.1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην ασφάλεια των τροφών που προορίζονται για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας, τα οποία λόγω συνεχούς ανάπτυξης, σωματικά και φυσιολογικά, έχουν διαφορετικό μεταβολισμό σε σύγκριση με τους ενήλικες⁵⁷. Η διατροφή είναι μια από τις σημαντικότερες πηγές λήψης φυτοπροστατευτικών προϊόντων, αφού υπολείμματα αυτών και προϊόντα μεταβολισμού τους απαντώνται πάνω ή μέσα στις τροφές με τη μορφή υπολειμμάτων. Τα επίπεδά τους στις τροφές αντανακλούν την ποσότητα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που εφαρμόστηκαν στην καλλιέργεια, το χρόνο που μεσολάβησε από την τελευταία εφαρμογή μέχρι τη συγκομιδή καθώς και το ρυθμό διάσπασης και μεταβολισμού τους στο φυτό ή το περιβάλλον⁵⁷. Για να διασφαλιστεί η ασφάλεια των τροφίμων που προορίζονται για βρέφη (ηλικίας κάτω των 12 μηνών) και παιδιών μικρής ηλικίας (μεταξύ 1 – 3 ετών) η Ευρωπαϊκή Επιτροπή έχει θεσπίσει ειδικούς κανονισμούς για αυτό το είδος των τροφών⁵⁸. Σχετικά με τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα η ΕΕ έχει θεσπίσει ως Μέγιστο όριο υπολειμμάτων (MRL) τα 10 µg /kg συγκέντρωσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων στις παιδικές τροφές και καθιέρωσε την απαγόρευση της χρήσης άκρως τοξικών μορίων ($ADI \leq 0.5\text{mg/kg}$ σωματικού βάρους) για την παραγωγή των γεωργικών προϊόντων που προορίζονται για παρασκευή παιδικών τροφών (παιδικών γευμάτων και παιδικών τροφών βασισμένων στα δημητριακά). Για τα υψηλής τοξικότητας μόρια αυτά έχουν θεσπιστεί αυστηρότερα όρια της τάξης των 3 -8 µg/kg⁵⁹. Λαμβάνοντας υπόψη τα χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων που πρέπει να επιτύχουμε για την αποτελεσματική παρακολούθηση των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στις παιδικές τροφές, είναι αναγκαία η ανάπτυξη-χρησιμοποίηση ευαίσθητων και αξιόπιστων μεθόδων ανάλυσης.

Η εκχύλιση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων πραγματοποιείται μέσω ποικίλων τεχνικών όπως η εκχύλιση με υπερκρίσιμα ρευστά (SFE)⁶⁰ σε συνδυασμό με υγρή-υγρή εκχύλιση με κύριο διαλύτη εκχύλισης την ακετόνη^{61,62}, που έχει

εφαρμοστεί επιτυχώς για την απομόνωση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων από δημητριακά και αλεύρι, πρώτες ύλες που αποτελούν το κύριο συστατικό των παιδικών τροφών με βάση τα δημητριακά. Το ακετονιτρίλιο έχει ευρεία εφαρμογή ως διαλύτης εκχύλισης σε υποστρώματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό και υψηλή σε λιπαρά (σιτάρι, ρύζι, αλεύρι βρώμη κ.α.). Ο Schenck et al⁶³ για τον προσδιορισμό τριαντατριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε σιτάρι χρησιμοποίησε ως διαλύτη εκχύλισης μίγμα 65:45 ακετονιτρίλιο:νερό σε συνδυασμό με NaCl και MgSO₄ και ως τεχνική καθαρισμού την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) με ενεργό άνθρακα. Ο Wang et al⁶⁴ χρησιμοποίησε μίγμα ακετονιτρίλιου και εξανίου σε συνδυασμό με εκχύλιση στερεάς φάσης για την απομόνωση δεκατριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε παιδικές φόρμουλες με κύριο συστατικό την σόγια. Στην προσπάθεια δημιουργίας μιας οικονομικότερης τεχνικής και με χρησιμοποίηση λιγότερων υλικών, οι Lehotay, Anastasiades et al. χρησιμοποίησαν μόνο ακετονιτρίλιο ως διαλύτη στην εκχύλιση και στο στάδιο καθαρισμού με εκχύλιση διασποράς προσροφητικού υλικού. Η μέθοδος αυτή ονομάστηκε με το ακρωνύμιο QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Robust, Safe)^{65,66,67}. Η εν λόγω τεχνική απομόνωσης υιοθετήθηκε από τον Walorczyk⁶⁸ ο οποίος τη χρησιμοποίησε για τον προσδιορισμό εκατόν είκοσι δύο φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δημητριακά και ζωοτροφές με χρήση της αέριας χρωματογραφίας. Οι Payá et al⁶⁹ προχώρησαν σε επικύρωση της μεθόδου για τριάντα οκτώ φυτοπροστατευτικά προϊόντα με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (GC-MS/MS) και για σαράντα δυο με την χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS).

Τα τελευταία χρόνια σύγχρονες τεχνικές, όπως η αέρια και υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών (GC-MS, LC-MS), υβριδικών συστημάτων φασματομετρίας μαζών (GC-MS/MS, LC-MS/MS) ή η φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (TOF, Orbitrap), χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε παιδικές τροφές. Οι τεχνικές αυτές, παρότι παρέχουν υψηλή ευαισθησία και εξαιρετική δυνατότητα ταυτοποίησης και ποσοτικοποίησης αναλυτών σε πολύπλοκα υποστρώματα, είναι δαπανηρές διότι απαιτούν πανάκριβο και πολύπλοκο στην χρήση εξοπλισμό. Η κατοχή τέτοιου αναλυτικού εξοπλισμού αυξάνει το κόστος του πάγιου εξοπλισμού ενός εργαστηρίου και συνεπώς το κόστος της ανάλυσης. Η ανάγκη για μεθόδους απλές, εύκολες, χαμηλού κόστους, ευαίσθητες και κατάλληλες για

αναλύσεις ρουτίνας είναι έντονη. Επιπρόσθετα, οι παραπάνω μέθοδοι θα πρέπει να καλύπτουν τις νομοθετικές απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Ένωσης σχετικά με τα κριτήρια επικύρωσης τα οποία εξασφαλίζουν την αξιοπιστία και την συγκρισιμότητα των αποτελεσμάτων των αναλύσεων⁵⁴.

Ένας από τους στόχους της διατριβής ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας εύκολης και οικονομικής πολυπολειμματικής μεθόδου προσδιορισμού είκοσι έξι αναλυτών υψηλής τοξικότητας (όπως χαρακτηρίζονται από την σχετική νομοθεσία που αφορά τις παιδικές τροφές)⁵⁹ σε παιδικές τροφές με βάση τα δημητριακά με τη χρήση αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) και αζώτου φωσφόρου (NPD).

2.2. Υλικά και Αντιδραστήρια

1. Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
2. Ακετόνη, καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
3. Τολουόλιο, καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
4. 2,2,4 Τριμέθυλοπεντάνιο καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
5. Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (Fluka).
6. Χλωριούχο νάτριο (ACS reagent grade ≥ 99.0 %).
7. Διένυδροδρο κιτρικό νάτριο (Sigma-Aldrich).
8. Τετραένυδρο όξινο κιτρικό νάτριο (Fluka).
9. Μυρμηκικό Αμμώνιο (Fluka).
10. Φιάλες φυγοκέντρου των 50mL από teflon και με βιδωτό πώμα.
11. Φιάλες φυγοκέντρου των 15mL από polypropylene και με βιδωτό πώμα.
12. Γυάλινα φιαλίδια των 8 mL με πώμα από teflon (PTFE).
13. Ήλιο (He), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
14. Άζωτο (N₂), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
15. Συνθετικός αέρας, ελεύθερος υδρογονανθράκων.
16. Υδρογόνο (H₂), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
17. 26 πρότυποι αναλύτες αναφοράς, γνωστής καθαρότητας (Dr Ehrenstorfer Laboratories GmbH Germany): aldrin, cadusafos, demeton-s-methyl, demeton-s-methyl sulfone, demeton-s-methyl sulfoxide, dieldrin, dimethoate, disulfoton, disulfoton-sulfone, disulfoton-sulfoxide, ethoprophos, fensulfothion, fensulfothion sulfone, fensulfothion-oxon, fensulfothion-oxon-sulfone, terbufos, terbufos-sulfone,

terbufos-sulfoxide, fipronil, fipronil-desulfinyl, heptachlor, heptachlorepoxyd (trans), hexachlorobenzene, nitrofen, omethoate. Οι αναλύτες αυτοί λόγω τις υψηλής τοξικότητας τους ($ADI \leq 0.5\text{mg/kg}$ σωματικού βάρους) αναφέρονται στους Κανονισμούς 2006/125/EC και 2006/141/ EC ως ουσίες των οποίων τα Ανώτατα Επιτρεπτά Όρια στις παιδικές τροφές οφείλουν να είναι κατά πολύ χαμηλότερα από υπόλοιπα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (επίπεδα συγκέντρωσης 3- 6mg/Kg).

2.3. Εξοπλισμός

1. Φυγόκεντρος με δυνατότητα 4000 στροφών / min.
2. Συσκευή υπερήχων
3. Αναδευτήρας Vortex mixer (K-550-GE, Scientific industries inc. Bohemia).
4. Αεριοχρωματογράφος τριχοειδών στηλών με 2 εγχυτές τύπου splitless, ανιχνευτές ECD και NPD και κατάλληλο σύστημα επεξεργασίας αποτελεσμάτων (Chemstation).
5. Τριχοειδείς στήλες, 30m, 0,32 mm και πάχους υμένα 0,25 μm των παρακάτω τύπων: α) DB-5MS, β) DB-17.

2.4. Παρασκευή Προτύπων Διαλυμάτων παρακαταθήκης

Τα πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης των 1000 $\mu\text{g/mL}$ παρασκευάστηκαν σε ακετόνη. Φυλάχθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια με πόμα από Teflon και αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η ζύγιση της στερεάς δραστικής ουσίας για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών, ενώ ελήφθη υπόψη και η καθαρότητα τους. Ένα διάλυμα εργασίας στο οποίο εμπεριέχονται όλες οι παραπάνω ουσίες παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 1 $\mu\text{g/mL}$ σε μεθανόλη.

2.5. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας

Τα διαλύματα εργασίας που εμπεριέχουν όλα τα παραπάνω μόρια παρασκευάστηκαν από τα πρότυπα δ/τα παρακαταθήκης τους σε μίγμα 2,2,4 τριμέθυλοπεντάνιου/τολουόλιου (90:10) σε διάφορες συγκεντρώσεις με εύρος 1 – 10 $\mu\text{g/L}$ και αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Σύμφωνα με την κατευθυντήρια οδηγία της Ε.Ε.⁵⁴ η επίδραση του υποστρώματος είναι ένα φαινόμενο που πρέπει να εκτιμάται κατά τη διαδικασία επικύρωσης μιας μεθόδου. Το φαινόμενο αυτού στην αέρια χρωματογραφία ενδέχεται να είναι αποτέλεσμα πολλών διαφορετικών παραμέτρων (π.χ. η παρουσία μιας ουσίας του υποστρώματος που συνεκκλύεται με τον υπό μελέτη αναλύτη είναι δυνατό να προκαλέσει αύξηση του σήματός του)⁷⁰. Το φαινόμενο της ενίσχυσης ενός σήματος λόγω της παρουσίας υποστρώματος είναι ένα σύνηθες φαινόμενο στην αέρια χρωματογραφία σε συνδυασμό με ανιχνευτές ECD⁵⁷ ή NPD⁵⁴. Για το λόγο αυτό για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας σε υπόστρωμα μάρτυρα παιδικής τροφής με βάση τα δημητριακά, το οποίο είχε προηγουμένως αναλυθεί και δεν περιείχε υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Τα διαλύματα εργασίας αυτά παρασκευάστηκαν με εξάτμιση μέχρι ξηρού-με ρεύμα αζώτου- 2 mL από το εκχύλισμα του μάρτυρα, στη συνέχεια προσθήκη 1 mL από το πρότυπο διάλυμα αναφοράς στην επιθυμητή συγκέντρωση και διαλυτοποίηση για 30sec σε λουτρό υπερήχων.

2.6. Μέθοδος Εκχύλισης

Η τεχνική εκχύλισης βασίστηκε στο πρωτόκολλο της μεθόδου QuEChERS για φυτικά προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα λιπαρών^{65,70}. Συγκεκριμένα, σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL ζυγίστηκαν $5 \pm 0,05$ g (m_s) προϊόντος και προστέθηκαν 10 mL νερό. Το νερό θα πρέπει να βρίσκεται σε χαμηλή θερμοκρασία ($< 4^\circ\text{C}$) για να αντισταθμίσει την ανάπτυξη θερμότητας που προκαλείται από την προσθήκη των αλάτων. Ακολούθησε ανακίνηση για 1 min σε Vortex mixer. Μετά προστέθηκαν 10 mL ακετονιτρίλιο (V_1) και το μίγμα ανακινήθηκε με το χέρι για 1 min. Τέλος, προστέθηκε μίγμα αλάτων των παρακάτω συστατικών:

- ✓ $4 \text{ g} \pm 0.2 \text{ g}$ άνυδρο θειικό μαγνήσιο,
- ✓ $1 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ χλωριούχο νάτριο,
- ✓ $1 \text{ g} \pm 0.05 \text{ g}$ διένυδρουδρο κιτρικό νάτριο
- ✓ $0.5 \text{ g} \pm 0.03 \text{ g}$ τετραένυδρο όξινο κιτρικό νάτριο

και ακολούθησε έντονη ανακίνηση με το χέρι για 1 min.

Μετά, η φιάλη φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές/ min για 5 min. 8 mL από το υπερκείμενο αφού μεταφέρθηκε σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL τοποθετήθηκε για τουλάχιστον 2 ώρες σε καταψύκτη. Η κατάψυξη βοηθά στην

καθίζηση ορισμένων συνεκχυλισμάτων τα οποία έχουν μικρή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο, έτσι η μεγαλύτερη ποσότητα των λιπαρών ουσιών καθιζάνει. Στην συνέχεια 6 mL από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκαν σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL, η οποία περιείχε 250 mg PSA και 750 mg MgSO₄. Μετά από ανακίνηση με το χέρι για 1 min η φιάλη φυγοκεντρήθηκε, εκ νέου, στις 4000 στροφές/ min για 5 min. Από το υπερκείμενο υγρό 5 mL μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο των 8 mL και προστέθηκαν 0.05 mL διάλυμα μυρμηκικού οξέος 5%. Στην συνέχεια, όγκος 2 mL (V₂) από το τελικό εκχύλισμα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και επαναδιαλύθηκε σε 1 mL (V₃) 2,2,4 τριμεθυλοπεντάνιο-τολουόλιο (90:10). Ακολούθησε ανάδευση σε λουτρό υπερήχων για 10 sec και το έτοιμο για χρωματογραφική ανάλυση τελικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο του αυτομάτου δειγματολήπτη. Στην περίπτωση που η ανάλυση δεν πραγματοποιήθηκε άμεσα, το διάλυμα διατηρήθηκε στην κατάψυξη.

2.7. Προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία

Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση 2 συστημάτων αέριας χρωματογραφίας Agilent 6890, με το κάθε ένα να αποτελείται από τα ακόλουθα:

Σύστημα A: Δυο εγχυτές σε λειτουργία μη διαμερισμού δείγματος (splitless), μια στήλη τύπου DB-5-MS (30 m. 0.32mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με τον ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) και μια στήλη τύπου DB-17 MS (30 m. 0.3mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με τον ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD).

Σύστημα B: Δυο εγχυτές σε λειτουργία μη διαμερισμού δείγματος (splitless), μια στήλη τύπου DB-5-MS (30 m. 0.32mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με τον ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) και μια στήλη τύπου DB-17 MS (30 m. 0.3mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με τον ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τα δύο συστήματα ήταν κοινό και περιλαμβάνει: Από αρχική θερμοκρασία 70°C (παραμονή για 1 λεπτό) άνοδο στους 180°C με ρυθμό ανόδου 30 °C/ min, αύξηση στους 230 °C με ρυθμό 1,8 °C/ min, αύξηση στους 280 °C με ρυθμό 30 °C/ min και παραμονή εκεί για 30 λεπτά.

Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He) με ροή 1.5 mL/min και για τις 2 στήλες και στα 2 συστήματα. Η θερμοκρασία των εγχυτών ρυθμίστηκε στους 230 °C. Υδρογόνο (H₂) ως καύσιμο και συνθετικός αέρας (Air) χρησιμοποιήθηκαν για τον ανιχνευτή NPD. Η θερμοκρασία των ανιχνευτών ρυθμίστηκε στους 310 °C. Εγχύθηκαν 1μL από το τελικό εκχυλίσμα. Για την εύρεση των χρόνων κατακράτησης των ουσιών, διαλύματα συγκέντρωσης 0,5mg/L παρασκευάστηκαν σε 2,2,4 τριμέθυλοπεντάνιο/τολουόλιο (90:10) για κάθε έναν από τους αναλύτες ξεχωριστά και πραγματοποιήθηκαν εγχύσεις στα χρωματογραφικά συστήματα.

2.8. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η εξασφάλιση της αξιοπιστίας και της καταλληλότητας της μεθόδου για τον σκοπό που προορίζεται πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της επικύρωσης. Η πλήρης επικύρωση της μεθόδου έγινε αξιολογώντας την ορθότητα, πιστότητα, αβεβαιότητα, ευαισθησία, ανθεκτικότητα και εξειδίκευση.

2.8.1 Ταυτοποίηση

Ως κριτήριο ταυτοποίησης χρησιμοποιήθηκε ο χρόνος κατακράτησης των αναλυτών σε δυο στήλες διαφορετικής πολικότητας (DB5 / DB17) και δυο ανιχνευτές διαφορετικής εκλεκτικότητας (ECD/NPD). Η ταυτοποίηση μιας ουσίας με την χρήση αέριας χρωματογραφίας (GC) γίνεται όταν το δείγμα εμφανίσει χρωματογραφική κορυφή σε χρόνο πλησίον ($\pm 1,5\%$) του χρόνου κατακράτησης του προς ταυτοποίηση αναλύτη, σε δυο διαφορετικής πολικότητας στήλες (Στοιχεία από δυο διαφορετικής εκλεκτικότητας ανιχνευτές ενισχύουν την ταυτοποίηση).

Στον **Πίνακα 2.1** διακρίνονται οι χρόνοι κατακράτησης των υπό μελέτη αναλυτών στις στήλες DB5-MS και DB17-MS καθώς και η εκλεκτικότητά τους στους ανιχνευτές ECD και NPD.

Αναλύτες	DB-5-MS	DB-17-MS	ECD (εκλεκτικότητα)	NPD (εκλεκτικότητα)
aldrin	12.0	14.0	+	-
cadusafos	7.6	8.6	+	+
demeton-s-methyl	7.1	8.9	-	+
demeton-s-methyl sulfone	11.1	19.2	-	+
demeton-s-methyl sulfoxide	7.0	4.5	-	+
dieldrin	16.9	22.0	+	-
dimethoate	8.2	12.3	+	+
disulfoton	9.2	11.3	+	+
disulfoton-sulfone	15.7	24.1	+	+
disulfoton-sulfoxide	5.1	5.5	+	+
ethoprophos	6.9	8.3	+	+
fensulfothion	19.3	29.4	+	+
fensulfothion sulfone	20.5	30.7	+	+
fensulfothion-oxon	17.4	27.9	+	+
fensulfothion-oxon-sulfone	18.4	29.2	+	+
fipronil	14.6	16.2	+	+
fipronil-desulfinyl	10.9	11.8	+	+
heptachlor	10.8	12.5	+	-
heptachlorepoxid. trans	13.9	17.4	+	-
hexachlorobenzene	8.1	9.2	+	-
nitrofen	18.3	25.6	+	+
omethoate	6.7	9.7	-	+
terbufos	8.7	10.1	+	+
terbufos-sulfone	14.0	20.3	+	+
terbufos-sulfoxide	8.6	10.0	-	+

Πίνακας 2.1. Χρόνοι κατακράτησης των υπό μελέτη αναλυτών σε στήλη DB5-MS, DB17-MS και εκλεκτικότητα τους στους ανιχνευτές ECD και NPD.

2.8.2. Προσδιορισμός

Η περιεκτικότητα του αναλύτη στο δείγμα, σε mg/kg, υπολογίζεται, από την εξίσωση:

$$C = f \times C_I$$

όπου:

✓ C_I είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο τελικό προς έγχυση διάλυμα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με πρότυπα διαλύματα αναφοράς, και

✓ ο συντελεστής $f = V_1 V_3 / m_s V_2$ (V_1, V_2, V_3 ο όγκος των διαλυτών και m_s η μάζα του δείγματος) και είναι ίσος με την μονάδα ($f=1$).

2.8.3. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα των ανιχνευτών ελέγχθηκε σε όλο το εύρος συγκεντρώσεων μελέτης της μεθόδου. Για την κατασκευή του διαγράμματος γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε μια σειρά εγχύσεων προτύπων διαλυμάτων που περιείχαν υπόστρωμα συγκεντρώσεων: 3 – 6 – 8 – 10 – 15 – 20 – 30 και 40 $\mu\text{g/mL}$. Τα πρότυπα παρασκευάστηκαν σε υπόστρωμα παιδικών τροφών για να συνυπολογιστεί και η επίδραση του υποστρώματος στην μελέτη της γραμμικότητας. Εξετάστηκαν ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνο αυτού (r^2), η τεταγμένη επί της αρχής (a) η τυπική απόκλιση της (S_a), η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης (b), η τυπική απόκλιση της (S_b) και η αβεβαιότητα (S_u) που προκύπτει από τη χρήση της γραμμής βαθμονόμησης στις μετρήσεις και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 2.2**. Η συνεισφορά της αβεβαιότητας της καμπύλης βαθμονόμησης στη συνολική αβεβαιότητα της μεθόδου υπολογίστηκε για το μεσαίο σημείο ($C=15 \mu\text{g/L}$) της καμπύλης για κάθε αναλύτη ξεχωριστά και εκτιμήθηκε σε 3,8 – 23,5% ανάλογα με τον αναλύτη.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι για την πλειοψηφία των αναλυτών οι ανιχνευτές παρουσιάζουν καλή γραμμικότητα (πάνω από 0,98) στην υπό μελέτη περιοχή με συντελεστές συσχέτισης. Οι αναλύτες omethoate και terbufos sulfoxide δεν παρουσίασαν ικανοποιητική γραμμικότητα αφού είναι πολικοί και η αέρια χρωματογραφία δεν είναι η καταλληλότερη μέθοδος προσδιορισμού τους. Έτσι παρουσίασαν χαμηλή ευαισθησία και όχι χρωματογραφία στην υπό μελέτη περιοχή συγκεντρώσεων.

Αναλύτες	Ανιχνευτής	r	r ²	b	S _b	a	S _a	S _u
aldrin	ECD	0.998	0.996	222.78	6.05	18.32	123.43	0.92
cadusafos	NPD	0.998	0.997	11.14	0.26	3.41	5.40	0.81
demeton-s-methyl	NPD	0.980	0.961	0.54	0.04	0.77	0.91	2.80
demeton-s-methyl sulfone	NPD	0.990	0.981	1165719	73085	-1571724	1493110	2.44
demeton-s-methyl sulfoxide	NPD	0.994	0.988	2475677	126093	-4452833	2576058	1.98
dieltrin	ECD	0.998	0.995	187.75	5.24	79.51	107.05	0.95
dimethoate	ECD	0.993	0.985	10.87	0.54	26.97	11.08	1.70
	NPD	0.980	0.960	0.16	0.01	0.01	0.27	2.84
disulfoton	ECD	0.996	0.993	6.28	0.22	-2.75	4.39	1.16
disulfoton-sulfone	ECD	0.996	0.991	7.71	0.30	3.02	6.05	1.31
disulfoton-sulfoxide	ECD	0.999	0.998	4.58	0.08	3.70	1.66	0.60
	NPD	0.998	0.995	0.25	0.01	-0.11	0.14	0.97
ethoprophos	ECD	0.992	0.984	10.06	0.53	28.32	10.85	1.80
	NPD	0.984	0.969	0.26	0.02	1.64	0.50	3.14
fensulfothion	ECD	0.990	0.980	8.92	0.52	-4.94	10.71	2.00
	NPD	0.989	0.978	0.28	0.02	-0.73	0.35	2.08
fensulfothion sulfone	ECD	0.998	0.995	66.44	1.90	-4.81	38.70	0.97
	NPD	0.969	0.939	0.19	0.02	0.12	0.41	3.53
fensulfothion-oxon	ECD	0.994	0.987	5.65	0.26	8.51	5.36	1.58
fensulfothion-oxon-sulfone	ECD	0.991	0.982	5.81	0.33	11.66	6.64	1.90
fipronil	ECD	0.999	0.998	155.34	2.59	-38.92	52.88	0.57

Αναλύτες	Ανιχνευτής	r	r ²	b	S _b	a	S _a	S _u
	NPD	0.999	0.998	0.54	0.01	0.16	0.22	0.66
fipronil-desulfinyl	ECD	0.995	0.989	297.02	12.77	-615.64	260.63	1.46
heptachlor	ECD	0.996	0.991	122.25	4.73	-56.98	96.46	1.31
heptachlorepoxid. trans	ECD	0.996	0.993	168.47	5.82	19.21	118.71	1.17
hexachlorobenzene	ECD	0.997	0.994	137.51	4.33	63.42	88.32	1.07
nitrofen	ECD	0.995	0.990	132.44	5.33	7.73	108.76	1.37
omethoate	-	-	-	-	-	-	-	-
terbufos	ECD	0.997	0.994	7.37	0.24	4.32	4.80	1.08
terbufos-sulfone	ECD	0.990	0.981	25.02	1.43	57.43	29.13	1.94
	NPD	0.980	0.960	0.30	0.02	0.45	0.51	2.85
terbufos-sulfoxide	-	-	-	-	-	-	-	-

Πίνακας 2.2. Βασικές παράμετροι εκτίμησης της γραμμικότητας για τους υπό μελέτη αναλύτες

b : κλίση της γραμμής παλινδρόμησης

S_b : εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της κλίσης b της γραμμής παλινδρόμησης

a : τεταγμένη επί την αρχή της γραμμής παλινδρόμησης

S_a : εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της τεταγμένης επί την αρχή a της γραμμής παλινδρόμησης

r : συντελεστής συσχέτισης

r² : τετράγωνο συντελεστή συσχέτισης

S_u : αβεβαιότητα που προκύπτει από την γραμμή παλινδρόμησης

2.8.4. Ορθότητα – Πιστότητα

Η εκτίμηση της ορθότητας και πιστότητας στο εργαστήριο προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα μάρτυρα (παιδικές τροφές με βάση τα δημητριακά) για πέντε επαναλήψεις. Η εκτίμηση της ορθότητας πραγματοποιήθηκε με την εξέταση της ανάκτησης και η πιστότητα με εξέταση της σχετικής τυπικής απόκλισης. Στο πλαίσιο αυτό, ποσότητα $5 \pm 0,05$ g του μάρτυρα εμβολιάστηκε σε δυο επίπεδα γνωστών συγκεντρώσεων των αναλυτών με προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος εργασίας. Το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού ήταν τα 3 µg/kg (καθότι ήταν το χαμηλότερο MRL που ορίζει η Ε.Ε. στις παιδικές τροφές) και το υψηλότερο το δεκαπλάσιό του.

Η Ε.Ε⁵⁴ αναφέρει ως αποδεκτές μέσες ανακτήσεις κατά την επικύρωση όσες βρίσκονται στην περιοχή 70-120% και αποδεκτές τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης για συνθήκες ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας μικρότερες από 20%, ανάλογα με το επίπεδο συγκέντρωσης. Όταν ο στόχος αυτός δεν μπορεί να επιτευχθεί είναι δυνατόν να γίνουν αποδεκτές τιμές ανάκτησης έξω από αυτά τα όρια που όμως θα πρέπει να συνοδεύονται από ικανοποιητικά στοιχεία πιστότητας. Στον Πίνακα 2.3 φαίνονται οι μέσες ανακτήσεις και οι SDr των υπό εξέταση αναλυτών για τα δυο επίπεδα εμβολιασμού.

Αναλύτης	Ανιχνευτής: ECD				Ανιχνευτής: NPD			
	Επίπεδο Εμβολιασμού (3 µg/kg)		Επίπεδο Εμβολιασμού (30 µg/kg)		Επίπεδο Εμβολιασμού (3 µg/kg)		Επίπεδο Εμβολιασμού (30 µg/kg)	
	R (%)	SDr (%)	R (%)	SDr (%)	R (%)	SDr (%)	R (%)	SDr (%)
Aldrin	97.1	15.2	95.5	9.3	-	-	-	-
Cadusafos	113.6	3.4	101.9	6.5	108.6	6.8	101.3	10.4
Demeton-S-methyl	-	-	-	-	79.2	3.5	97.6	23.9
Demeton-S-methyl sulfone	-	-	-	-	108.3	28.0	89.3	5.4
Demeton-S-methyl sulfoxide	-	-	-	-	106.8	17.2	85.6	7.6
Dieldrin	94.8	10.0	112.4	6.8	-	-	-	-
Dimethoate	124.6	11.5	103.2	6.3	-	-	-	-
Disulfoton	102.5	7.47	68.2	17.1	104.6	11.3	87.2	12.6

Αναλύτης	Ανιχνευτής: <i>ECD</i>				Ανιχνευτής: <i>NPD</i>			
	<i>Επίπεδο Εμβολιασμού (3 µg/kg)</i>		<i>Επίπεδο Εμβολιασμού (30 µg/kg)</i>		<i>Επίπεδο Εμβολιασμού (3 µg/kg)</i>		<i>Επίπεδο Εμβολιασμού (30 µg/kg)</i>	
	R (%)	SDr (%)	R (%)	SDr (%)	R (%)	SDr (%)	R (%)	SDr (%)
Disulfoton-sulfone	110.4	7.2	89.6	3.7	95.2	16.0	80.4	11.4
Disulfoton-sulfoxide	98.9	12.2	111.5	4.9	100.3	7.83	106.4	4.7
Ethoprophos	97.6	6.45	80.7	13.9	91.1	8.8	93.3	12.2
Fensulfothion	95.6	7.55	97.6	3.7	118.2	13.6	86.8	13.0
Fensulfothion sulfone	-	-	-	-	95.8	10.1	78.3	7.6
Fensulfothion-oxon	-	-	112.8	8.7	-	-	76.2	9.7
Fensulfothion-oxon-sulfone	96.4	11.7	118.1	4.6	-	-	-	-
Fipronil	93.4	7.59	113.5	14	-	-	-	-
Fipronil-desulfinyl	118.8	10.7	87.0	3.3	-	-	-	-
Heptachlor	103.5	14.3	100.4	9.6	-	-	-	-
Heptachlorepoxid. trans	106.8	10.9	108.3	7.2	-	-	-	-
Hexachlorobenzene	104.2	16.1	87.0	10.7	-	-	-	-
Nitrofen	111.0	6.9	99.6	15.4	-	-	-	-
Omethoate	-	-	-	-	-	-	-	-
Terbufos	97.4	7.52	99.9	10.4	88.2	5.7	107.6	13.72
Terbufos-sulfone	110.9	13.7	113.7	9.3	-	-	-	-
Terbufos-sulfoxide	-	-	-	-	-	-	90.0	11.3

Πίνακας 2.3. Μέσες (N=5) Ανακτήσεις (R%) και SDr των υπό μελέτη αναλυτών για 2 επίπεδα συγκεντρώσεων και σε 2 διαφορετικούς ανιχνευτές

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι οι μέσες ανακτήσεις για τα 3 µg/kg κυμάνθηκαν σε επίπεδα 79,2-124,6% με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες του 17,2% για τους περισσότερους αναλύτες. Για τα 30 µg/kg οι ανακτήσεις ήταν 68,2-118,1% με τιμές σχετικής

τυπικής απόκλισης μικρότερες του 23,9%. Από τα αποτελέσματα δηλαδή προκύπτει ότι η μέθοδος παρουσιάζει αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα για την πλειοψηφία των αναλυτών.

Για τους αναλύτες dimethoate, fensulfothion sulfone, fensulfothion-oxon-sulfone και terbufos-sulfone, παρότι ο προσδιορισμός τους είναι εφικτός και στους δύο ανιχνευτές (ECD και NPD), τα επίπεδα των ανακλήσεων ήταν ικανοποιητικά μόνο στον έναν. Έτσι η ποσοτικοποίηση τους πραγματοποιήθηκε στον ανιχνευτή που παρουσιάζει ικανοποιητικές ανακλήσεις. Για παράδειγμα, η ταυτοποίηση του αναλύτη fensulfothion sulfone μπορεί να πραγματοποιηθεί με τους ακόλουθους τρόπους:

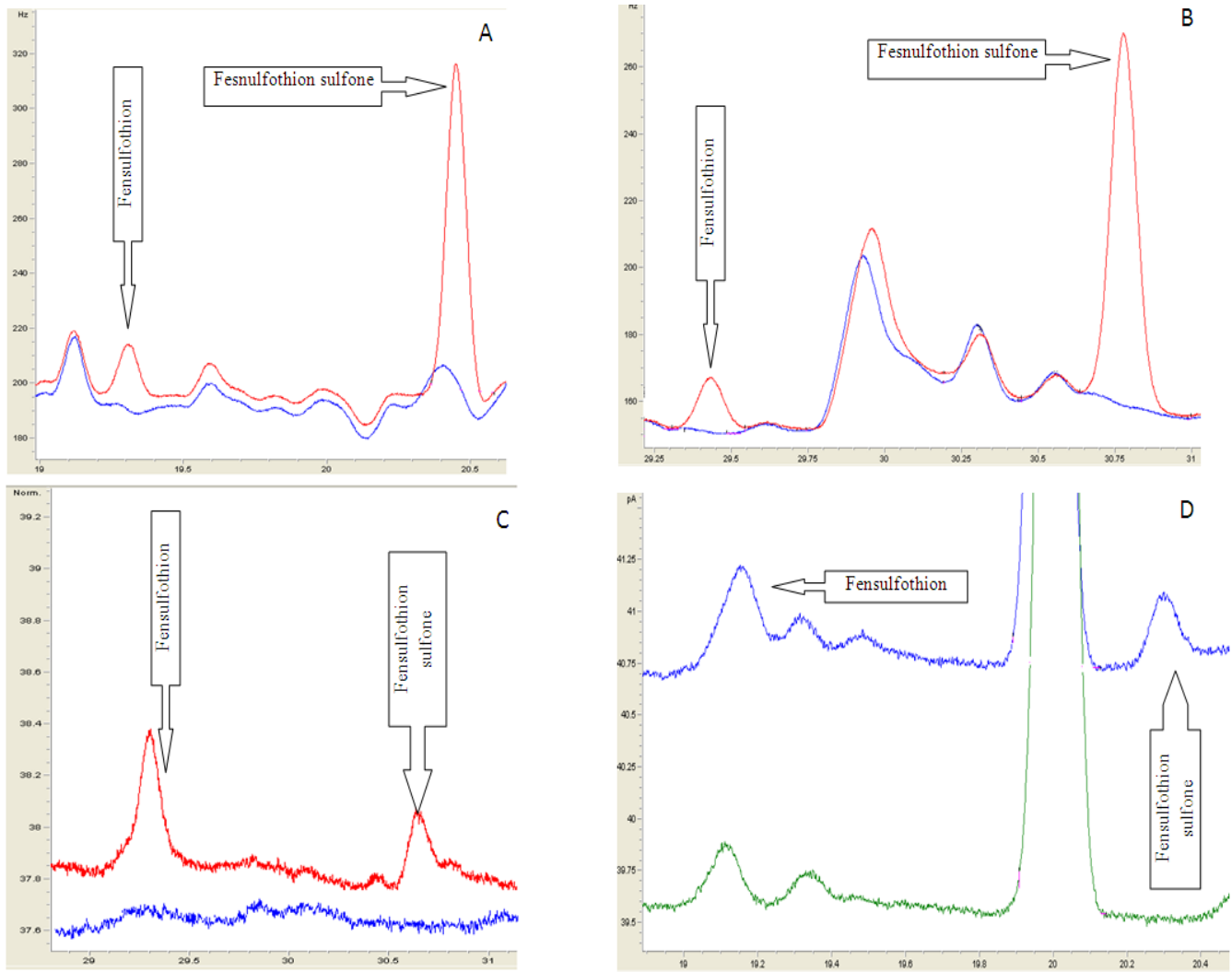
1. Σε δυο στήλες DB-5-MS συνδεδεμένες με ανιχνευτές ECD και NPD.
2. Σε δυο στήλες DB-17-MS συνδεδεμένες με ανιχνευτές ECD και NPD.
3. Σε δυο ανιχνευτές ECD συνδεδεμένη με στήλες DB-5-MS.
4. Σε δυο ανιχνευτές NPD συνδεδεμένη με στήλες DB-17-MS.
5. Σε στήλη DB-5-MS συνδεδεμένη με ανιχνευτή ECD και στήλη DB-17-MS συνδεδεμένη με ανιχνευτή ECD.
6. Σε στήλη DB-17-MS συνδεδεμένη με ανιχνευτή ECD και στήλη DB-5-MS συνδεδεμένη με ανιχνευτή ECD.

αλλά η ποσοτικοποίηση του αναλύτη πρέπει να γίνει σε NPD ανιχνευτή αφού –σύμφωνα με στα στοιχεία επικύρωσης– παρουσιάζει καλύτερες ανακλήσεις σε αυτόν.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι αναλύτες fensulfothion-oxon και terbufos sulfoxide δεν παρουσίασαν ικανοποιητική ορθότητα στο χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης, ενώ ο αναλύτης omethoate σε κανένα από τα δυο επίπεδα φόρτισης.

2.8.5. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ήταν το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού, που αντιστοιχεί στα 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, στο οποίο οι περισσότεροι αναλύτες παρουσίασαν αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα. Η παράμετρος που ελέγχθηκε είναι ο λόγος σήμα/θόρυβος (S/N). Στο LOQ πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10$. Στο **Σχήμα 2.1** απεικονίζονται τα χρωματογράφημα με εμβολιασμένο δείγμα παιδικής τροφής με fensulforthion και fensulfothion sulfone σε επίπεδο συγκέντρωσης 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, σε διάφορους συνδυασμούς στηλών και ανιχνευτών.



Σχήμα 2.1. Χρωματογράφηματα εμβολιασμένου δείγματος παιδικής τροφής με fensulfothion και fensulfothion sulfone σε επίπεδο συγκέντρωσης 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ σε: (A) στήλη DB-5-MS και ανιχνευτή ECD (B) στήλη DB-17-MS και ανιχνευτή ECD (C) στήλη DB-5-MS και ανιχνευτή NPD (D) στήλη DB-17-MS και ανιχνευτή NPD

2.9. Συμπεράσματα

Οι απαιτήσεις της Ε.Ε. σχετικά με τα επίπεδα φυτοπροστατευτικών ουσιών στις παιδικές τροφές είναι αυστηρές και η παρακολούθηση των επιπέδων τους απαραίτητη προϋπόθεση για κάθε κράτος μέλος. Η παρακολούθηση είκοσι πέντε ουσιών –λόγω της υψηλής τοξικότητας τους– θεσπίζεται νομοθετικά με τις οδηγίες 2006/141 και 2006/ 125. Για την ανίχνευσή τους σε παιδικές τροφές με βάση τα δημητριακά αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια γρήγορη, αξιόπιστη και οικονομική αναλυτική μέθοδος. Συγκεκριμένα, η μέθοδος εκχύλισης βασίστηκε στη μέθοδο επεξεργασίας δειγμάτων QuEChERS και ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με εκλεκτικούς ανιχνευτές ECD και NPD. Από τα στοιχεία επικύρωσης προκύπτει ότι η μέθοδος παρουσιάζει καλή ορθότητα με ανακτήσεις που κυμαίνονται από 79.2–124.6%, καλή πιστότητα με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μεταξύ 3.4–28% και όρια ποσοτικοποίησης τα οποία πληρούν τις προϋποθέσεις της Ε.Ε σχετικά με τα Ανώτατα Επιτρεπτά Επίπεδα υπολειμμάτων (MRLs) των αναλυτών αυτών στις παιδικές τροφές.

Ως μειονεκτήματα της μεθόδου θα πρέπει να αναφερθεί η αδυναμία προσδιορισμού των αναλυτών omethoate, fensulfothion-oxon και terdufos sulfoxide στα 3 µg/kg, με αποτέλεσμα την ανάγκη χρήσης εναλλακτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό τους. Η χρήση μόνο αέριας χρωματογραφίας με δυο διαφορετικής πολικότητας στήλες και δυο διαφορετικής εκλεκτικότητας ανιχνευτές, σε σχέση με πιο δαπανηρά συστήματα ενόργανης ανάλυσης (π.χ. LC-MSMS), μειώνει το κόστος της ανάλυσης και αποδεικνύει ότι οι χημικές αναλύσεις που αφορούν την ασφάλεια μιας τόσο ευαίσθητης ομάδας τροφίμων –με τα αυστηρότερα όρια στην Ε.Ε. – μπορεί να πραγματοποιηθεί από μια μεγάλη ομάδα εργαστηρίων χωρίς πολυδάπανο εξοπλισμό. Παρότι τα όρια αναφέρονται σε τελικό προϊόν που προορίζεται για κατανάλωση, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε πρώτες ύλες με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (π.χ. δημητριακά) οι οποίες προορίζονται για την παρασκευή παιδικών τροφών.

3. Επικύρωση 2 παραλλαγών στις μεθόδους QuEChERS για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε παιδικές τροφές με την χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μάζας.

3.1. Εισαγωγή

Τα βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας σε σύγκριση με τους ενήλικους είναι εκτεθειμένα σε μεγαλύτερο βαθμό στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αφού –λόγω υψηλής κατανάλωσης τροφίμων ανά κιλό βάρους– είναι περισσότερο ευπαθή σε αυτά. Η οδηγία 2006/125/ΕΕ⁵ συνοψίζει και αντικαθιστά οδηγίες προηγούμενων ετών ορίζοντας τους κανόνες για τη σύνθεση και επισήμανση των μεταποιημένων τροφίμων με βάση τα δημητριακά, τα οποία προορίζονται για

- τη διατροφή βρεφών και μικρών παιδιών χωρίς προβλήματα υγείας
- τη κατανάλωση από βρέφη κατά την περίοδο του απογαλακτισμού
- συμπληρώματα διατροφής σε παιδιά μικρής ηλικίας.

Στην συγκεκριμένη οδηγία θεσπίζεται η απαγόρευση ορισμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην καλλιέργεια αγροτικών προϊόντων που προορίζονται για την παραγωγή παιδικών τροφών και μεταποιημένων τροφών με βάση τα δημητριακά. Η απαγόρευση αυτή δεν εξασφαλίζει την απουσία των ουσιών αυτών από τα τρόφιμα, καθώς μπορεί να βρίσκονται ως ρυπαντές στο περιβάλλον και συνεπώς υπολείμματά τους να βρεθούν στα τρόφιμα. Επιπρόσθετα, είναι απαραίτητη προϋπόθεση η μη ύπαρξη υπολειμμάτων μεμονωμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων άνω των 10 µg/kg, με εξαίρεση τις ουσίες που εμπεριέχονται στα Παρατήματα VI και VII της οδηγίας, για τα οποία έχουν θεσπιστεί αυστηρότερα όρια λόγω υψηλής τοξικότητας^{4,5}:

✓ 3 µg/kg για τα: disulfoton, terbufos, fensulfothion και των μεταβολιτών τους, fentin, haloxyfop και των εστέρων του, heptachlor, hexachlorobenzene, nitrofen, omethoate, aldin, dieldrin και endrin.

✓ 4 µg/kg για τα: fipronil και fipronil-desulfinyl,

✓ 6 µg/kg για τα: propineb/propylenethiourea, cadusafos, demeton-S-methyl, demeton-S-methyl sulfone and oxydemeton-methyl, και

✓ 8 µg/kg για το ethoprophos

Από τον Ιανουάριο του 2008 η οδηγία 2006/141/ΕΕ αντικατέστησε την οδηγία 91/321/ΕΕC και τις τροποποιήσεις της. Η νέα αυτή οδηγία επικαιροποίησε τις απαιτήσεις σχετικά με την σύνθεση και επισήμανση των παρασκευασμάτων για βρέφη και παιδιά δεύτερης βρεφικής ηλικίας,

συμπεριλαμβάνοντας ειδικούς κανόνες για την παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε αυτά. Έτσι, απαιτείτε τα επίπεδα υπολειμμάτων στις παιδικές τροφές να είναι μη ανιχνεύσιμα, ενώ απαγορεύει την χρήση ορισμένων φυτοπροστατευτικών προϊόντων (που μελετηθήκαν στην προηγούμενη ενότητα) σε καλλιέργεια αγροτικών προϊόντων που προορίζονται για την παραγωγή παιδικών τροφών.

Με δεδομένο τα χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων που απαιτούνται για τον αξιόπιστο και αποτελεσματικό έλεγχο των επιπέδων των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στις παιδικές τροφές, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης αξιόπιστων-ευαίσθητων μεθόδων προσδιορισμού και ποσοτικοποίησης τους⁷¹. Η πρόοδος στην κατεργασία των δειγμάτων παιδικών τροφών για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ακολουθεί τις τάσεις που ισχύουν γενικά στον τομέα των αναλύσεων τροφίμων, με την εκχύλιση 2 υγρών να αποτελεί ακόμα σημαντική μέθοδο απομόνωσης των αναλυτών αυτών. Εναλλακτικές τεχνικές όπως η εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (SFE), η εκχύλιση με διασπορά του προσροφητικού υλικού (MSPD), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) και η εκχύλιση με αναδευόμενη βελόνα (SBSE) που είναι διαδεδομένες σε άλλα είδη τροφίμων δεν έχουν ευρέως υιοθετηθεί στις παιδικές τροφές⁷¹. Ένα κρίσιμο σημείο στις αναλύσεις για προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων αφορά τον καθαρισμό του εκχυλίσματος, με στόχο την απομάκρυνση των συνεκχυλισμάτων του υποστρώματος, περιορίζοντας έτσι στο ελάχιστο τις παρεμποδίζουσες ουσίες στην χρωματογραφία. Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) και η χρωματογραφία πηκτής (GPC) είναι δύο τεχνικές καθαρισμού με ευρεία εφαρμογή στις αναλύσεις παιδικών τροφών. Τεχνικές με οξικό αιθυλεστέρα ως διαλύτη εκχύλιση σε συνδυασμό με εκχύλιση υπερκρίσιμων υγρών⁷¹ ή χρωματογραφία πηκτής⁷³ έχουν αποδειχτεί ως αποτελεσματικός συνδυασμός για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό περίπου ενενήντα οκτώ αναλυτών σε παιδικές τροφές. Αντίθετα, το ακετονιτρίλιο ως διαλύτης εκχύλισης έχει μεγαλύτερο κόστος και υψηλότερη τοξικότητα σε σχέση με τον οξικό αιθυλεστέρα. Αλλά λόγω της υψηλότερης πολικότητάς του περιορίζεται η συνεκχύλιση λιπόφιλων ουσιών (λίπη, χλωροφύλλες ή κηροί) από το υπόστρωμα⁷⁴. Μια αρκετά δημοφιλής μέθοδος επεξεργασίας δείγματος είναι η μέθοδος QuEChERS⁶⁵. Σύμφωνα με το αρχικό πρωτόκολλο της μεθόδου η εκχύλιση των αναλυτών-στόχων πραγματοποιείται με ακετονιτρίλιο, συμπεριλαμβάνοντας ένα στάδιο με προσθήκη μίγματος αλάτων ενώ ο καθαρισμός του εκχυλίσματος γίνεται με διασπορά στερεάς φάσης (dispersive solid phase extraction). Το τελικό εκχύλισμα αναλύεται σε σύστημα GC ή LC⁷⁵. Σήμερα μόνο ελάχιστες αναφορές του αρχικού πρωτοκόλλου της μεθόδου γίνονται και αφορούν την εφαρμογή της στον προσδιορισμό υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε παιδικές τροφές⁷⁶.

Πέραν των είκοσι πέντε αναλυτών υψηλής τοξικότητας -οι οποίοι μελετήθηκαν εκτενώς στην πρώτη ενότητα- η Ε.Ε. έχει θεσπίσει αυστηρά όρια για ένα μεγάλο αριθμό φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Η τεχνική της αέριας χρωματογραφίας έχει αναδειχθεί ως ένα σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό μιας σημαντικής ομάδας τους, όμως δεν επαρκεί για να καλύψει όλο το εύρος των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων που απαιτούνται.

Αντίθετα, η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου επιτρέπει τον γρήγορο και αποτελεσματικό προσδιορισμό ενός μεγάλου αριθμού ουσιών, οι οποίες δεν είχαν έως τώρα μελετηθεί στα τρόφιμα ή ο προσδιορισμός τους ήταν πολύπλοκος με τη χρήση αέριας ή υγρής χρωματογραφίας συνδυαζόμενες με συμβατικούς ανιχνευτές (π.χ. UV). Η εκλεκτικότητα και η ευαισθησία τους βελτιώθηκαν σημαντικά, το στάδιο επεξεργασίας των δειγμάτων περιορίστηκε και πλέον ο αξιόπιστος προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί σε χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων⁷². Τα τελευταία χρόνια η χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) γίνεται όλο και περισσότερο δημοφιλής και συμπεριλαμβάνεται σε ποικίλες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό άνω των πενήντα αναλυτών σε παιδικές τροφές.

Στόχος της παρούσας ενότητας ήταν η ανάπτυξη μιας νέας πολυ-υπολειμματικής μεθόδου, το στάδιο επεξεργασίας της οποίας βασίζεται σε παραλλαγή της μεθόδου QuEChERS και το στάδιο προσδιορισμού στην τεχνική LC-MS/MS. Η μέθοδος αυτή επικυρώθηκε για εκατόν είκοσι φυτοπροστατευτικά προϊόντα ποικίλων χημικών δομών, συμπεριλαμβανομένων των είκοσι τριών αναλυτών υψηλής τοξικότητας σε παιδικές τροφές με βάση τα δημητριακά, όπως ορίζονται από την κοινοτική νομοθεσία (οδηγίες 2006/141/EC και 2006/125/EC). Λόγω της ποικιλομορφίας των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των αναλυτών, οι παραλλαγές πραγματοποιήθηκαν είτε στο στάδιο της επεξεργασίας του δείγματος ή/και το στάδιο της χρωματογραφίας.

3.2. Υλικά και Αντιδραστήρια

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
2. Ακετόνη, καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
3. Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (Fluka).
4. Χλωριούχο νάτριο (ACS reagent grade ≥ 99.0 %).
5. Διένυδρουδρο κιτρικό νάτριο (Sigma-Aldrich).

6. Τετραένυδρο όξινο κντρικό νάτρνο (Fluka).
7. Μνρμηκνκό Αμμώννο (Fluka).
8. Δνάλνμα Θενκού όξέος σνγκέντρωσης 1N (Merck & Co. Inc.)
9. Δνάλνμα Υδροξενδνίου του Νατρνίου σνγκέντρωσης 1N (Merck & Co. Inc.)
10. Πρωτοταγής-Δευτεροταγής αμννη (Bondesil-PSA 40μm) (Varian Inc).
11. Φνάλες φυγοκέντρον των 50mL από teflon και με βνδωτό πώμα.
12. Φνάλες φυγοκέντρον των 15mL από polypropylene και με βνδωτό πώμα.
13. Γνάλννα φννλνδν των 8 mL με πώμα από teflon (PTFE).
14. Εκατόν ενκοσι πρότυποι αναλύτες αναφοράς (μεταξύ αυτών ενκοσι τρεν αναλύτες που σνμπερνλαμβάνονταν σνς οδηγνές 2006/141 και 2006/125 και σνμννννται με αστερνσκο), γνωστής καθαρότητάς (Dr Ehrenstorfer Laboratories GmbH Germany) : acephate, acetamiprid, aldicarb, aldicarb sulfone, aldicarb sulfoxide, ametryn, atrazine, azimsulfuron, azinphos methyl, azoxystrobin, benalaxyl, bensulfuron methyl, boscalid, bromuconazole, buprofezin, cadusafos*, carbaryl, carbofuran, carbofuran 3-Hydroxy, carbosulfan, chlorotoluron, clofentezine, cyanazine, cymoxanil, demeton-S-methyl*, demeton-S-methyl sulfone*, demeton-S-methyl sulfoxide*, diazinon, dichlorvos, diethofencarb, difenoconazole, dimethoate, dimethomorph, disulfoton*, disulfoton-sulfone*, disulfoton-sulfoxide*, epoxiconazole, ethofumesate, ethoprophos*, etoxazole, famoxadone, fenamidone, fenbuconazole, fenhexamide, fenoxycarb, fenpropimorph, fenpyroximate, fensulfothion*, fensulfothion sulfone*, fensulfothion-oxon*, fensulfothion-oxon-sulfone*, fenthion, fentin*, fipronil*, fipronil-desulfinyl*, flutriafol, fosthiazate, furathiocarb, haloxyfop*, haloxyfop-ethoxyethylester*, haloxyfop-methoxyethylester*, hexaconazole, hexythiazox, imidacloprid, indoxacarb, iprovalicarb, kresoxim methyl, linuron, metalaxyl M, metconazole, methamidophos, methiocarb, methiocarb sulfone, methiocarb sulfoxide, methomyl, methoxyfenozide, metoxuron, monocrotophos, monolinuron, myclobutanil, nicosulfuron, omethoate*, oxamyl, phosalone, phosmet, pirimicarb, pirimiphos methyl, primisulfuron methyl, procloraz, profenofos, propamocarb, propargite, pymethrozin, pyraclostrobin, pyridaben, pyrifeno, pyrimethanil, pyriproxifen, quinoxifen, simazine, spinosad (A), spiroxamine, tebuconazole, tebufeno, tebufenpyrad, terbufos*, terbufos-sulfone*, terbufos-sulfoxide*, terbuthylazine, tetraconazole, thiacloprid, thiamethoxam, thiodicarb, thiophanate methyl, tolylfluanid, triadimefon, triadimenol, triazophos, trifloxystrobin, vamidothion.

3.3. Εξοπλισμός

1. Φυγόκεντρος τουλάχιστον 4000 στροφών / min.
2. Συσκευή υπερήχων.
3. Αναδευτήρας Vortex mixer (K-550-GE, Scientific industries inc. Bohemia).
4. Υγρός χρωματογράφος με σύστημα δυο αντλιών Varian Prostar 210, αυτόματο δειγματολήπτη, Prostar 420 -100 θέσεων συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας τριπλού τετράπολου Varian 1200L, με πηγή ηλεκτροδιάχυσης (ESI) με δυνατότητα λειτουργίας θετικού ή αρνητικού ιονισμού. Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιείται το λογισμικό Varian MS Workstation software version 6.8.
5. Αντλία παραγωγής αζώτου υψηλής καθαρότητας, (Dominic Hunter).

3.4. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης

Τα πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης της τάξης των 500-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ παρασκευάστηκαν σε ακετόνη για κάθε αναλύτη ξεχωριστά, με εξαίρεση τους αναλύτες fentin, haloxyfor, haloxyfor-ethoxyethylester και haloxyfor-methoxyethylester τα οποία διαλύθηκαν σε μεθανόλη (λόγω της χαμηλής διαλυτότητάς τους στην ακετόνη). Τοποθετήθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια με πάμα από Teflon και αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Στις συνθήκες αυτές τα διαλύματα παραμένουν σταθερά για χρονικό διάστημα 3 ετών. Η ζύγιση της καθαρής δραστικής ουσίας για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών, ενώ ελήφθη υπόψη και ο βαθμός καθαρότητας τους. Ένα διάλυμα εργασίας στο οποίο εμπεριέχονται όλες οι παραπάνω ουσίες παρασκευάστηκε με συγκέντρωση $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ σε μεθανόλη.

3.5. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας (matrix matched standards)

Για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας προτύπων που περιείχαν το υπόστρωμα που αποτελείται από παιδική τροφή με βάση τα δημητριακά, η οποία είχε προηγούμενος αναλυθεί για την απουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Ποσότητα 2 mL εκχυλίσματος μάρτυρα παιδικής τροφής εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και 1 mL από το πρότυπο διάλυμα αναφοράς στην επιθυμητή συγκέντρωση προστέθηκε. Το τελικό διάλυμα τοποθετήθηκε για 30sec σε λουτρό υπερήχων για καλύτερη διαλυτοποίηση. Ακολουθεί διήθηση από

φίλτρο τύπου syringe filter 0,45 μ m και το διάλυμα τοποθετείται σε φιαλίδιο 2mL, πωματίζεται με PTFE και είναι έτοιμο για έγχυση στον υγρό χρωματογράφο.

3.6. Μέθοδος εκχύλισης

3.6.1. Εκχύλιση των εκατόν δέκα επτά αναλυτών διαφόρων χημικών κατηγοριών

Η μέθοδος εκχύλισης βασίστηκε στη μέθοδο QuEChERS^{65,70,78,79}. Αναλυτικότερα, σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL τίθενται 5 \pm 0,05 g (m_s) προϊόντος και προστίθενται 10 mL νερού, το οποίο πρέπει να βρίσκεται σε χαμηλή θερμοκρασία (< 4°C) για να αντισταθμίσει την ανάπτυξη θερμότητας που προκαλείται από την προσθήκη των αλάτων. Ακολουθεί ανακίνηση για 1 min σε Vortex mixer, προστίθενται 10 mL ακετονιτριλίου (V_1) και ακολουθεί έντονη ανακίνηση με το χέρι για 1 min. Τέλος, προστίθεται μίγμα αλάτων των παρακάτω συστατικών:

- ✓ 4 g \pm 0.2 g άνυδρο θειικό μαγνήσιο,
- ✓ 1 g \pm 0.05 g χλωριούχο νάτριο,
- ✓ 1 g \pm 0.05 g διένυδρο κιτρικό νάτριο
- ✓ 0.5 g \pm 0.03 g τετραένυδρο όξινο κιτρικό νάτριο

ανακινείται με το χέρι για 1 min και φυγοκεντρείται στις 4000 στροφές/ min για 5 min. Στη συνέχεια, 8 mL από το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζεται σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL, η οποία τοποθετείται για τουλάχιστον 2 ώρες σε καταψύκτη (η ψύξη βοηθά στην καθίζηση ορισμένων συνεκχυλισμάτων με μικρή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο). Με τον τρόπο αυτό καθιζάνει η μεγαλύτερη ποσότητα των λιπαρών και 6 mL από το υπερκείμενο υγρό μεταγγίζονται σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL που περιέχει 250 mg PSA και 750 mg MgSO₄. Μετά από έντονη ανακίνηση με το χέρι για 1 min και φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές/ min για 5 min, τα 5 mL από το υπερκείμενο μεταφέρονται σε φιαλίδιο των 8 mL, προστίθενται 0.05 mL διάλυμα μυρμηγκικού οξέος 5% και το διάλυμα που προκύπτει τοποθετείται σε κατάψυξη έως τη χρωματογραφική ανάλυση.

Πριν την ανάλυση, 2mL (V_2) από το τελικό εκχύλισμα μεταφέρεται σε φιαλίδιο των 8mL, εξατμίζεται μέχρι ξηρού και προστίθεται 1mL (V_3) μίγματος μεθανόλης–νερού (30:70) ως εξής: αρχικά προστίθενται 0,3mL μεθανόλης, το ξηρό υπόλειμμα διαλυτοποιείται σε υπερήχους για 30sec, προστίθενται 0,7 mL νερού και το διάλυμα τοποθετείται σε υπερήχους για 30 sec. Το διάλυμα που προκύπτει διηθείται από φίλτρο τύπου syringe filter (PTFE) 0,45 μ m σε φιαλίδιο των 2mL και χρησιμοποιείται απευθείας για ανάλυση στο LC-MS/MS.

3.6.2. Εκχύλιση του *Haloxylon* και των εστέρων του

Σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL ζυγίζονται $5 \pm 0,05$ g (m_s) προϊόντος και προστίθενται 10 mL ψυχρού νερού ($< 4^\circ\text{C}$, για να αντισταθμίσει την ανάπτυξη θερμότητας που προκαλείται από την προσθήκη των αλάτων). Ακολουθεί ανακίνηση για 1 min σε Vortex mixer, προσθήκη 300μL δ/τος NaOH 5N, ανακίνηση του μίγματος με το χέρι για 1 min με αποτέλεσμα το pH του να ρυθμιστεί περίπου στο 12. Το μίγμα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min με περιστασιακή ανακίνηση και στη συνέχεια προστίθενται 300μL δ/τος H_2SO_4 5N. Ακολουθεί ανακίνηση με το χέρι για 1 min,⁷⁸ προσθήκη 10 mL (V_1) ακετονιτριλίου και νέα ανακίνηση με το χέρι για 1 min. Τέλος προστίθεται μίγμα αλάτων των παρακάτω συστατικών:

- ✓ 4 g \pm 0.2 g άνυδρο θεικό μαγνήσιο,
- ✓ 1 g \pm 0.05 g χλωριούχο νάτριο,
- ✓ 1 g \pm 0.05 g διένυδρο κιτρικό νάτριο
- ✓ 0.5 g \pm 0.03 g τετραένυδρο όξινο κιτρικό νάτριο

Το συνολικό μίγμα ανακινείται με το χέρι για 1 min και φυγοκεντρείται για 5 min στις 4000 στροφές/ min. Ένα τμήμα 8 mL από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL και τοποθετείται σε καταψύκτη για τουλάχιστον 2 ώρες, για να καθιζάνουν τα συνεκχυλίσματα που έχουν μικρή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο. Έτσι απομακρύνεται η μεγαλύτερη ποσότητα των λιπαρών ουσιών και στη συνέχεια 2mL (V_2) από το τελικό εκχύλισμα μεταφέρονται σε φιαλίδια των 8mL, εξατμίζονται μέχρι ξηρού και επαναδιαλύονται σε 1 mL (V_3) μεθανόλης. Ακολουθεί διήθηση από φίλτρο τύπου syringe filter (PTFE) 0,45μm μέσα σε φιαλίδιο των 2mL και διατήρηση σε κατάψυξη έως τη χρωματογραφική ανάλυση.

3.7. Προσδιορισμός με γρήγη χρωματογραφία–φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου

Χρησιμοποιήθηκε σύστημα γρήγης χρωματογραφίας Varian εξοπλισμένο με 2 αντλίες Prostar 210 και αυτόματο δειγματολήπτη Prostar 420 με εκατό θέσεις, συζευγμένο με φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου (Varian model 1200L) θετικού και αρνητικού ιονισμού και τεχνική λειτουργίας παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων (MRM). Οι βασικές παράμετροι του φασματόμετρου μάζας ρυθμίστηκαν ως παρακάτω:

- ✓ Θερμοκρασία πηγής ιονισμού: 50 °C
- ✓ Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης: 250 °C

- ✓ Αέριο ξήρανσης και εκνέφωσης: Άζωτο υψηλής καθαρότητας.
- ✓ Πίεση αερίου ξήρανσης: 18psi
- ✓ Πίεση αερίου εκνέφωσης: 55psi
- ✓ Αέριο κελιού θραυσματοποίησης: Αργό καθαρότητας 99.999 %, 0,2Pa.
- ✓ Τάση ανιχνευτή: 1500Volt.
- ✓ Πολικότητα πηγής ηλεκτροδιάχυσης: Η πηγή ηλεκτροδιάχυσης επιλέχθηκε σε ESI⁺ ή πλην των ουσιών haloxyfor, fipronyl και fipronil desulfinyl όπου είναι ESI⁻.
- ✓ Χρόνος συλλογής μεταπτώσεων: 100-250msec ανάλογα με τον αναλύτη.
- ✓ Τάση τριχοειδούς: Αναγράφεται στον **Πίνακα I του Παραρτήματος** και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.
- ✓ Ενέργεια θραυσματοποίησης: Αναγράφεται στον **Πίνακα I του Παραρτήματος** και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.

3.7.1. Προσδιορισμός των εκατόν δέκα εννέα αναλυτών διαφόρων χημικών κατηγοριών, του Haloxyfor και των μεταβολιτών του

Ο διαχωρισμός των αναλυτών έγινε σε στήλη Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2,1mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm. Η θερμοκρασία στήλης ήταν αυτή του περιβάλλοντος (25 ± 4°C). Ως διαλύτης έκλουσης A χρησιμοποιήθηκε μίγμα μεθανόλης:νερού 10:90, 1mM HCOONH₄ και διαλύτης έκλουσης B μίγμα μεθανόλης:νερού 90:10, 1mM HCOONH₄. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν σταθερή 0,25 mL/min.

Ως πρόγραμμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω σχήμα:

Χρόνος (min)	%A	%B
0.00	90.,0	1000
14.00	0.0	10000
20.00	0.0	100.0
20.12	9000	10.0
30.00	9000	10.0

Ο όγκος του τελικού εκχυλίσματος του δείγματος που εγχύθηκε στο LC ήταν 20 μL. Πριν από κάθε έγχυση ο αυτόματος δειγματολήπτης εκπλύθηκε με διάλυμα μεθανόλης:νερό (50:50) για να αποφευχθούν μολύνσεις.

3.7.2. Προσδιορισμός του Fentin

Ο διαχωρισμός των ουσιών έγινε σε στήλη Zorbax Eclipse XDB C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2.1 mm και μεγέθους σωματιδίων 3.5μm. Η θερμοκρασία στήλης ήταν αυτή του περιβάλλοντος ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$). Ως διαλύτης έκλουσης Α χρησιμοποιήθηκε νερό, 5mM HCOONH₄, 1% HCOOH και ως διαλύτης έκλουσης Β μεθανόλη, 5mM HCOONH₄, 1% HCOOH. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ρυθμίστηκε σε 0,25 mL/min.

Ως πρόγραμμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω σχήμα:

Χρόνος (min)	%A	%B
0.00	90.0	10.0
14.00	0.0	100.0
20.00	0.0	100.0
20.12	90.0	10.0
30.00	90.0	10.0

Ο όγκος του τελικού εκχυλίσματος του δείγματος που εγχύθηκε στο LC ήταν 20 μL. Πριν από κάθε έγχυση ο αυτόματος δειγματολήπτης εκπλύθηκε με διάλυμα μεθανόλης:νερό (50:50) για να αποφευχθούν μολύνσεις.

3.8. Ταυτοποίηση

Η παρουσία αναλύτη στο δείγμα ταυτοποιείται αφενός με την εμφάνιση χρωματογραφικών κορυφών σε χρόνο πλησίον ($\pm 3\%$) του χρόνου κατακράτησης της πρότυπης ουσίας και αφετέρου από το λόγο των 2 μεταπτώσεων (LC-MS/MS) ο οποίος πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις του παρακάτω πίνακα⁵⁵:

Σχετική ένταση ιόντος (% της βασικής κορυφής)	LC-MS-MS (επιτρεπόμενη απόκλιση %)
> 50 %	± 20 %
> 20 % ως 50 %	± 25 %
> 10 % ως 20 %	± 30 %
$\leq 10\%$	± 50 %

3.9. Προσδιορισμός

Η περιεκτικότητα του δείγματος στο δείγμα, σε mg/kg, υπολογίζεται, από την εξίσωση:

$$C = f \times C_I$$

όπου:

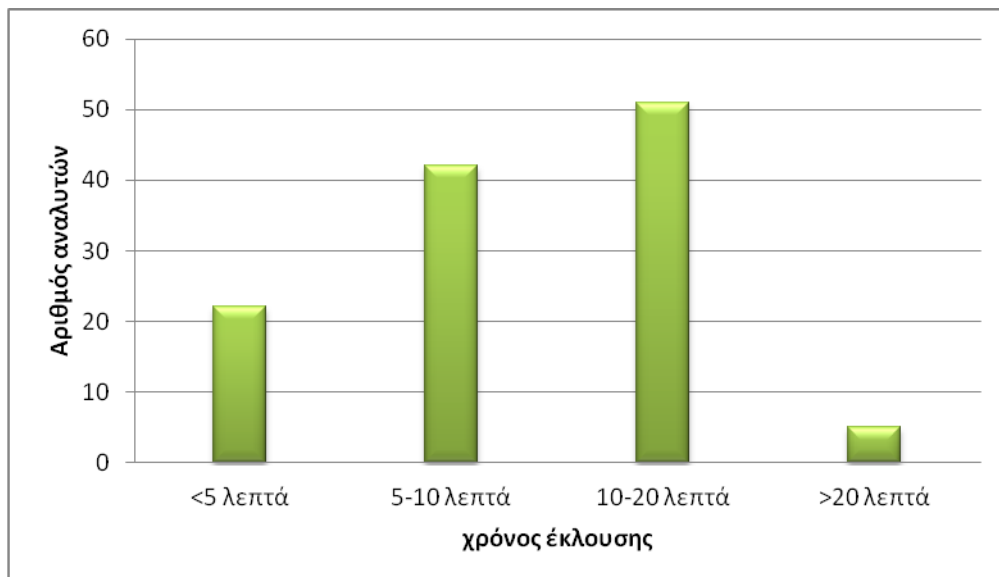
✓ C_I είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο τελικό προς έγχυση διάλυμα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με πρότυπα διαλύματα αναφοράς, και

✓ ο συντελεστής $f = V_1 V_3 / m_s V_2$ (V_1, V_2, V_3 ο όγκος των διαλυτών και m_s η μάζα του δείγματος) και είναι ίσος με την μονάδα ($f=1$) και στις δυο μεθόδους εκχύλισης.

3.10. Αποτελέσματα και συζήτηση

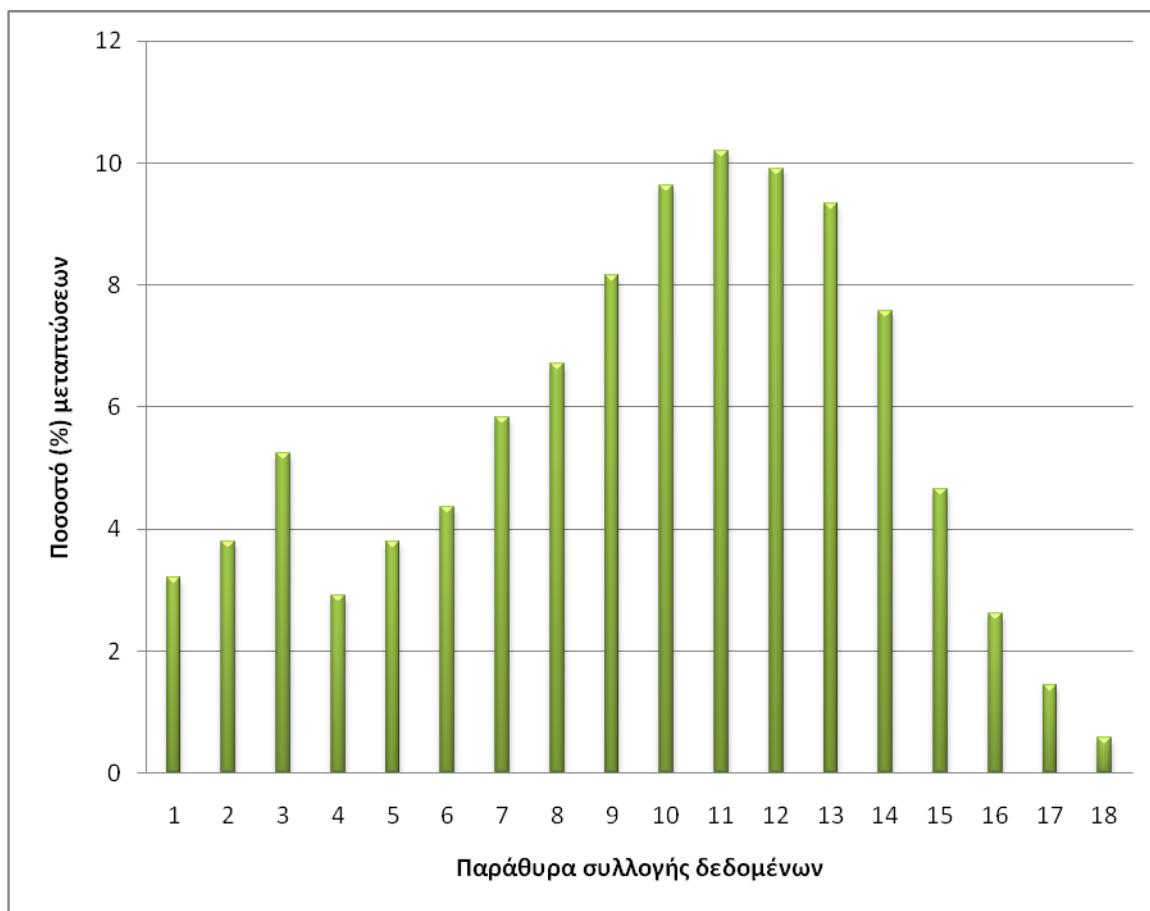
3.10.1. Επιλογή κατάλληλου προγράμματος έκλουσης – Κατανομής μεταπτώσεων

Η ανάπτυξη ενός προγράμματος έκλουσης αποτελεί μια σημαντική παράμετρο όταν διαχωρίζεται ένας τόσο μεγάλος αριθμός ουσιών. Η χρήση της φασματομετρίας μάζας μέσω της τεχνικής παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων επιτρέπει την αξιόπιστη διάκριση και ταυτοποίηση δύο ή περισσότερων αναλυτών που συνεκλούνται. Η συνέκλουση όμως πολλών αναλυτών σε συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο επηρεάζει την ευαισθησία του ανιχνευτή με αποτέλεσμα να μην είναι εφικτή η ανίχνευση τους στα επιθυμητά επίπεδα συγκέντρωσης. Για τον λόγο αυτό πραγματοποιήθηκαν διάφοροι συνδυασμοί αρχικής φάσης προγράμματος, ρυθμού ανόδου από τον πολικότερο διαλύτη (A) προς το λιγότερο (B), ροής κινητής φάσης και χρόνου προγράμματος μέχρι να επιλεγεί-χρησιμοποιηθεί το υπάρχον χρωματογραφικό πρόγραμμα. Στόχος του χρωματογραφικού προγράμματος ήταν η κατανομή των ουσιών να είναι όσο το δυνατόν περισσότερο ομοιόμορφη σε όλη τη διάρκειά του και οι χρωματογραφικές κορυφές των αναλυτών να είναι συμμετρικές. Στο **Σχήμα 3.1** διακρίνεται η χρονική κατανομή των υπό μελέτη αναλυτών (σύμφωνα με τους χρόνους κατακράτησης) στο χρωματογραφικό πρόγραμμα που εφαρμόστηκε. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χρονική περιοχή από 10-14 λεπτά είναι η πλέον επιβαρυνόμενη αφού το 55% των αναλυτών εκλύεται σε αυτή. Χωρίζοντας όμως ταυτόχρονα και το πρόγραμμα συλλογής δεδομένων του φασματομέτρου μάζας σε ισόχρονα παράθυρα του ενός λεπτού το πρόβλημα επιλύθηκε και επιτεύχθηκε η επιθυμητή ευαισθησία.



Σχήμα 3.1. Χρονική κατανομή των υπό μελέτη αναλυτών σε 4 χρονικά παράθυρα στο χρωματογραφικό πρόγραμμα που εφαρμόζουμε

Η τεχνική της συλλογής δεδομένων η οποία είναι εξαρτώμενη από το χρόνο έκλουσης του αναλύτη αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους βελτιστοποίησης κατά την δημιουργία πολυπολειμματικών μεθόδων στην φασματομετρία μάζας γιατί επιτρέπει στο σύστημα να συλλέγει τα ιόντα εκάστης ουσίας πλησίον του χρόνου έκλουσής της. Όταν ο αριθμός των αναλυτών είναι μεγάλος το εύρος του χρονικού παραθύρου είναι δύσκολο να καθοριστεί. Για τον λόγο αυτό ο χρωματογραφικός χρόνος διαιρέθηκε σε ισόχρονα παράθυρα του ενός λεπτού στα οποία τοποθετήθηκαν οι μεταπτώσεις του κάθε αναλύτη ανάλογα με τον χρόνο έκλουσης του. Έτσι, το σύστημα καταναλώνει περισσότερο χρόνο για την σάρωση κάθε μετάπτωσης, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται η επιθυμητή ευαισθησία. Έτσι η συσσώρευση αναλυτών στην περιοχή 10-14 λεπτά δεν συνεπάγεται ταυτόχρονη συσσώρευση ιόντων -τα οποία το σύστημα θα πρέπει να ανιχνεύσει ταυτόχρονα- με αποτέλεσμα τη μείωση της ευαισθησίας- αφού σε κάθε παράθυρο του ενός λεπτού αντιστοιχεί περίπου το 8-10% των αναλυτών. Η κατανομή των μεταπτώσεων ανά παράθυρο εμφανίζεται στο **Σχήμα 3.2**.



Σχήμα 3.2. Κατανομή μεταπτώσεων ανά χρονικό παράθυρο συλλογής δεδομένων των υπό μελέτη αναλυτών.

Στον Πίνακα I του Παραρτήματος παρουσιάζονται οι χρόνοι κατακράτησης των αναλυτών, τα χρονικά παράθυρα και οι μεταπτώσεις για τον κάθε αναλύτη.

3.10.2. Επιλογή τελικού διαλύτη

Η εξάτμιση του ακετονιτριλίου και η επαναδιάλυση του ξηρού υπολείμματος σε μίγμα μεθανόλης:νερού (30:70) αποτελεί ένα επιπρόσθετο αλλά αναγκαίο στάδιο της μεθόδου, καθώς αποδείχθηκε ότι έχει αρκετά πλεονεκτήματα κυρίως για τις περισσότερο πολικές ουσίες, οι οποίες εκλύονται νωρίς. Η εκτίμηση της διαφοράς μεταξύ των δυο διαλυτών ως διαλυτών έγχυσης πραγματοποιήθηκε με την παρασκευή 2 προτύπων διαλυμάτων εργασίας:

A. Πρότυπο δ/μα εργασίας εκατόν δέκα έξι αναλυτών σε ακετονιτρίλιο, συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/mL}$

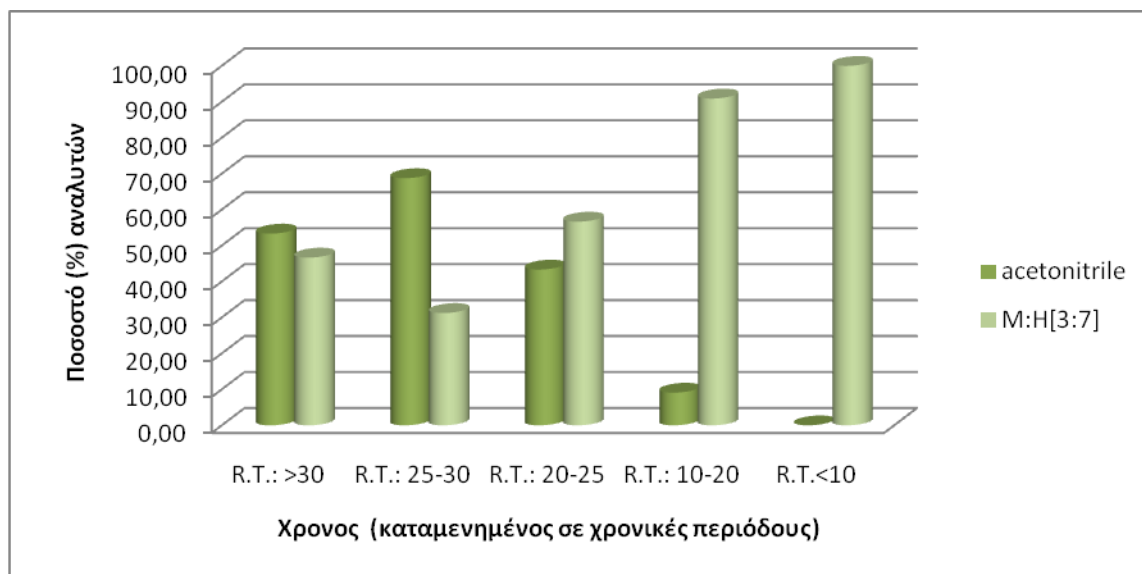
B. Πρότυπο δ/μα εργασίας εκατόν δέκα έξι αναλυτών σε μεθανόλη:νερό (30:70), συγκέντρωσης 10 µg/mL

Η απόκριση του ανιχνευτή και το σχήμα της χρωματογραφικής κορυφής εκτιμήθηκαν με 5 συνεχόμενες εγχύσεις εκάστου διαλύματος στο σύστημα LC-MS/MS με σταθερή ροή διαλύτη (0,2 mL/min.).

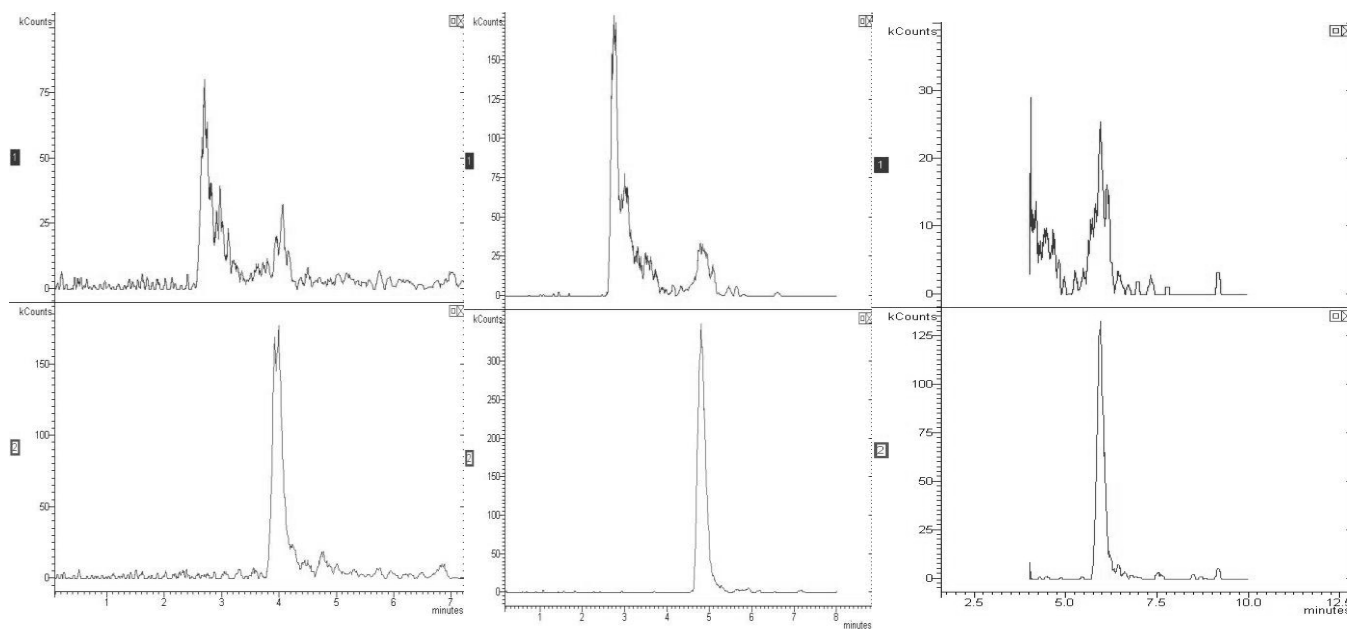
Ως πρόγραμμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω:

Χρόνος (min)	%A	%B
0.00	90.0	10.0
2.00	90.0	10.0
25.00	0.0	100.0
40.00	0.0	100.0
40.06	90.0	10.0
60.00	90.0	10.0

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 3.3** το δ/μα σε μεθανόλης:νερού (30:70), παρατηρήθηκαν υψηλότερες τιμές σήματος/θόρυβο για την πλειονότητα των αναλυτών που εκλούνται νωρίς. Το ποσοστό αυτό είναι 100% για τους αναλύτες που εκλούνται εντός των 10 πρώτων λεπτών, 90.9% για αυτούς που εκλούνται τα επόμενα 10 λεπτά και 56.7% για αυτούς που εκλούνται στα 20-25 λεπτά. Τα ποσοστά ευνοούν το ακετονιτρίλιο για τους αναλύτες οι οποίοι εκλούνται μετά τα 25 λεπτά. Επιπλέον, το μίγμα μεθανόλης:νερό αναμιγνύεται καλύτερα με την κινητή φάση αφού αποτελείται από τους ίδιους διαλύτες. Τέλος, με το μίγμα αυτό επιτυγχάνεται καλύτερη συμμετρία των χρωματογραφικών κορυφών (σύμφωνα με το **Σχήμα 3.4**).



Σχήμα 3.3. Σύγκριση του S/N των 116 αναλυτών στα 10 $\mu\text{g/mL}$ σε τελικό διαλύτη ακετονιτρίλιο και μεθανόλη:νερό (3:7) για 5 διαφορετικές χρονικές περιόδους. Η 1^η στήλη (πράσινο σκούρο) αντιπροσωπεύει το ποσοστό των αναλυτών με υψηλότερο S/N με το ακετονιτρίλιο και η 2^η (πράσινο ανοιχτό) με μεθανόλη:νερό (3:7)



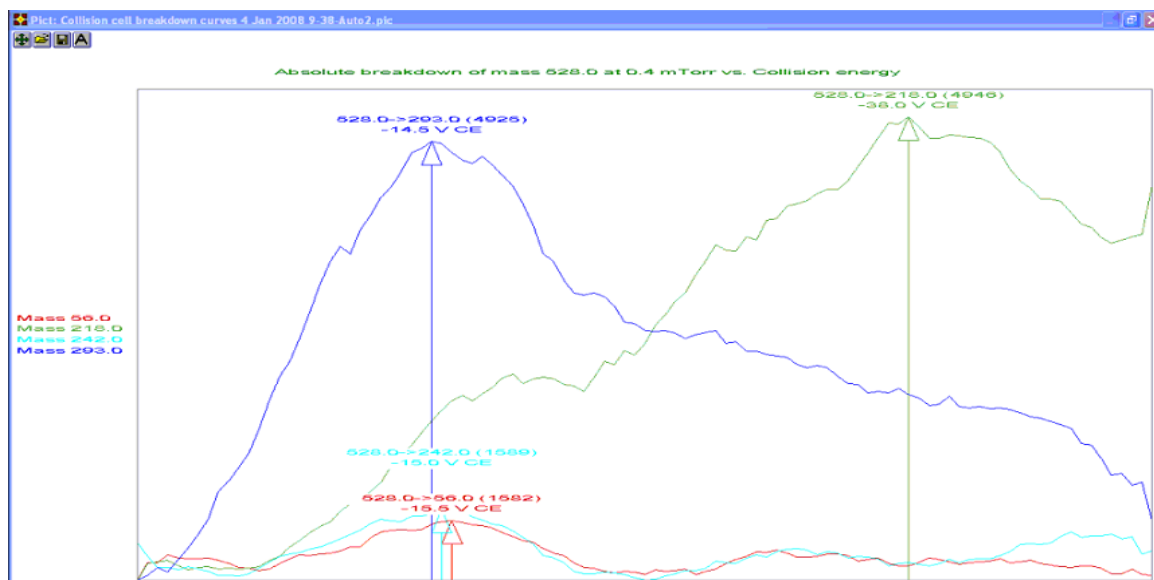
Σχήμα 3.4. Χρωματογραφήματα προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 10 $\mu\text{g/mL}$ των αναλυτών: (1^ο) methamidophos (2^ο) acephate (3^ο) omethoate σε τελικό διαλύτη ακετονιτρίλιο (πάνω σειρά) και μεθανόλη:νερό (3:7) (κάτω σειρά)

3.10.3. Βελτιστοποίηση των παραμέτρων του Φασματομέτρου Μαζών

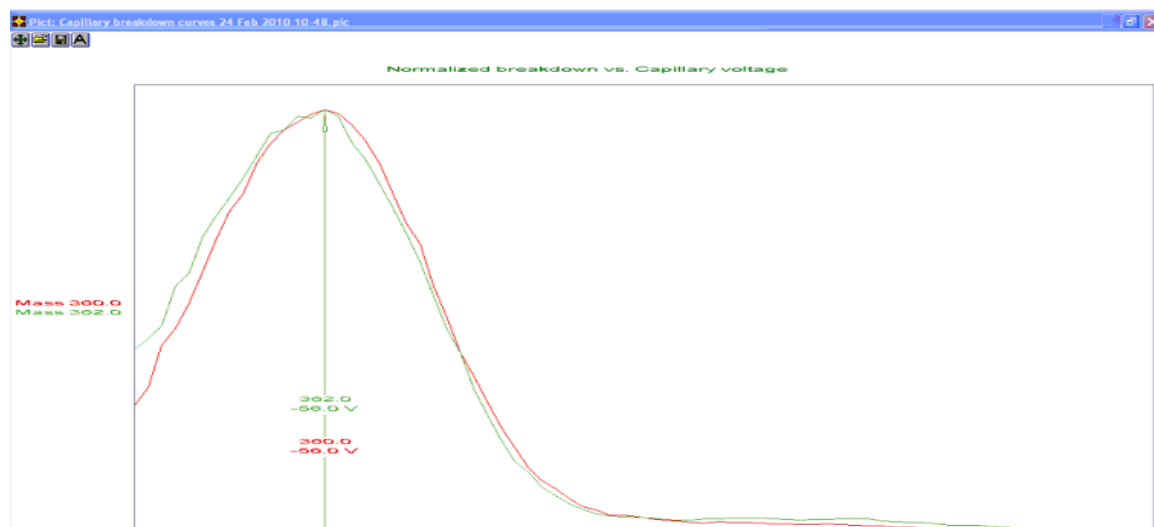
Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε ο σχηματισμός και η θραυσματοποίηση των υπό μελέτη αναλυτών υπό συνθήκες θετικού και σε αρνητικού ιονισμού. Ο ιονισμός των αναλυτών πραγματοποιείται εντός της πηγής ιονισμού με το σχηματισμό ψευδομοριακών ιόντων προσθήκης $[M+H]^+$ ή $[M+NH_4]^+$. Αυτά αποτελούν τα πρόδρομα ιόντα, που υπό την κατάλληλη τάση του τριχοειδούς εισέρχονται στο πρώτο τετράπολο. Στη συνέχεια, τα ιόντα αυτά θραυσματοποιούνται στο κελί θραυσματοποίησης (δεύτερο τετράπολο) του συστήματος φασματομετρίας μαζών και παράγοντας το καθένα χαρακτηριστικά θυγατρικά ιόντα υπό την επίδραση κατάλληλης τάσης (ενέργειας θραυσματοποίησης). Μετά την παραγωγή τους, τα θυγατρικά ιόντα εισέρχονται στο τρίτο τετράπολο και ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή. Οι μεταπτώσεις (πρόδρομα και θυγατρικά ιόντα), η τάση του τριχοειδούς, η ενέργεια θραυσματοποίησης, καθώς και οι υπόλοιπες βασικές χρωματογραφικές παράμετροι παρουσιάζονται αναλυτικά στον **Πίνακα I του Παραρτήματος**. Διαλύματα μεμονωμένων αναλυτών συγκέντρωσης 100 µg/L παρασκευάστηκαν και εγχύσεις απευθείας στο σύστημα φασματομετρίας μαζών πραγματοποιήθηκαν για τη βελτιστοποίηση των τιμών τάσης του τριχοειδούς και της ενέργειας θραυσματοποίησης για κάθε μετάπτωση ξεχωριστά. Στα **Σχήματα 5 (a, b, c, d, e)** παρουσιάζονται ενδεικτικά οι καμπύλες βελτιστοποίησης της τάσης τριχοειδούς των αναλυτών indoxacarb (ES+) και haloxyfor (ES-) και της ενέργειας θραυσματοποίησης των θυγατρικών τους ιόντων. Το μέγιστο της κορυφής δείχνει τη βέλτιστη τιμή (τάσης τριχοειδούς ή ενέργειας θραυσματοποίησης) στην οποία επιτυγχάνεται η καλύτερη ευαισθησία εκφραζόμενη ως ένταση ιόντων που οδηγούνται στον ανιχνευτή. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλους τους αναλύτες.



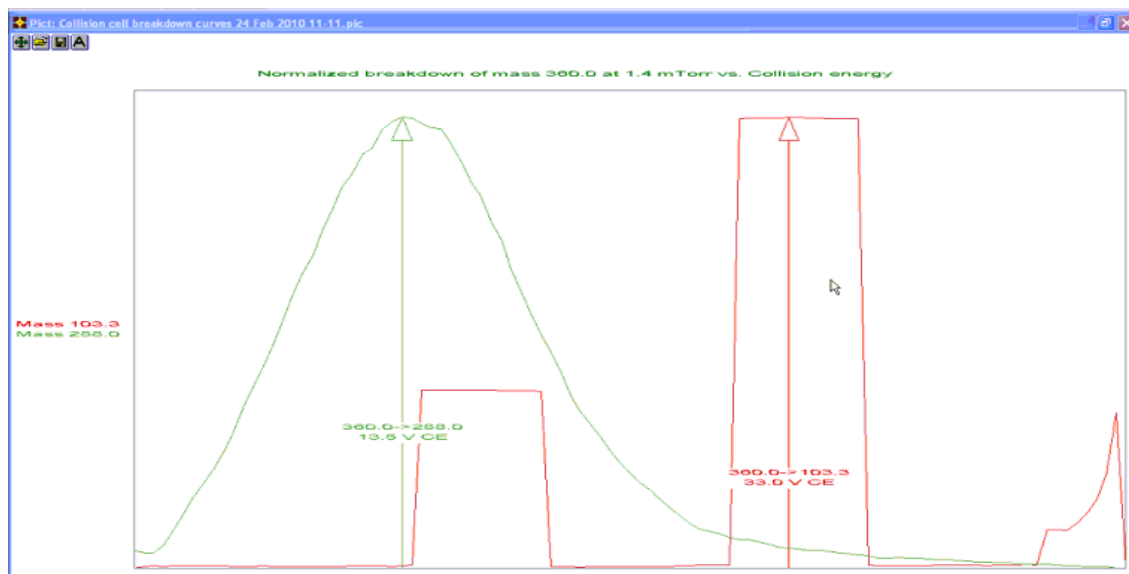
Σχήμα 5(a). Καμπύλη βελτιστοποίησης της τάσης τριχοειδούς για το ψευδομοριακό ιόν ($[M+H]^+$) 528 του αναλύτη indoxacarb.



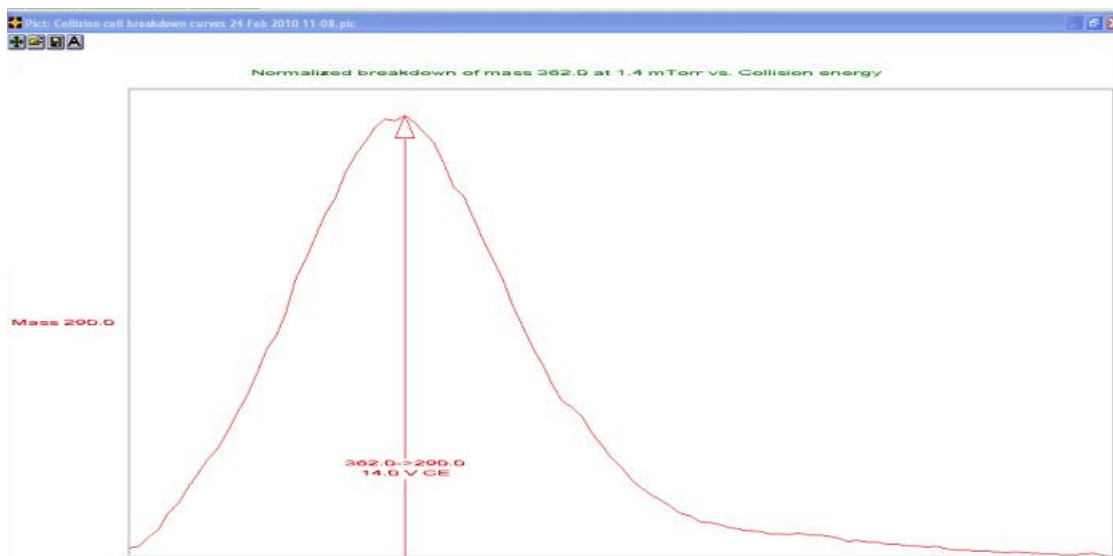
Σχήμα 5(b). Καμπύλη βελτιστοποίησης της ενέργειας θραυσματοποίησης για τα θυγατρικά ιόντα 218 και 293 του ψευδομοριακού ιόντος 528 του αναλύτη indoxacarb.



Σχήμα 5(c). Καμπύλη βελτιστοποίησης της τάσης τριχοειδούς για το ψευδομοριακό ιόν $[M-H]^+$ 362 και $[M^*]^+$ 360 του αναλύτη haloxyfor.



Σχήμα 5(d). Καμπύλη βελτιστοποίησης της ενέργειας θραυσματοποίησης για το θυγατρικό ιόν 289 του ψευδομοριακού ιόντος 360 του αναλύτη haloxyfor.



Σχήμα 5(e). Καμπύλη βελτιστοποίησης της ενέργειας θραυσματοποίησης για το θυγατρικό ιόν 290 του ψευδομοριακού ιόντος 362 του αναλύτη haloxyfor.

3.11. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η εξασφάλιση της αξιοπιστίας και της καταλληλότητας μιας μεθόδου για το σκοπό που προορίζεται πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της επικύρωσής της. Η πλήρης επικύρωση της μεθόδου έγινε αξιολογώντας την ορθότητα, πιστότητα, αβεβαιότητα, ευαισθησία, ανθεκτικότητα και εξειδίκευση.

3.11.1. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα ελέγχθηκε για όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων. Στο πλαίσιο αυτό κατασκευάστηκε διάγραμμα γραμμικότητας με σειρά εγχύσεων των προτύπων σε υπόστρωμα συγκεντρώσεων: 1.5–3.0–5.0–7.5–10–15–20–30 $\mu\text{g/L}$ για τους είκοσι τρεις αναλύτες του Παραρτήματος IV των οδηγιών 2006/141/EC και 2006/125/EC και 10–15–23–34–50–76–110 $\mu\text{g/L}$ για τους υπολοίπους. Τα πρότυπα παρασκευάστηκαν σε υπόστρωμα παιδικών τροφών για να είναι δυνατός ο συνυπολογισμός της επίδρασης του υποστρώματος στη μελέτη της γραμμικότητας. Η συνεισφορά της αβεβαιότητας της καμπύλης βαθμονόμησης στην συνολική αβεβαιότητα της μεθόδου υπολογίστηκε για το μεσαίο σημείο ($C=15 \mu\text{g/L}$) της καμπύλης για κάθε αναλύτη ξεχωριστά.

Ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνο αυτού (r^2), η τεταγμένη επί της αρχής (a) και η τυπική απόκλιση της (S_a), η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης (b), και η τυπική απόκλιση της (S_b) και η αβεβαιότητα (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις που πραγματοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.1**.

<i>Ουσίες</i>	<i>r</i>	<i>r</i> ²	<i>b</i>	<i>S_b</i>	<i>a</i>	<i>S_a</i>	<i>S_u</i>	
acephate	0.999	0.998	153228509	3110906	368943	175924	0.0018	
acetamiprid	0.997	0.994	286998182	9669796	119750	546835	0.0030	
aldicarb	0.999	0.999	393378133	5946674	-215670	336290	0.0013	
aldicarb sulfone	1.000	0.999	227505394	3026550	-156906	171154	0.0012	
aldicarb sulfoxide	0.999	0.999	330716311	5608936	-96033	317190	0.0015	
ametryn	1.000	0.999	1547814840	21141925	-3671559	1195594	0.0012	
atrazine	0.998	0.996	132547852	3634696	126992	205545	0.0024	
azimsulfuron	0.997	0.993	209034054	7584007	622297	428882	0.0032	
azinphos methyl	0.997	0.994	83462342	2989639	-253565	169067	0.0032	
azoxystrobin	0.999	0.998	789323123	14388642	192493	813690	0.0016	
benalaxyl	0.998	0.997	395122950	9794114	-140707	553866	0.0022	
bensulfuron methyl	0.999	0.998	608228739	12634588	-1545136	714497	0.0019	
boscalid	0.994	0.988	58950662	2888501	-153886	163347	0.0044	
bromuconazole	0.995	0.989	42219288	1959102	-152088	110789	0.0041	
buprofezin	0.994	0.988	199985155	9841238	-569349	556530	0.0044	
cadusafos*	0.988	0.976	6082190	394772	-	13855706	8065105	2,53
carbaryl	0.998	0.995	733758562	23090453	1648630	1305785	0.0028	
carbofuran	0.997	0.993	3254375762	121401673	9454016	6865369	0.0033	
carbofuran 3-Hydroxy	0.999	0.999	504815052	7430772	1264491	420217	0.0013	
carbosulfan	0.995	0.990	963017138	42856963	-1867607	2423598	0.0040	
chlorotoluron	0.998	0.995	554832962	17561784	368968	993134	0.0028	
clofentezine	0.996	0.992	29054637	1136807	-175889	64287	0.0035	
cyanazine	0.998	0.997	289819280	7144204	-651014	404011	0.0022	
cymoxanil	0.996	0.992	86279328	3467583	165407	196095	0.0036	
demeton-s-methyl sulfone*	0.990	0.981	1165719	73085	-1571724	1493110	2.4415	
demeton-s-methyl sulfoxide*	0.994	0.988	2475677	126093	-4452833	2576058	1.9834	
demeton-s-methyl*	0.994	0.987	4545689	238047	-7787858	4863240	2.04	
diazinon	0.999	0.998	318096743	6064044	-808480	342927	0.0017	
dichlorvos	0.997	0.994	81098269	2817171	-57094	159313	0.0031	
diethofencarb	0.982	0.964	2429641260	209740085	-	22049260	11860983	0.0077
difenoconazole	0.986	0.972	50817300	3827433	-449538	216445	0.0067	
dimethoate*	0.994	0.988	1769565	89297	-3378160	1824315	1.97	
dimethomorph	0.997	0.994	13136213	454461	-51263	25700	0.0031	
disulfoton*	0.993	0.986	438040	22456	-1035913	458767	2.00	
disulfoton-sulfone*	0.994	0.988	2946994	150154	-5318472	3067613	1.98	

disulfoton-sulfoxide*	0.993	0.986	4497944	243567	-7339130	4976007	2.11
epoxiconazole	0.998	0.997	408918393	10072753	-33964	569623	0.0022
ethofumesate	0.996	0.992	132237614	5411022	146475	305998	0.0036
ethoprophos*	0.988	0.976	1116412	77371	-1187849	1580671	2.70
etoxazole	0.998	0.995	2271715595	71678859	-5025959	4053501	0.0028
famoxadone	0.996	0.991	39364955	1633597	-102112	92381	0.0037
fenamidone	0.999	0.998	385785476	8323064	152675	470676	0.0019
fenbuconazole	0.998	0.997	144010060	3706790	-499585	209622	0.0023
fenhexamide	0.986	0.973	21495145	1595942	76724	90252	0.0066
fenoxycarb	0.999	0.997	656715240	15130694	-1109181	855654	0.0021
fenpropimorph	0.996	0.991	745775999	31112668	-2839875	1759448	0.0037
fenpyroximate	0.997	0.993	459955774	17166260	-1602740	970767	0.0033
fensulfothion sulfone*	0.994	0.987	4769847	246340	-8936324	5032659	2.01
fensulfothion*	0.994	0.988	1830346	90947	-4001381	1858027	1.93
fensulfothion-oxon*	0.994	0.988	3379500	171454	-6199529	3502762	1.98
fensulfothion-oxon-sulfone*	0.992	0.984	5761267	328414	-	6709425	2.22
fenthion	0.999	0.998	1745848531	36698051	-2283539	1967029	0.0020
fentin*	0.988	0.975	708363	45860	-2044831	936906	2.5211
fipronil*	0.993	0.985	1254932	70893	-1793963	1448334	2.1999
fipronil-desulfinyl*	0.994	0.989	13474719	655960	-	13401097	1.8957
flutriafol	0.999	0.998	82205068	1802754	-109146	101947	0.0020
fosthiazate	0.999	0.997	487749753	11352037	1028871	641967	0.0021
furathiocarb	0.999	0.997	1884829121	43751777	-3871700	2474201	0.0021
haloxyfop*	0.994	0.987	858756	43743	-1738983	893659	1,98
haloxyfop-ethoxyethylester*	0.984	0.969	190590	14384	-268223	293865	2,94
haloxyfop-methoxyethylester*	0.984	0.968	20078	1558	-17399	31828	3,02
hexaconazole	0.948	0.899	10900827	1773494	-85160	105494	0.0163
hexythiazox	0.993	0.987	148699316	7735139	-588675	437429	0.0046
imidacloprid	0.999	0.998	229290535	5082007	-287049	287392	0.0020
indoxacarb	0.995	0.989	27100090	1252699	-130414	70841	0.0041
iprovalicarb	0.999	0.998	3131578290	62786541	5306464	3550633	0.0018
kresoxim methyl	1.000	0.999	97618247	1376847	133052	77862	0.0013
linuron	0.994	0.989	204775327	9816018	648922	555104	0.0043
metalaxyl M	0.999	0.999	576059155	8496509	899757	480485	0.0013
metconazole	0.999	0.998	60374197	1122639	-10238	63486	0.0017
methamidophos	0.994	0.989	158385424	7590708	932551	429261	0.0043
methiocarb	1.000	0.999	182722654	2230763	-321013	126152	0.0011

methiocarb sulfone	0.979	0.958	63043457	5927253	654521	335191	0.0084	
methiocarb sulfoxide	0.999	0.999	1388869123	22414175	280105	1267541	0.0014	
methomyl	0.999	0.998	494079347	8827097	-576309	499180	0.0016	
methoxyfenozide	0.998	0.997	2623995111	68936158	4903952	3898399	0.0023	
metoxuron	0.999	0.997	65292633	1495318	-68889	84562	0.0020	
monocrotophos	0.998	0.996	193054701	5796101	-158145	327775	0.0027	
monolinuron	0.992	0.984	548731678	31175326	1449235	1762992	0.0051	
myclobutanil	0.995	0.990	24140050	1103312	180695	62393	0.0041	
nicosulfuron	0.998	0.996	303671379	8764484	-1166590	495639	0.0026	
omethoate*	0.995	0.989	625114	29938	-1308520	611628	1,87	
oxamyl	1.000	0.999	757695390	10566688	-205542	597555	0.0012	
phosalone	0.999	0.998	135627228	2726498	-454460	154186	0.0018	
phosmet	0.994	0.988	30300000	1510000	119000	85500	0.0044	
pirimicarb	0.999	0.998	243424468	5040427	882492	285040	0.0018	
pirimiphos methyl	0.995	0.989	186764381	8735685	-367361	494011	0.0042	
primisulfuron methyl	0.998	0.996	146046068	4297996	-449504	243055	0.0026	
procloraz	0.996	0.991	123100947	5172152	-583325	292490	0.0037	
profenofos	0.989	0.979	24398833	1601142	-53338	90546	0.0058	
propamocarb	0.998	0.996	1436389375	41237484	2638630	2332015	0.0026	
propargite	0.998	0.997	1105385285	28432734	-2190125	1607896	0.0023	
pymethrozine	0.994	0.989	205765762	9906957	-1098626	560247	0.0043	
pyraclostrobin	1.000	0.999	872015021	9247548	-765975	522957	0.0009	
pyridaben	0.990	0.981	838469131	52849775	-2162415	2988700	0.0056	
pyrifenox	0.995	0.991	362674039	15881905	-1880468	898135	0.0039	
pyrimethanil	0.992	0.983	40396770	2354194	161277	133132	0.0052	
pyriproxyfen	0.997	0.994	908484213	32850400	-3307263	1857718	0.0032	
quinoxifen	0.988	0.977	10426512	716019	-12313	40492	0.0061	
simazine	0.982	0.965	16600000	1410000	226000	79900	0.0076	
spinosad (A)	0.994	0.989	405333954	19387263	-2151173	1096366	0.0043	
spiroxamine	0.999	0.999	2020941623	34310077	-5760524	1940264	0.0015	
tebuconazole	0.955	0.911	12020584	1676253	21033	94794	0.0124	
tebufenozid	0.999	0.998	608474995	11019224	664150	623147	0.0016	
tebufenpyrad	0.999	0.999	86655916	1331536	-266058	75300	0.0014	
terbufos*	0.988	0.976	836305	52986	-2308954	1082485	2.47	
terbufos-sulfone*	0.993	0.986	2905127	158913	-4525155	3246554	2.13	
terbufos-sulfoxide*	0.993	0.986	7791829	427767	-	12128491	8739184	2.14
terbuthylazine	0.998	0.996	1372569008	40907700	1590812	2313366	0.0027	
tetraconazole	0.974	0.949	34629482	3573529	-288692	202086	0.0092	
thiacloprid	0.998	0.995	1269595645	38625093	1972050	2184282	0.0027	
thiamethoxam	0.996	0.993	304628290	11686969	458526	660908	0.0034	

thiodicarb	0.998	0.997	259870276	6492225	-9565	367141	0.0022
thiophanate methyl	0.997	0.995	839330248	26939732	-619262	1523465	0.0029
tolyfluanid	0.949	0.900	7937838	1181972	4414	66842	0.0133
triadimefon	0.988	0.977	58758193	4035275	-66823	228198	0.0061
triadimenol	0.988	0.977	76592303	5312696	-557107	300438	0.0062
triazophos	0.993	0.986	57524303	3114539	101177	176130	0.0048
trifloxystrobin	0.996	0.993	297704624	11463368	-1693277	648263	0.0034
vamidothion	0.999	0.997	529342764	11889304	451457	672350	0.0020

Πίνακας 3.1. Βασικές παράμετροι γραμμών παλινδρόμησης για τους 120 αναλύτες σε υπόστρωμα παιδικών τροφών. (συντελεστής συσχέτισης (r), και το τετράγωνο αυτού (r^2), τεταγμένη επί της αρχής (a) και εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της (S_a), κλίση της γραμμής (b), και εκτιμώμενη τυπική απόκλιση της (S_b) και η αβεβαιότητα (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι το σύνολο των αναλυτών παρουσιάζει πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης μεγαλύτερους του 0,99 για τις περισσότερες περιπτώσεις. Για τους αναλύτες diethofencarb, difenoconazole, ethoprophos, fenhexamide, fentin, haloxyfop-ethoxyethylester, haloxyfop-methoxyethylester, methiocarb sulfone, profenofos, quinoxifen, terbufos, tetraconazole ο συντελεστής γραμμικότητας ήταν 0,98 και 0.944–0.955 για τα hexaconazole, tebuconazole, tolylfluanid.

3.11.2. Ορθότητα – Πιστότητα

Η εκτίμηση της ορθότητας και πιστότητας στο εργαστήριο προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα μάρτυρα (παιδικές τροφές με βάση τα δημητριακά) για πέντε επαναλήψεις. Στο πλαίσιο αυτό, ποσότητα $5 \pm 0,05$ gr παιδικών τροφών εμβολιάστηκε σε δυο επίπεδα με γνωστές συγκεντρώσεις των αναλυτών και προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος εργασίας. Για την εκτίμηση της ορθότητας ελέγχτηκε η ανάκτηση και της πιστότητας η σχετική τυπική απόκλιση (SDr). Το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού ήταν τα 10 μg/kg με εξαίρεση τους είκοσι τρεις αναλύτες του Παραρτήματος IV των οδηγιών 2006/141/EC και 2006/125/EC για τις οποίες ήταν τα 3 μg/kg και το υψηλότερο το δεκαπλάσιο αυτού.

Η Ε.Ε⁵⁴ δέχεται ως αποδεκτές ανακτήσεις (κατά την επικύρωση) όσες είναι στην περιοχή 70-120% και αποδεκτές τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης για ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα όσες βρίσκονται κάτω από 20%. Όταν ο στόχος αυτός δεν μπορεί να επιτευχθεί είναι δυνατόν να γίνουν αποδεκτές και μικρότερες τιμές ανάκτησης οι οποίες όμως θα πρέπει να συνοδεύονται από ικανοποιητικά στοιχεία πιστότητας.

Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν (παρατίθενται στον **Πίνακα 3.2**), προκύπτει ότι οι μέσες ανακτήσεις στο χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης για τους 114 από τους 120 αναλύτες κυμάνθηκαν από 60,5-125,7% (91 αναλύτες παρουσίασαν ανακτήσεις μεταξύ 70-120 %), με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 29,7%. Στο μεγαλύτερο επίπεδο οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 56.2 – 123.1 % (108 από τους 114 αναλύτες παρουσίασαν ανακτήσεις από 70-120%) με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 26,1%. Για την πλειονότητα δηλαδή των αναλυτών οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν εντός των αποδεκτών ορίων.

Αναλύτες	R (%) 1^ο Επίπεδο	SDr 1^ο Επίπεδο	R (%) 2^ο Επίπεδο	SDr 2^ο Επίπεδο	S/N στο LOQ
acephate	69.2	21.0	79.2	5.6	13
acetamiprid	86.9	16.9	105.9	11.3	320
aldicarb	64.2	8.4	97.3	11.9	15
aldicarb sulfone	59.4	6.9	88.2	18.5	45
aldicarb sulfoxide	64.5	26.1	73.8	11.6	20
ametryn	81.3	17.3	87.1	12.8	200
atrazine	102.4	22.4	88.8	19.6	20
azimsulfuron	87.7	18.9	95.8	16.9	25
azinphos methyl	62.9	15.2	100.5	15.8	70
azoxystrobin	87.7	14.5	97.2	13.3	500
benalaxyl	82.8	14.3	88.5	12.3	25
bensulfuron methyl	56.4	16.8	97.9	18.1	100
boscalid	108.3	15.9	74.9	14.7	250
bromuconazole	79.4	25.6	82.5	20.8	20
buprofezin	90.0	19.4	102.1	16.8	84
cadusafos*	122.7	3.2	63.5	7.4	24
carbaryl	82.1	15.8	96.3	17.1	600
carbofuran	86.8	10.3	107.0	12.5	1000
carbofuran 3-Hydroxy	72.9	13.7	95.6	18.1	13
carbosulfan	68.4	17.5	85.2	20.1	495
chlorotoluron	78.6	20.1	99.9	14.3	110
clofentezine	81.8	24.4	89.3	15.2	30
cyanazine	63.2	19.8	106.9	21.0	75
cymoxanil	107.9	11.0	105.8	17.5	140
demeton-s-methyl*	84.4	7.6	84.4	7,6	17
demeton-s-methyl sulfone*	107.9	7.7	83.3	9,1	28
demeton-s-methyl sulfoxide*	111.6	11.7	72.3	3,3	50

Αναλύτες	R (%) 1 ^ο Επίπεδο	SDr 1 ^ο Επίπεδο	R (%) 2 ^ο Επίπεδο	SDr 2 ^ο Επίπεδο	S/N στο LOQ
diazinon	88.1	20.9	84.3	16.5	250
dichlorvos	45.1	14.3	95.9	18.7	15
diethofencarb	83.7	12.7	104.1	15.5	540
difenoconazole	102.9	18.3	84.5	21.2	55
dimethoate*	108.9	5.5	97.4	4.5	30
dimethomorph	100.2	20.7	84.3	18.0	13
disulfoton*	62.8	9,3	57,6	22,1	30
disulfoton-sulfone*	89.9	15.4	84.3	3.7	50
disulfoton-sulfoxide*	124.3	13.9	114	2	24
epoxiconazole	71.5	18.3	88.2	14.6	500
ethofumesate	75.3	19.5	94.7	19.7	40
ethoprophos*	116.5	6.6	94.6	5.03	150
etoxazole	108.2	16.7	70.0	19.4	751
famoxadone	70.0	19.4	72.4	14.9	40
fenamidone	105.8	18.0	94.9	21.7	75
fenbuconazole	72.6	18.7	75.0	18.6	30
fenhexamide	78.4	7.2	90.9	20.7	20
fenoxycarb	99.0	15.3	76.9	8.2	25
fenpropimorph	113.5	11.7	109.4	21.2	25
fenpyroximate	111.9	3.2	72.3	12.1	175
fensulfothion*	101.8	12.8	113.9	11.3	31
fensulfothion sulfone*	100.4	12.8	80.4	4.9	20
fensulfothion-oxon*	83.9	3.8	123.1	11	233
fensulfothion-oxon-sulfone*	118.7	8.9	120.3	18.4	342
fenthion	99.5	10.0	109.6	14.9	75
fentin*	67.5	16.1	73.8	16.5	23
fipronil*	112	6.1	100.1	8.5	67
fipronil-desulfinyl*	82.7	21.1	110.6	9.9	417

Αναλύτες	R (%) 1 ^ο Επίπεδο	SDr 1 ^ο Επίπεδο	R (%) 2 ^ο Επίπεδο	SDr 2 ^ο Επίπεδο	S/N στο LOQ
flutriafol	99.9	18.8	107.6	21.8	13
fosthiazate	83.5	10.6	108.6	13.3	600
furathiocarb	108.1	15.4	76.1	12.3	300
haloxyfop*	94.4	10.3	122.8	5.7	18
haloxyfop-ethoxyethylester*	80.9	11.8	81.9	11.2	24
haloxyfop-methoxyethylester*	80.4	24.9	76.8	10	30
hexaconazole	60.5	14.3	108.9	19.0	50
hexythiazox	74.9	10.4	87.4	24.6	10
imidacloprid	96.2	18.5	98.5	22.8	60
indoxacarb	108.0	13.5	70.7	19.1	46
iprovalicarb	86.1	18.6	87.1	11.6	850
kresoxim methyl	123.8	19.8	75.2	19.7	100
linuron	102.4	10.8	89.7	11.9	13
metalaxyl M	79.7	11.0	103.8	14.8	450
metconazole	67.2	7.6	101.7	20.4	25
methamidophos	58.8	15.3	81.5	23.7	25
methiocarb	79.2	11.4	87.5	20.6	32
methiocarb sulfone	105.3	23.5	117.1	18.4	13
methiocarb sulfoxide	68.9	3.4	102.4	21.3	320
methomyl	84.9	3.6	89.5	9.9	13
methoxyfenozide	93.3	17.1	88.7	15.1	700
metoxuron	68.3	21.2	107.1	19.8	20
monocrotophos	86.2	18.6	120.3	11.9	40
monolinuron	114.4	7.3	99.1	12.1	210
myclobutanil	72.0	14.3	96.7	21.0	25
nicosulfuron	61.1	12.9	105.6	20.9	30
omethoate*	30.2	5.6	36.8	7.8	35
oxamyl	114.3	21.2	95.2	12.4	100

Αναλύτες	R (%) 1 ^ο Επίπεδο	SDr 1 ^ο Επίπεδο	R (%) 2 ^ο Επίπεδο	SDr 2 ^ο Επίπεδο	S/N στο LOQ
phosalone	76.8	8.9	65.8	26.1	80
phosmet	56.0	21.4	99.4	27.4	20
pirimicarb	73.7	18.6	95.6	14.0	300
pirimiphos methyl	82.7	14.2	75.0	20.5	127
primisulfuron methyl	83.8	21.6	91.5	14.1	13
procloraz	108.2	14.1	69.3	17.7	130
profenofos	90.8	23.6	77.4	20.3	41
propamocarb	98.0	20.3	78.6	16.8	15
propargite	118.9	9.9	80.6	24.4	410
pymethrozone	75.8	20.7	90.6	16.0	13
pyraclostrobin	100.3	13.6	83.2	22.4	195
pyridaben	115.5	8.6	66.5	6.8	300
pyrifenoxy	91.1	18.0	93.9	16.7	48
pyrimethanil	123.5	14.7	86.3	20.1	13
pyriproxyfen	114.0	11.5	65.0	15.1	125
quinoxifen	102.7	14.8	56.2	8.4	30
simazine	85.3	25.5	80.8	18.0	10
spinosad (A)	120.0	29.7	67.1	11.4	30
spiroxamine	107.6	17.0	68.8	8.9	500
tebuconazole	88.7	19.0	82.4	24.3	13
tebufenozid	95.4	19.8	86.2	10.0	350
tebufenpyrad	88.4	24.0	68.5	24.3	19
terbufos*	91.3	20.6	95.5	4.7	13
terbufos-sulfone*	122.4	12.1	85.5	4.4	55
terbufos-sulfoxide*	121.4	9.4	87.7	3.3	50
terbuthylazine	115.3	7.3	66.6	3.1	250
tetraconazole	66.2	20.5	71.0	10.8	40
thiacloprid	86.6	14.5	103.9	10.1	400

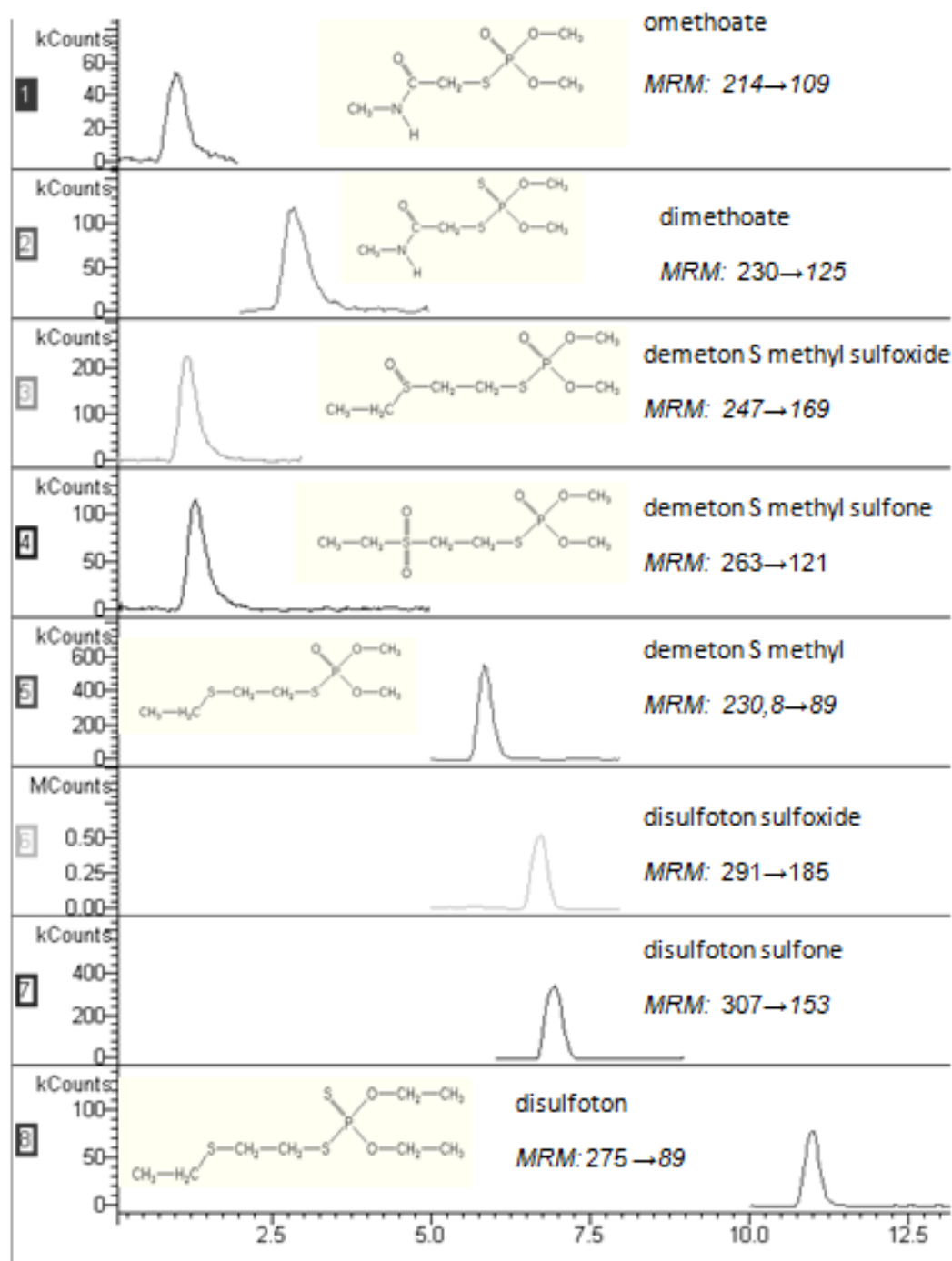
Αναλύτες	R (%) 1 ^ο Επίπεδο	SDr 1 ^ο Επίπεδο	R (%) 2 ^ο Επίπεδο	SDr 2 ^ο Επίπεδο	S/N στο LOQ
thiamethoxam	68.8	18.7	109.4	5.4	80
thiodicarb	100.1	16.0	102.0	5.6	45
thiophanate methyl	94.9	20.4	90.9	21.9	150
tolyfluanid	64.7	20.1	72.5	9.1	40
triadimefon	125.4	14.6	75.6	21.3	12
triadimenol	86.1	20.3	101.7	20.2	33
triazophos	76.8	20.9	94.5	11.3	11
trifloxystrobin	118.8	5.7	69.8	12.3	295
vamidothion	76.5	9.6	106.4	10.7	750

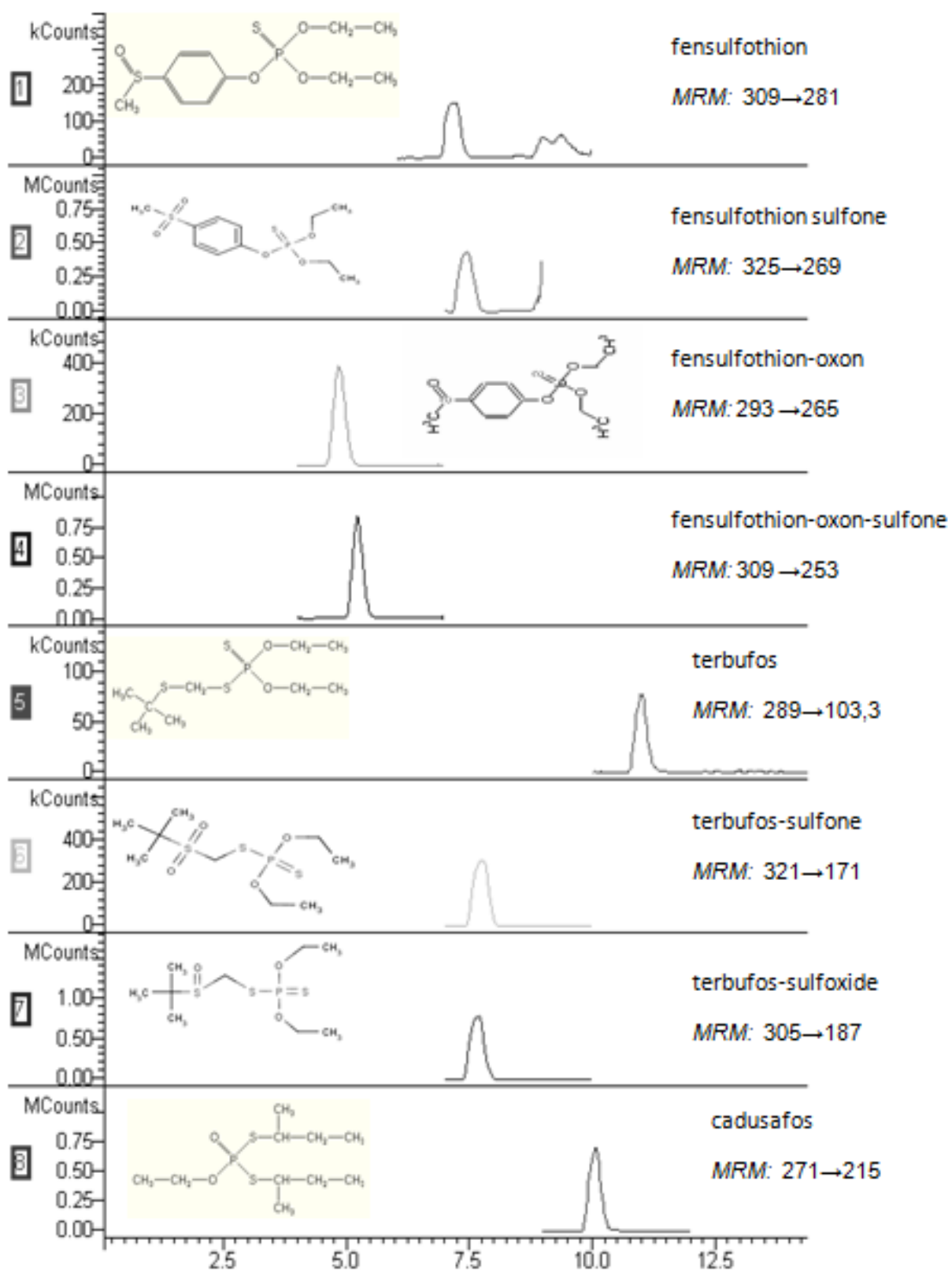
Πίνακας 3.2 Μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις (R%) για N=5 και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (SDr) των 120 αναλυτών για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού και τιμές S/N για το LOQ.

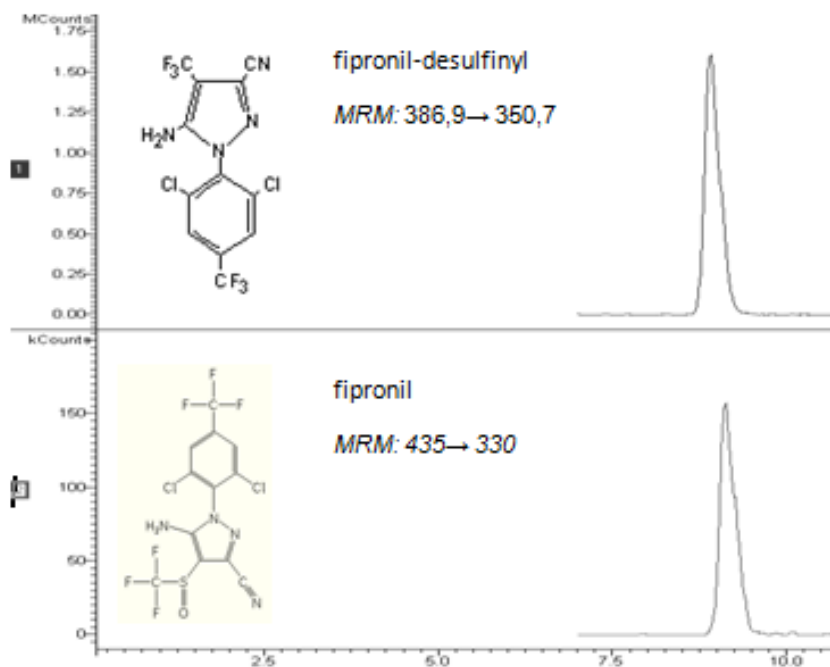
Όπως εμφανίζεται στον **Πίνακα 3.2** για είκοσι τρεις αναλύτες οι μέσες τιμές ανάκτησης είναι είτε μικρότερες του 70% (16 αναλύτες) ή μεγαλύτερες του 120% (7 αναλύτες), όμως παρουσιάζουν καλές τιμές πιστότητας (σχετικής τυπικής απόκλισης), με αποτέλεσμα τα στοιχεία τους να θεωρούνται αποδεκτά⁵⁴. Για τους αναλύτες αυτούς, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ταυτοποίησή τους σε δείγματα ή για τον ημιποσοτικό προσδιορισμό τους μετά από τη διόρθωση των αποτελεσμάτων τους ως προς την ανάκτηση. Για τους αναλύτες acephate, aldicarb sulfoxide, metoxuron, phosmet, tetraconazole, tolyfluanid και omethoate στους οποίους παρατηρήθηκαν τιμές ανακτήσεων και σχετικής τυπικής απόκλισης εκτός των αποδεκτών ορίων η μέθοδος δεν θεωρείται κατάλληλη για τον αξιόπιστο προσδιορισμό τους σε παιδικές τροφές.

3.11.3. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα, δηλαδή με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα. Η παράμετρος που ελέγχθηκε είναι το σήμα/θόρυβος (S/N). Στο LOQ πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10^{54}$. Στο **Σχήμα 3.6** απεικονίζονται χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος παιδικής τροφής με διάφορους αναλύτες στο LOQ. Σύμφωνα με τα παραπάνω το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίστηκε ως το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού, δηλαδή τα 10 ή 3 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ανάλογα με τον αναλυτή. Οι τιμές του S/N στο LOQ παρουσιάζονται στον **Πίνακα 3.3**.





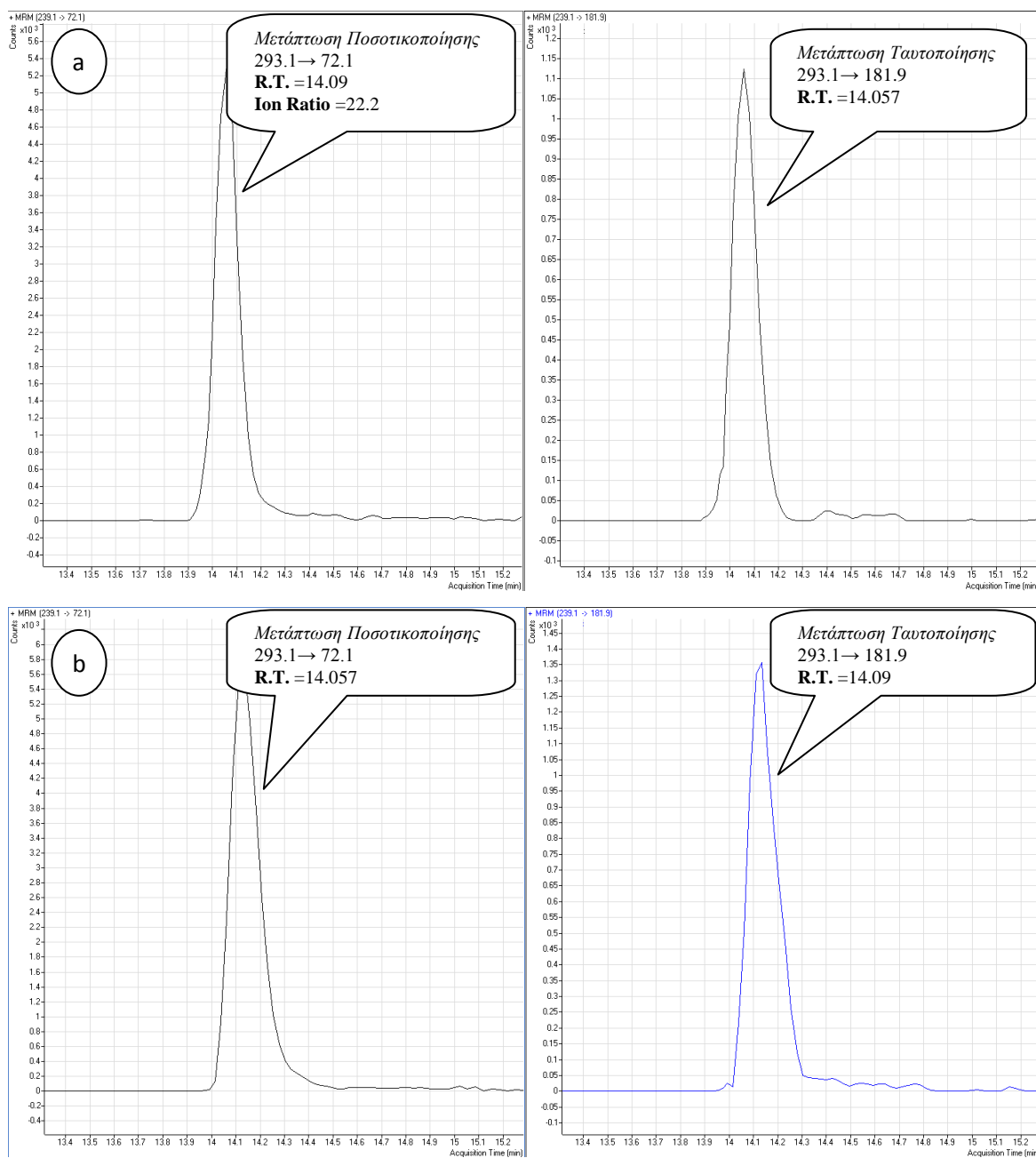


Σχήμα 3.6. Χρωματογραφήματα μεταπτώσεων ποσοτικοποίησης σε σύστημα LC-MS/MS προτύπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 3 µg/kg σε υπότρωμα παιδικών τροφών (φαίνονται οι αναλύτες: omethoate, dimethoate, demeton S methyl sulfoxide, demeton S methyl sulfone, demeton S methyl, disulfoton sulfoxide, disulfoton sulfone, disulfoton, fensulfothion, fensulfothion sulfone, fensulfothion-oxon, fensulfothion-oxon-sulfone, terbufos, terbufos-sulfone, terbufos-sulfoxide, cadusafos, fipronil and fipronil desulfinyl).

3.12. Ανάλυση δειγμάτων

Η νέα μέθοδος που αναπτύχθηκε δοκιμάστηκε σε ανάλυση πραγματικών δειγμάτων παιδικών τροφών, στα πλαίσια του προγράμματος των Επισήμων ελέγχων της Ε.Ε. Στο πλαίσιο αυτό, αναλύθηκαν συνολικά εξήντα ένα δείγματα παιδικών τροφών με βάση τα δημητριακά (rice cereal, farine lactée, biscuit purée, cereal purée, and baby food desserts).

Σε δυο από τα παραπάνω δείγματα ανιχνεύτηκαν οι ουσίες pirimicarb και fenproprymorph σε συγκεντρώσεις κάτω του LOQ της μεθόδου. Το χρωματογράφημα του δείγματος για τον αναλύτη pirimicarb απεικονίζεται στο **Σχήμα 3.7**.



Σχήμα 3.7. Χρωματογραφήματα μεταπτώσεων ποσοτικοποίησης και ταυτοποίησης του αναλύτη pirimicarb σε σύστημα LC-MSMS, (α) δείγματος παιδικής τροφής συγκέντρωσης και (β) προτύπου διαλύματος σε υπόστρωμα παιδικών τροφών συγκέντρωσης 3 μg/kg

Η ποσοτικοποίηση του αναλύτη πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της απευθείας σύγκρισης με ένα διάλυμα προτύπου (single point calibration). Με την τεχνική αυτή επιτυγχάνεται ακριβέστερη ποσοτική μέτρηση σε σχέση με άλλες τεχνικές όταν οι συγκεντρώσεις που συγκρίνονται είναι παραπλήσιες και η ευαισθησία του ανιχνευτή δεν είναι πολύ σταθερή σε βάθος χρόνου. Το πρότυπο διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε στη μέτρηση ήταν σε υπόστρωμα παιδικής τροφής και η απόκριση του ανιχνευτή του προτύπου με το δείγμα δεν διέφεραν πάνω από $\pm 50\%$.

3.13. Συμπεράσματα

Μία νέα, εύχρηστη, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών προϊόντων διαφόρων με ποικίλες χημικές δομές (συμπεριλαμβανομένων και αυτών που θεσπίζονται από τη νομοθεσία της Ε.Ε. για την παρουσία τοξικών ουσιών σε παιδικές τροφές) αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε εργαστηριακά. Η μέθοδος παρουσιάζει καλή ορθότητα και πιστότητα με ανακτήσεις που κυμαίνονται από 56,2-125,7% και τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες του 29,7%. Για την πλειονότητα των αναλυτών παρατηρείται εξαιρετική γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης μεγαλύτερους του 0,99. Ο στόχος αυτός επιτεύχθηκε με την τροποποίηση της τεχνικής επεξεργασίας δείγματος QuEChERS και την ανάπτυξη μιας εντελώς νέας πολυπολεμιματικής μεθόδου ανίχνευσης σε σύστημα LC-MS/MS. Με το τρόπο αυτό έγινε δυνατή η ανίχνευση αναλυτών που έως τώρα απαιτούσαν ειδικές συνθήκες είτε εκχύλισης (haloxyfor και εστέρες του) ή ανάλυσης (fentin). Η μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων αγοράς στα οποία ανιχνεύτηκε η παρουσία υπολειμμάτων. Από τα 61 αναλυθέντα δείγματα παιδικών τροφών τα 2 βρέθηκαν θετικά στην παρουσία υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων pirimicarb και fenpropymorph, όμως σε συγκεντρώσεις κάτω του LOQ της μεθόδου.

4. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δείγματα ζωοτροφών και γάλακτος από διάφορες περιοχές της Ελλάδας

4.1. Εισαγωγή

Η παραγωγή των περισσότερων φυτικών προϊόντων σε εμπορική κλίμακα προϋποθέτει τη χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αποτελούν ένα ιδιαίτερα σημαντικό (και αναγκαίο) εργαλείο για την καταπολέμηση εχθρών και ασθενειών των καλλιεργειών, αυξάνοντας έτσι στο πολλαπλάσιο την αγροτική παραγωγή. Το οικονομικό τους όμως όφελος εγκυμονεί κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον. Η πλειονότητα των ζωοτροφών που διατίθενται προς κατανάλωση στην αγροτική παραγωγή περιέχουν υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων⁸⁰ τα οποία συσσωρεύονται στον οργανισμό των ζώων που τα καταναλώνουν⁸¹. Μετά την εισαγωγή τους στον οργανισμό, οι ουσίες με λιπόφιλο χαρακτήρα απορροφούνται από το γαστρεντερικό σύστημά τους και συσσωρεύονται σε ιστούς με υψηλή περιεκτικότητα λίπους, όπως ο επιδερμικός λιπώδης ιστός, ο εγκέφαλος, το συκώτι, τα νεφρά και τα γάλα. Στην περίπτωση αυτή δεν αναφερόμαστε σε απλή υπολειμματικότητα αλλά βιοσυσσωρευση των ουσιών αυτών στην πορεία της τροφικής αλυσίδας.

Το γάλα, βασικό προϊόν για την διατροφή των παιδιών, αποτελεί μια σημαντική πηγή συσσωρευσης των ουσιών αυτών. Κύρια πηγή μόλυνσης του γάλακτος είναι η κατανάλωση ζωοτροφών ρυπασμένων με φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Άλλοι παράγοντες ρύπανσης προέρχονται από την περιβαλλοντική μόλυνση, τη χορήγηση φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ζώα (για την καταπολέμηση παρασίτων) ή/και ατυχήματα. Συνεπώς, ως η καλύτερη ενέργεια πρόληψης της ρύπανσης του γάλακτος θεωρείται ο συστηματικός έλεγχος της ποιότητας των ζωοτροφών. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να επισημανθεί ότι σύμφωνα με στοιχεία της EFSA (Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων) αν και οι ζωοτροφές είναι επιβαρυνμένες με τις ουσίες αυτές, στα ζώα δεν υφίσταται άμεσος κίνδυνος οξείας τοξικότητας μέσω κατανάλωσης τροφής⁸².

Η παρουσία υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο γάλα των μηρυκαστικών αποτελεί θέμα δημόσιας υγείας αφού το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα καταναλώνονται σε μεγάλο βαθμό από ανθρώπους κάθε ηλικίας και κυρίως βρέφη και μικρά παιδιά. Παρότι στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει πληθώρα αναφορών που πιστοποιεί την παρουσία υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο αγελαδινό γάλα^{83,84,85,86} είναι ελάχιστες οι μελέτες με αντικείμενο την παρουσία τους στο γάλα των μικρών μηρυκαστικών (αιγοπροβάτων).

4.2. Πειραματικό Σχέδιο

Από 10 αγροκτήματα αιγών και 10 αγροκτήματα προβάτων συλλέχθηκαν συνολικά 100 δείγματα γάλακτος κατά την περίοδο Ιανουάριος-Φεβρουάριος 2009, περίπου 3 μήνες μετά τον τοκετό. Στις κτηνοτροφικές μονάδες που διενεργήθηκε η δειγματοληψία εφαρμόζοταν συμβατική κτηνοτροφία η οποία αποτελεί τον πλέον διαδεδομένο τρόπο εκτροφής στην Ελλάδα. Η διατροφή των ζώων βασιζόταν στη χορήγηση συμπληρωματικής διατροφής, με εξαίρεση την περιορισμένη βοσκή κατά τους μήνες Μάρτιο-Απρίλιο. Η συμπληρωματική διατροφή περιλαμβάνει τη χορήγηση μηδικής, άχυρου σίτου, θαμνώδης & χλωρά νομή και συμπυκνωμένη ζωοτροφή. Κατά τη βοσκή οι αίγες τρέφονταν σε δασώδεις βοσκοτόπους με μεγάλη ποικιλία θάμνων και δέντρων όπως: *Quercus coccifera*, *Pyrus amygdaliformis*, *Arbutus unedo*, *Spartum junceum*, *Phlomis fruticosa* και *Olea europaea*. Τα συμπληρώματα συμπυκνωμένης ζωοτροφής ήταν μίγματα από καλαμπόκι, κριθάρι, βρώμη, σιτάρι, σόγια, πίτουρα σίτου εμπλουτισμένα με βιταμίνες και μεταλλικά στοιχεία.

4.3. Υλικά και Αντιδραστήρια

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
2. Ακετόνη, καθαρότητας Pestiscan(Lab Scan).
3. Τολουόλιο, καθαρότητας Pestiscan(Lab Scan).
4. 2,2,4 Τριμεθυλοπεντάνιο, καθαρότητας Pestiscan(Lab Scan).
5. Οξικός αιθυλεστέρας, Pestiscan(Lab Scan).
6. Κυκλοεξάνιο, Pestiscan(Lab Scan).
7. Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (Fluka).
8. Χλωριούχο νάτριο (ACS reagent grade ≥ 99.0 %).
9. Διένυδρο υδρο κιτρικό νάτριο (Sigma-Aldrich).
10. Τετραένυδρο όξινο κιτρικό νάτριο (Fluka).
11. Θειικό Νάτριο (Fluka).
12. Μυρμηκικό Αμμώνιο (Fluka).
13. Πρωτοταγής-Δευτεροταγής αμίνη (Bondesil-PSA 40 μ m) (Varian Inc).
14. Φιάλες φυγοκέντρου των 50mL από teflon με βιδωτό πώμα.
15. Φιάλες φυγοκέντρου των 15mL από polypropylene με βιδωτό πώμα.

16. Γυάλινα φιαλίδια των 8 mL με πώμα από teflon (PTFE).
17. Ήλιο (He), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
18. Άζωτο (N₂), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
19. Συνθετικός αέρας, ελεύθερος υδρογονανθράκων.
20. Υδρογόνο (H₂), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
21. Εκατόν πενήντα πρότυπα υλικά αναφοράς γνωστής καθαρότητας (Dr Ehrenstorfer Laboratories GmbH /Chem Service, Inc) acephate, acetamiprid, aclonifen, acrinathrin, aldicarb, aldicarb sulfone, aldicarb sulfoxide, aldrin, ametryn, atrazine, azimsulfuron, azinphos methyl, azoxystrobin, benalaxyl, bensulfuron methyl, BHC α, BHC β, bifethrin, bitertanol A, bitertanol B, boscalid, bromopropylate, bromuconazole, bupirimate, buprofezin, cadusafos, carbaryl, carbofuran, carbofuran 3-hydroxy, carbosulfan, chlordane a, chlorfevinphos, chlorpropham, chlortoluron, clofentezin, cyanazine, cyfluthrin, cymoxanil, cypermethrin, DDD pp, DDE pp, DDT pp, Deltamethrin, demeton-S-methyl, demeton-S-methyl sulfoxide, diazinon, dichlorvos, dicofol op, dicofol pp, dieldrin, diethofencarb, difenoconazole, dimethoate, dimethomorph, endosulfan a, endosulfan b, endosulfan sulfate, endrin, epoxiconazole, esfenvalerate, ethofumesate, etoxazole, famoxadone, fenamidone, fenbuconazole, fenhexamid, fenoxycarb, fenpropathrin, fenpyroximate, fenthion, fenvalerate, fosthiazate, furathiocarb, heptachlor, hexachlorobenzene, hexaconazole, hexythiazox, imidacloprid, indoxacarb, iprovalicarb, kresoxim methyl, lamda cyhalothrin, lindane, linuron, malathion, metalaxyl M, metconazole, methacrifos, methamidophos, methidathion, methiocarb, methiocarb sulfone, methiocarb sulfoxide, methomyl, methoxyfenozide, metoxuron, monocrotophos, monolinuron, myclobutanil, naled, nicosulfuron, omethoate, oxamyl, parathion methyl, permethrin, phosalone, phosmet, pirimicarb, pirimiphos methyl, primisulfuron methyl, procloraz, profenofos, propachlor, propamocarb, propargite, propyzamide, pyraclostrobin, pyrifenox, pyriproxyfen, quinoxyfen, quintozone, sethoxydime, simazine, spinosad, spiroxamine, tau-fluvalinate, tebuconazole, tebufenozide, tebufenpyrad, terbuthylazine, tetraconazole, tetradifon, thiacloprid, thiamethoxam, thiodicarb, thiophanate methyl, tolyfluanid, triadimefon, triadimenol, triazophos, trifloxystrobin, vamidothion, vinclozolin

4.4. Εξοπλισμός

1. Φυγόκεντρος τουλάχιστον 4000 στροφών / min.
2. Συσκευή υπερήχων
3. Αναδευτήρας Vortex mixer (K-550-GE, Scientific industries inc. Bohemia).
4. Περιτροφικός εξατμιστήρας
5. Υγροχρωματογράφος με σύστημα 2 αντλιών Varian Prostar 210, αυτόματο δειγματολήπτη Prostar 420 -100 θέσεων, συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας τριπλού τετράπολου Varian 1200L, με πηγή ηλεκτροδιάχυσης (ESI) με δυνατότητα λειτουργίας θετικού ή αρνητικού ιονισμού. Για τον έλεγχο του συστήματος, τη συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Varian MS Workstation software version 6.8.
6. Αεριοχρωματογράφος με 2 εγχυτές τύπου splitless, τριχοειδείς στήλες, 30m, 0,32 mm και πάχους υμένα 0,25 μm των παρακάτω τύπων: α) DB-5MS συνδεδεμένη με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) και β) DB-17 συνδεδεμένη με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD). Για τον έλεγχο του συστήματος, τη συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chemstation Rev. B.03.02.
7. Αεριοχρωματογράφος με 2 εγχυτές τύπου splitless, τριχοειδείς στήλες, 30m, 0,32 mm και πάχους υμένα 0,25 μm των παρακάτω τύπων: α) DB-5MS συνδεδεμένη με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) και β) DB-17 συνδεδεμένη με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Για τον έλεγχο του συστήματος, τη συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Chemstation Rev. B.03.02.
8. Αεριοχρωματογράφος με εγχυτή τύπου θερμοκρασιακά προγραμματιζόμενης εξαέρωσης (PTV), στήλη τύπου Factor Four Capillary Column VF-5 ms (30×0.25 mm I.D.×0.25 μm film thickness) με προστήλη (fused silica untreated capillary column 5×0.53 mm I.D. cyano-phenyl-methyl deactivated) (Varian Inc.) συνδεδεμένος με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου (MS/MS), για λειτουργία με τις τεχνικές ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) και χημικού ιοντισμού (CI) και τεχνική λειτουργίας ταυτόχρονης παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων, με εύρος λειτουργίας 50-1000 amu.
9. Σύστημα χρωματογραφίας πηκτής της Knauer (Knauer GPC cleanup Unit 6500 system), το οποίο αποτελείται από ανιχνευτή UV (Smartline UV detector 25000 ρυθμισμένο σε μήκος κύματος 254 nm, αντλία 2 καναλιών (Smartline pump 1000 binary pump), αναμίκτη κινητής φάσης (SmartMix Mixer), εισαγωγή δείγματος πολλαπλών θέσεων (Smartline Assistant 6000 with two built-in K-16

valve drives) και γυάλινη χρωματογραφική στήλη 400×25 mm I.D με προσροφητικό υλικό Bio-Beads SX-3. Για τον έλεγχο του συστήματος, τη συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ChromGate V3.1.7 Knauer instrument control.

4.5. Επιλογή αναλυτών

Για την επικύρωση της μεθόδου ανάλυσης των ζωοτροφών επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικοί αναλύτες διαφόρων χημικών κατηγοριών έτσι ώστε να είναι εφικτή η ανάδειξη του πολυδύναμου της μεθόδου (δηλαδή την ικανότητα της να επεκτείνεται σε άλλους αναλύτες της κατηγορίας). Οι αναλύτες που επιλέχθηκαν έχουν εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων (διαλυτότητα σε νερό, τάση ατμών, $\log P_{ow}$) που καλύπτει όλο το εύρος τιμών των φυσικοχημικών ιδιοτήτων όλων των ενώσεων της κατηγορίας που ανήκουν. Οι αναλύτες που επιλέχθηκαν ανήκουν στις παρακάτω κύριες κατηγορίες: οργανοφωσφορικά, οργανοχλωριωμένα, πυρεθρινοειδή, τριαζίνες, τριαζόλες, δινιτροανιλίνες, αμίδια, βενζιμιδαζόλες, καρβαμιδικά, βενζυλουρίες, φαινυλουρίες, στρομπυλουρίες, νεονικοτινοειδή και άλλες μικρότερες. Οι αναλύτες που χρησιμοποιήθηκαν φαίνονται στον **Πίνακα 4.1**.

Για την επικύρωση της μεθόδου ανάλυσης του λίπους επιλέχθηκαν αναλύτες οι οποίοι λόγω των ιδιοτήτων τους (υψηλή σταθερότητα και μικρή πολικότητα) βιοσυσσωρεύονται στους ζωικούς οργανισμούς. Οι αναλύτες αυτοί ανήκουν κυρίως στις ομάδες των οργανοφωσφορικών, οργανοχλωριωμένων και πυρεθρινών και συμπεριλαμβάνονται στον **Πίνακα 4.2**.

4.6. Παρασκευή Προτύπων διαλυμάτων Παρακαταθήκης

Τα διαλύματα παρακαταθήκης της τάξης των 500-1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ παρασκευάστηκαν σε ακετόνη και σε ελάχιστες περιπτώσεις σε μεθανόλη (ανάλογα με την διαλυτότητα του κάθε αναλύτη). Αποθηκεύτηκαν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ εντός ειδικών υάλινων φιαλιδίων με πώμα από Teflon, έτσι ώστε να παραμένουν σταθερά για χρονικό διάστημα 3 ετών. Η ζύγιση της καθαρής δραστικής ουσίας για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών, ενώ ελήφθη υπόψη και ο βαθμός καθαρότητας τους. Ένα διάλυμα εργασίας στο οποίο εμπεριέχονται όλες οι παραπάνω ουσίες παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση $1\ \mu\text{g}/\text{mL}$ μεθανόλης εάν προοριζόταν για ανάλυση με LC ή 2,2,4 τριμεθυλοπεντάνιο-τολουολίου (90:10) όταν προοριζόταν για ανάλυση με GC.

4.7. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας

Για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας των προτύπων σε υπόστρωμα από ζωοτροφή ή λίπος, στα οποία προηγουμένως είχε πιστοποιηθεί η απουσία υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Ένα τμήμα (1 mL) από το εκχύλισμα του μάρτυρα εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου και προστέθηκε 1 mL από το πρότυπο διάλυμα αναφοράς στην επιθυμητή συγκέντρωση. Το διάλυμα τοποθετήθηκε για 30sec σε λουτρό υπερήχων για καλύτερη διαλυτοποίηση, τοποθετήθηκε σε φιαλίδιο των 2mL, πωματίστηκε με πόμα PTFE, πλέον έτοιμο για χρωματογραφική ανάλυση. Στα εκχυλίσματα που αναλύθηκαν με LC προηγήθηκε διήθηση από φίλτρο τύπου syringe filter 0,45μm μέσα σε φιαλίδιο των 2mL.

4.8. Μέθοδος Εκχύλισης

4.8.1. Μέθοδος επεξεργασίας ζωοτροφών

Η μέθοδος εκχύλισης βασίστηκε στη μέθοδο QuEChERS^{65,70,78,79}. Συγκεκριμένα, σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL προστέθηκαν διαδοχικά $5 \pm 0,05$ g (m_s) συμπυκνωμένης ζωοτροφής ή $2 \pm 0,02$ g (m_s) ζωοτροφής υπό την μορφή χλωρής νομής και 10 mL κρύου νερού ($< 4^\circ\text{C}$), για να αντισταθμίσει την ανάπτυξη θερμότητας που προκαλείται από την προσθήκη των αλάτων. Μετά από ανακίνηση για 1 min σε Vortex mixer προστέθηκαν 10 mL (V_1) ακετονιτρίλιο, το μίγμα ανακινήθηκε έντονα με το χέρι για 1 min. και προστέθηκε μίγμα αλάτων από τα παρακάτω συστατικά:

- ✓ 4 g \pm 0.2 g άνυδρο θευκό μαγνήσιο,
- ✓ 1 g \pm 0.05 g χλωριούχο νάτριο,
- ✓ 1 g \pm 0.05 g διένυδρουδρο κιτρικό νάτριο
- ✓ 0.5 g \pm 0.03 g τετραένυδρο όξινο κιτρικό νάτριο

Μετά από ανακίνηση με το χέρι για 1 min η φιάλη φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές/ min για 5 min. Ένα τμήμα (8 mL) από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL και τοποθετήθηκε για τουλάχιστον 2 ώρες σε καταψύκτη για να καθιζάνουν τα συνεκχυλίσματα που έχουν μικρή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο. Στην συνέχεια, 6 mL από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκαν σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL η οποία περιείχε 250 mg PSA και 750 mg MgSO₄. Ακολούθησε έντονη ανακίνηση με το χέρι για 1 min και φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές/ min για 5 min, οπότε ένα τμήμα (5 mL) του υπερκείμενου υγρού μεταφέρθηκε σε

φιαλίδιο των 8 mL και αφού προστέθηκαν 0.05 mL διαλύματος μυρμηκικού οξέος 5%, το τελικό διάλυμα τοποθετήθηκε στην κατάψυξη μέχρι τη χρωματογραφική ανάλυση.

Για ανάλυση σε σύστημα LC-MS/MS, 2 mL (V_2) από το τελικό εκχύλισμα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδια των 8mL εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού και διαλύθηκαν σε 1 mL (V_3) μεθανόλης-νερού (30:70). Η διάλυση πραγματοποιήθηκε ως εξής: Το ξηρό υπόλειμμα διαλυτοποιήθηκε σε 0,3 mL μεθανόλης, αναδεύτηκε σε υπερήχους για 30 s, προστέθηκαν 0,7 mL H₂O και αναδεύτηκαν σε υπερήχους για 30 s. Πριν από την χρωματογραφική ανάλυση έγινε διήθηση από φίλτρο τύπου syringe filter (PTFE) 0,45μm μέσα σε φιαλίδιο των 2 mL, με πώμα PTFE.

Όσον αφορά την χρωματογραφική ανάλυση σε σύστημα GC και GC-MS/MS, 2 mL (V_2) από το τελικό εκχύλισμα μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο των 8 mL, εξατμίστηκαν μέχρι ξηρού, διαλυτοποιήθηκαν σε 1 mL (V_3) 2,2,4 τριμεθυλοπεντανίου-τολουολίου (90:10) και αναδεύτηκαν σε υπερήχους για 30 s. Το τελικό δ/μα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 2 mL που πωματίζεται με PTFE.

4.8.2. Μέθοδος επεξεργασίας λίπους του γάλακτος

Οι υπό μελέτη αναλύτες χαρακτηρίζονται από τη λιποφιλικότητα και την τάση τους να βιοσυσσωρεύονται στο λίπος. Έτσι, η μέθοδος που αναπτύχθηκε εστιάζεται κατά κύριο λόγο στην απομόνωσή τους από το λίπος.

Σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL ζυγίστηκε $1 \pm 0,01$ g (m_s) λίπους και αφού προστέθηκαν 5 mL ($V_1/2$) οξικού αιθυλεστέρα, το μίγμα ανακινήθηκε με το χέρι για 1 min. Στη συνέχεια προστέθηκαν 5 mL ($V_1/2$) κυκλοεξανίου, ανακινήθηκαν με το χέρι για 1 min, προστέθηκαν 10 gr άνυδρου Na₂SO₄, ανακίνηση με το χέρι για 1 min και τέλος φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές/min για 5 min. Ένα τμήμα 5 mL από υπερκείμενο (V_2) μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 8 mL και εγχύθηκε σε σύστημα χρωματογραφίας πηκτής για απομάκρυνση του λίπους (το στάδιο αυτό αναπτύσσεται εκτενώς στην επόμενη παράγραφο). Το κλάσμα που συλλέχθηκε μετά τον καθαρισμό εξατμίστηκε μέχρι ξηρού σε περιστρεφόμενη συσκευή εξάτμισης υπό κενό (40°C), διαλυτοποιήθηκε σε 0,5 (V_3) mL μείγμα ισοοκτανίου/τολουολίου (9:1) και αναδεύτηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 s. Το τελικό εκχύλισμα μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 2 mL με πώμα PTFE και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη μέχρι την έγχυσή του σε σύστημα GC με ανιχνευτές ECD, NPD και MS/MS.

Καθαρισμός του εκχυλισμένου δείγματος

Τμήμα 5 mL από το υπερκείμενο εγχύθηκαν σε σύστημα χρωματογραφίας πηκτής (GPC) με τον παρακάτω προγραμματισμό:

Ρυθμίσεις αντλίας: ροή 5 mL/min, διαλύτης έκλουσης A ο οξικός αιθυλεστέρας και διαλύτης έκλουσης B το κυκλοεξάνιο. Χρησιμοποιήθηκε ισοκρατικό πρόγραμμα έκλουσης: οξικός αιθυλεστέρας : κυκλοεξάνιο (1:1).

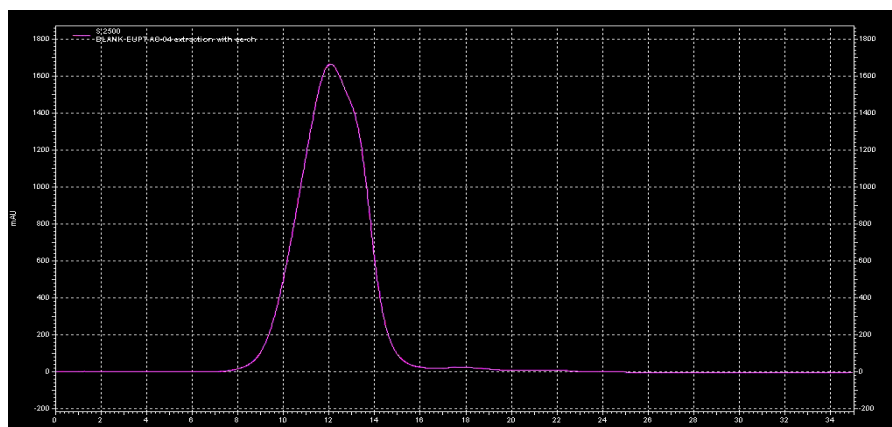
Ρυθμίσεις ανιχνευτή υπεριώδους: μήκος κύματος ανίχνευσης 254 nm.

Ρυθμίσεις αυτόματου δειγματολήπτη: όγκος έγχυσης 5 mL, μέθοδος έγχυσης ολικής πλήρωσης βρόγχου, χρόνος προγραμματισμού: 35 min.

Ρυθμίσεις του αυτόματου συλλέκτη κλασμάτων: χρησιμοποιήθηκε ως πρόγραμμα συλλογής το παρακάτω σχήμα:

Χρόνος (min.)	Ενέργειες
0	Εξισορρόπηση
1	Απόρριψη κλάσματος
18	Έναρξη συλλογής κλάσματος
32	Τέλος συλλογής κλάσματος
35	Τέλος έγχυσης

Το καθαρισμένο από το GPC κλάσμα συλλέχθηκε σε σφαιρική φιάλη των 250 mL. Στο **Σχήμα 4.1** απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα συστήματος χρωματογραφίας πηκτής από το δείγμα του ζωικού λίπους με ανιχνευτή UV σε φάσμα απορρόφησης 254 nm. Όπως είναι φανερό η πλειονότητα του λίπους εκλούεται από τα 8 ως τα 16 λεπτά, με αποτέλεσμα η περιοχή αυτή να απορριφθεί. Οι αναλύτες στόχοι εκλούνται μετά τα 18 λεπτά.



Σχήμα 4.1. Χρωματογράφημα συστήματος χρωματογραφίας πηκτής δείγματος ζωικού λίπους με ανιχνευτή UV σε φάσμα απορρόφησης 254nm

4.9. Προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία

Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια δυο συστημάτων αέριας χρωματογραφίας Agilent 6890, έκαστο των οποίων απαρτίζεται από:

Σύστημα Α: Δυο εγχυτές σε λειτουργία μη διαμερισμού δείγματος (splitless), στήλη τύπου DB-5-MS (30 m, 0.32mm i.d. and 0.25 μm film thickness), η οποία συνδέεται με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) και στήλη τύπου DB-17 MS (30 m, 0.3mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD).

Σύστημα Β: Δυο εγχυτές σε λειτουργία μη διαμερισμού δείγματος (splitless), στήλη τύπου DB-5-MS (30 m, 0.32mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) και στήλη τύπου DB-17 MS column (30 m, 0.3mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

Το κοινό θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου ήταν το παρακάτω:

Από αρχική θερμοκρασία 70°C (παραμονή για 1 λεπτό) στους 180°C με ρυθμό ανόδου 30 °C/λεπτό, αύξηση στους 230 °C με ρυθμό 1,8 °C/λεπτό, αύξηση στους 280 °C με ρυθμό 30 °C/λεπτό και παραμονή εκεί για 30 λεπτά. Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε το ήλιο (He) με ροή 1,5 mL/λεπτό (και για τις 2 στήλες και στα 2 συστήματα). Η θερμοκρασία των εγχυτών ρυθμίστηκε στους 230 °C, ενώ το υδρογόνο (H₂) και συνθετικός αέρας (Air) χρησιμοποιήθηκαν ως καύσιμο για τον ανιχνευτή NPD. Οι θερμοκρασία των ανιχνευτών ρυθμίστηκε στους 310 °C και εγχύθηκε συνολικός όγκος 1 μL από το τελικό εκχύλισμα.

4.10. Προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου

Ο διαχωρισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με στήλη τύπου Factor Four Capillary Column VF-5 ms (30×0.25 mm I.D.×0.25 μm film thickness) με προστήλη (fused silica untreated capillary column 5×0.53 mm I.D. cyano-phenyl-methyl deactivated). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου περιλάμβανε: Από αρχική θερμοκρασία 70°C (παραμονή για 2 λεπτά), άνοδος στους 180°C με ρυθμό ανόδου 30°C/ λεπτό, άνοδος στους 230°C με ρυθμό 1,8°C/ λεπτό, άνοδος στους 280° C με ρυθμό 30° C/ λεπτό.

Εγχύθηκαν 5 μL του τελικού εκχυλίσματος σε λειτουργία split ως εξής:

0 min	Split on, 60:1
0,75 min	Split off
3 min	Split on, 50:1
6 min	Split 10:1

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του εγχυτή περιλάμβανε: 90°C (παραμονή για 0,75 λεπτά) άνοδος στους 280°C με ρυθμό $200^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$ και κάθοδος στους 90°C με ρυθμό $200^{\circ}\text{C}/\text{λεπτό}$.

Οι βασικές παράμετροι του φασματομέτρου μάζας ρυθμίστηκαν ως εξής:

- ✓ θερμοκρασία πηγής: 250°C ,
- ✓ θερμοκρασία διασυνδετή 280°C ,
- ✓ καθυστέρηση ενεργοποίησης filament: 6 min.
- ✓ αέριο κελιού θραυσματοποίησης: Αργό καθαρότητας 99.999 %, 0,2Pa.
- ✓ τάση ανιχνευτή: 1500Volt.
- ✓ τεχνική ιονισμού: Πρόσκρουση ηλεκτρονίων σε θετικό ιονισμό (EI^+)
- ✓ χρόνος συλλογής μεταπτώσεων: 10-50 msec ανάλογα με τον αναλύτη.
- ✓ ενέργεια θραυσματοποίησης: Αναγράφονται στον **Πίνακα II του Παραρτήματος** και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.

4.11. Προσδιορισμός με γρήγορη χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου

Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2.1mm και μεγέθους σωματιδίων 5 μm . Η θερμοκρασία της στήλης ήταν ίδια με αυτήν του περιβάλλοντος ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$).

Ως διαλύτης έκλυσης A χρησιμοποιήθηκε μίγμα μεθανόλης:νερού (10:90), 1mM HCOONH_4 και ως διαλύτης έκλυσης B μίγμα μεθανόλης:νερού (90:10), 1mM HCOONH_4 . Η ροή του διαλύτη έκλυσης ήταν σταθερή 0,25 mL/min.

Ως πρόγραμμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω σχήμα:

Χρόνος (min)	%A	%B
0,00	90,0	10,0
14,00	0,0	100,0
20,00	0,0	100,0
20,12	90,0	10,0
30,00	90,0	10,0

Εγχύθηκαν 10 μ L του τελικού εκχυλίσματος του δείγματος στο LC. Για την αποφυγή του φαινομένου μολύνσεων ο αυτόματος δειγματολήπτης εκπλύθηκε -πριν από κάθε έγχυση- με διάλυμα μεθανόλης:νερού (50:50).

Οι βασικές παράμετροι του φασματόμετρου μάζας ρυθμίστηκαν ως εξής:

- ✓ Θερμοκρασία πηγής ιονισμού: 250 °C
- ✓ Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης: 250 °C
- ✓ Αέριο ξήρανσης και εκνέφωσης: Άζωτο υψηλής καθαρότητας.
- ✓ Πίεση αερίου ξήρανσης: 18psi
- ✓ Πίεση αερίου εκνέφωσης: 55psi
- ✓ Αέριο κελιού θραυσματοποίησης: Αργό καθαρότητας 99.999 %, 0,2Pa.
- ✓ Τάση ανιχνευτή: 1500Volt.
- ✓ Τεχνική ιονισμού: Πηγή ηλεκτροδιάχυσης σε θετικό ιονισμό (ESI⁺) ή αρνητικό ιονισμό (ESI⁻).
- ✓ Χρόνος συλλογής μεταπτώσεων: 100-250msec ανάλογα με τον αναλύτη.
- ✓ Τάση τριχοειδούς: Αναγράφονται στον **Πίνακα I του Παραρτήματος**, και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.
- ✓ Ενέργεια θραυσματοποίησης: Αναγράφονται στον **Πίνακα I του Παραρτήματος**, και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.

4.12. Ταυτοποίηση

Συνολικά τέσσερα διαφορετικά αναλυτικά συστήματα χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των αναλυτών στα δείγματα. Δύο συστήματα αέριας χρωματογραφίας με τη χρήση δυο στηλών διαφορετικής πολικότητας και δύο διαφορετικούς εκλεκτικούς ανιχνευτές, σε διάφορους συνδυασμούς (GC-ECD/NPD), ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών

τριπλού τετραπόλου (GC-MS/MS) και ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS). Στην περίπτωση των ζωοτροφών το κάθε δείγμα χρωματογραφήθηκε σε επτά διαφορετικά συστήματα (GC-[DB5-MS]-ECD, GC-[DB17-MS]-NPD, GC-[DB5-MS]-NPD, GC-[DB17-MS]-ECD, GC-[EI]-MS/MS, LC-[ESI+]-MS/MS and LC-[ESI-]-MS/MS). Ομοίως, στην περίπτωση του γάλακτος το κάθε δείγμα χρωματογραφήθηκε σε τέσσερα διαφορετικά συστήματα (GC-[DB5-MS]-ECD, GC-[DB17-MS]-NPD, GC-[DB5-MS]-NPD and GC-[DB17-MS]-ECD).

Η παρουσία αναλύτη στο δείγμα ταχτοποιήθηκε αφενός με την εμφάνιση των χρωματογραφικών κορυφών σε χρόνο πλησίον ($\pm 1,5\%$ για GC ή $\pm 3\%$ για LC) του χρόνου κατακράτησης της πρότυπης ουσίας και αφετέρου από το λόγο των δυο μεταπτώσεων (LC-MS/MS) ο οποίος πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις του παρακάτω πίνακα⁵⁵:

Σχετική ένταση ιόντος (% της βασικής κορυφής)	GC-MS/MS, LC-MS/MS (επιτρεπόμενη απόκλιση %)
> 50 %	± 20 %
> 20 % ως 50 %	± 25 %
> 10 % ως 20 %	± 30 %
$\leq 10\%$	± 50 %

Αν και η τεχνική MS/MS σε συνδυασμό από ένα σύστημα χρωματογραφίας αποτελεί από μόνη της ένα ισχυρό εργαλείο ταυτοποίησης, η συμπληρωματική χρήση των κλασικών τεχνικών για την ταυτοποίηση των αναλυτών ενισχύει την εγκυρότητα των αποτελεσμάτων.

4.13. Προσδιορισμός

Η περιεκτικότητα του δείγματος στο δείγμα, σε mg/kg, υπολογίζεται, από την εξίσωση:

$$C = f \times C_I$$

όπου:

✓ C_I είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο τελικό προς έγχυση διάλυμα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με πρότυπα διαλύματα αναφοράς, και

✓ ο συντελεστής $f = V_1 V_3 / m_s V_2$ (V_1, V_2, V_3 ο όγκος των διαλυτών και m_s η μάζα του δείγματος) και παίρνει τις τιμές: $f=1$ (για συμπυκνωμένη ζωοτροφή), $f=2,5$ (για χλωρά νομή), $f=1$ (για το λίπος)

4.14. Αποτελέσματα και συζήτηση

Η εξασφάλιση της αξιοπιστίας και καταλληλότητα μιας μεθόδου για το σκοπό που προορίζεται πραγματοποιήθηκε μέσω της διαδικασίας της επικύρωσης. Η πλήρης επικύρωση της μεθόδου έγινε αξιολογώντας την ορθότητα, πιστότητα, αβεβαιότητα, ευαισθησία, ανθεκτικότητα και εξειδίκευση.

4.14.1. Ορθότητα – Πιστότητα

Η εργαστηριακή εκτίμηση της ορθότητας και πιστότητας προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα μάρτυρα (ζωοτροφών) σε πέντε επαναλήψεις. Για την εκτίμηση της ορθότητας ελέγχθηκε η ανάκτηση και της πιστότητας η σχετική τυπική απόκλιση (SDr). Ποσότητα $5 \pm 0,05$ gr των ζωοτροφών εμβολιάστηκε σε δυο επίπεδα με γνωστές συγκεντρώσεις των αναλυτών και προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος εργασίας. Το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού ήταν τα 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και το υψηλότερο το δεκαπλάσιό του.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι οι μέσες ανακτήσεις στο χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης κυμάνθηκαν από 48-129,2% με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 26%, ενώ στο μεγαλύτερο επίπεδο ήταν 53-125% με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 26,8%. Αναλυτικότερα, οι μέσες ανακτήσεις και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.1**.

Αναλύτης	Σύστημα	R (%) 1° Επίπεδο	SDr (%) 1° Επίπεδο	R (%) 2° Επίπεδο	SDr (%) 2° Επίπεδο	S/N στο LOQ
acephate	LC-MS/MS	56,83	12,22	82,16	4,71	13
acetamiprid	LC-MS/MS	90,63	14,32	105,79	12,63	320
aclonifen	GC-MS/MS	78,24	5,49	72,64	7,36	65
acrinathrin	GC-MS/MS	101,74	25,08	84,64	16,81	113
aldicarb	LC-MS/MS	55,50	17,00	96,39	13,20	15
aldicarb sulfone	LC-MS/MS	59,41	6,89	85,46	19,46	45
aldicarb sulfoxide	LC-MS/MS	64,47	16,00	71,53	10,26	20
aldrin	GC-MS/MS	69,03	20,74	70,00	8,93	89
ametryn	LC-MS/MS	84,89	14,47	87,13	14,36	200
atrazine	LC-MS/MS	122,03	24,98	91,10	20,23	20
azimsulfuron	LC-MS/MS	112,15	14,79	96,04	20,67	25
azinphos methyl	LC-MS/MS	65,87	10,39	99,62	19,40	70
azoxystrobin	LC-MS/MS	90,91	12,18	96,51	14,84	500
benalaxyl	LC-MS/MS	84,65	14,46	88,23	13,72	25
bensulfuron methyl	LC-MS/MS	53,84	23,45	95,77	19,70	100
BHC α	GC-MS/MS	80,50	14,50	91,00	10,50	143
BHC β	GC-MS/MS	68,75	21,45	60,00	21,84	31
bifethrin	GC-MS/MS	85,42	8,13	71,25	8,16	329
bitertanol A	GC-MS/MS	75,45	4,77	69,93	8,42	67
bitertanol B	GC-MS/MS	78,17	4,18	71,00	9,13	60
boscalid	LC-MS/MS	110,68	16,39	74,60	16,43	250
bromopropylate	GC-MS/MS	83,15	6,94	79,87	9,00	382
bromuconazole	LC-MS/MS	79,43	25,63	85,03	21,99	20
bupirimate	LC-MS/MS	102,36	21,64	86,48	14,41	25
buprofezin	LC-MS/MS	90,04	19,37	99,64	17,97	84
cadusafos	LC-MS/MS	84,55	13,87	72,61	19,34	24
carbaryl	LC-MS/MS	84,57	15,17	97,59	18,54	600

Αναλύτης	Σύστημα	R (%) 1° Επίπεδο	SDr (%) 1° Επίπεδο	R (%) 2° Επίπεδο	SDr (%) 2° Επίπεδο	S/N στο LOQ
carbofuran	LC-MS/MS	88,64	9,71	105,68	13,68	1000
carbofuran 3-Hydroxy	LC-MS/MS	72,91	13,74	101,36	21,73	13
carbosulfan	LC-MS/MS	68,41	17,50	89,68	16,36	495
chlordan a	GC-MS/MS	62,20	15,48	61,19	5,76	130
chlorfevinphos	LC-MS/MS	107,73	9,49	82,62	13,79	30
chlorpropham	GC-MS/MS	93,37	13,09	82,95	14,14	833
chlortoluron	LC-MS/MS	83,59	15,31	99,93	15,97	110
clofentezin	LC-MS/MS	90,20	14,37	91,84	16,76	30
cyanazine	LC-MS/MS	67,53	16,40	107,78	23,18	75
cyfluthrin	GC-MS/MS	70,40	12,05	72,84	3,66	15
cymoxanil	LC-MS/MS	107,92	10,99	108,12	18,21	140
cypermethrin	GC-MS/MS	69,71	11,81	70,70	3,90	18
DDD pp	GC-MS/MS	55,81	12,65	56,01	7,28	131
DDE pp	GC-MS/MS	79,56	13,98	81,00	11,06	85
DDT pp	GC-MS/MS	54,68	12,99	56,54	7,74	13
deltamethrin	GC-MS/MS	68,84	6,77	61,63	4,08	322
demeton-S-methyl	LC-MS/MS	76,44	19,44	126,65	11,00	17
demeton-S-methyl sulfoxide	LC-MS/MS	110,89	12,97	82,97	18,70	50
diazinon	LC-MS/MS	88,10	20,86	86,92	15,86	250
dichlorvos	LC-MS/MS	48,03	7,26	90,24	14,13	15
dicofol op	GC-MS/MS	129,22	12,00	79,09	3,68	35
dicofol pp	GC-MS/MS	99,29	14,26	91,00	9,46	26
dieldrin	GC-MS/MS	121,67	16,20	101,00	15,40	90
diethofencarb	LC-MS/MS	86,06	11,48	103,19	17,34	540
difenoconazole	LC-MS/MS	104,80	20,20	91,30	15,74	55
dimethoate	LC-MS/MS	86,03	23,58	109,52	11,71	30
dimethomorph	LC-MS/MS	104,26	20,62	80,23	16,06	13

Αναλύτης	Σύστημα	R (%) 1° Επίπεδο	SDr (%) 1° Επίπεδο	R (%) 2° Επίπεδο	SDr (%) 2° Επίπεδο	S/N στο LOQ
endosulfan a	GC-MS/MS	74,00	13,86	81,00	13,86	13
endosulfan b	GC-MS/MS	50,63	23,66	68,04	11,39	11
endosulfan sulfate	GC-MS/MS	61,27	11,87	65,88	7,84	11
endrin	GC-MS/MS	97,89	14,20	98,00	9,55	746
epoxiconazole	LC-MS/MS	77,25	2,84	88,98	16,00	500
esfenvalerate	GC-MS/MS	70,26	11,02	69,34	4,82	29
ethofumesate	LC-MS/MS	75,65	21,62	99,62	16,02	40
etoxazole	LC-MS/MS	108,22	16,72	70,04	19,41	751
famoxadone	LC-MS/MS	70,04	19,41	74,08	15,67	40
fenamidone	LC-MS/MS	112,67	11,41	96,56	23,40	75
fenbuconazole	LC-MS/MS	68,20	13,80	77,40	19,20	30
fenhexamid	LC-MS/MS	78,43	7,18	87,15	21,01	20
fenoxycarb	LC-MS/MS	103,37	11,59	78,19	7,76	25
fenpropathrin	GC-MS/MS	81,21	10,36	77,38	6,70	16
fenpyroximate	LC-MS/MS	111,91	3,22	88,00	17,00	175
fenthion	LC-MS/MS	99,53	9,99	109,64	14,91	75
fenvalerate	GC-MS/MS	74,93	9,02	75,06	6,01	19
fosthiazate	LC-MS/MS	86,09	8,15	107,62	14,81	600
furathiocarb	LC-MS/MS	108,12	15,38	79,30	7,11	300
heptachlor	GC-MS/MS	81,80	13,80	91,04	19,26	184
hexachlorobenzene	GC-MS/MS	94,04	21,49	97,00	10,57	91
hexaconazole	LC-MS/MS	60,48	14,35	125,00	18,00	50
hexythiazox	LC-MS/MS	74,87	10,39	90,61	25,83	10
imidacloprid	LC-MS/MS	97,02	21,13	96,36	25,29	60
indoxacarb	LC-MS/MS	108,05	13,51	70,74	19,11	46
iprovalicarb	LC-MS/MS	86,13	18,57	86,54	12,96	850
kresoxim methyl	LC-MS/MS	123,82	19,83	95,00	24,59	100
lamda cyhalothrin	GC-MS/MS	93,58	23,70	86,42	11,39	117

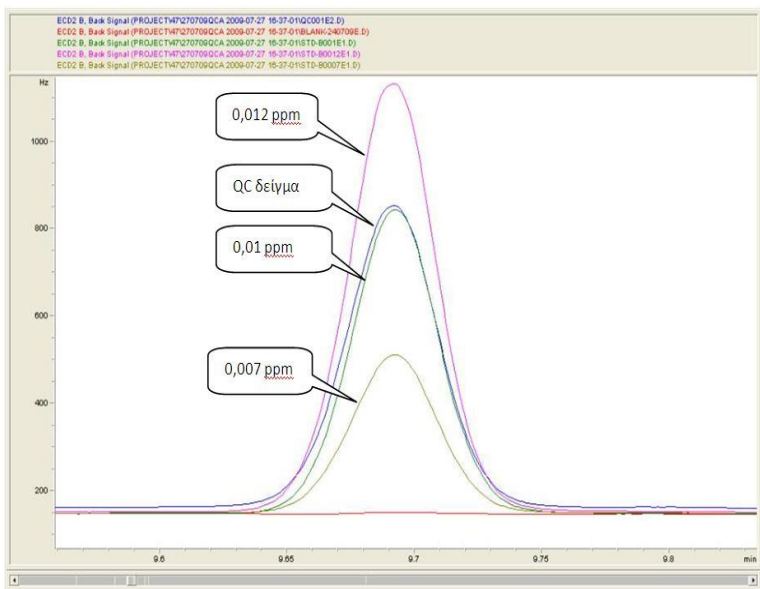
Αναλύτης	Σύστημα	R (%) 1° Επίπεδο	SDr (%) 1° Επίπεδο	R (%) 2° Επίπεδο	SDr (%) 2° Επίπεδο	S/N στο LOQ
lindane	GC-MS/MS	72,23	19,00	89,77	14,58	34
linuron	LC-MS/MS	101,70	12,03	91,50	11,95	13
malathion	LC-MS/MS	93,50	12,00	110,00	15,00	59
metalaxyl M	LC-MS/MS	82,04	8,88	103,76	16,52	450
metconazole	LC-MS/MS	60,44	24,35	98,14	21,43	25
methacrifos	GC-MS/MS	97,74	17,71	93,05	11,70	25
methamidophos	LC-MS/MS	58,81	15,34	82,53	21,00	25
methidathion	GC-MS/MS	104,92	15,77	104,08	14,17	196
methiocarb	LC-MS/MS	80,95	11,04	88,15	22,74	32
methiocarb sulfone	LC-MS/MS	96,75	22,69	117,09	18,43	13
methiocarb sulfoxide	LC-MS/MS	68,86	3,36	102,68	26,32	320
methomyl	LC-MS/MS	84,85	5,15	90,66	11,48	13
methoxyfenozide	LC-MS/MS	96,56	16,05	88,26	16,86	700
metoxuron	LC-MS/MS	74,65	11,62	104,94	22,76	20
monocrotophos	LC-MS/MS	86,23	18,65	115,87	9,03	40
monolinuron	LC-MS/MS	114,38	7,30	97,71	13,10	210
myclobutanil	LC-MS/MS	68,00	15,84	102,20	16,43	25
naled	LC-MS/MS	33,55	7,21	29,14	23,00	15
nicosulfuron	LC-MS/MS	59,13	12,82	107,60	22,35	30
omethoate	LC-MS/MS	99,11	17,63	77,78	15,69	120
oxamyl	LC-MS/MS	114,32	21,23	96,64	14,50	100
parathion methyl	GC-MS/MS	71,80	8,23	97,63	9,00	392
permethrin	GC-MS/MS	66,91	11,67	61,78	6,81	101
phosalone	LC-MS/MS	76,78	8,93	74,00	15,00	80
phosmet	LC-MS/MS	64,37	7,71	93,97	16,00	20
pirimicarb	LC-MS/MS	74,80	20,16	95,32	15,69	300
pirimiphos methyl	LC-MS/MS	82,65	14,17	74,25	23,72	127
primisulfuron methyl	LC-MS/MS	85,25	24,18	95,41	11,50	13

Αναλύτης	Σύστημα	R (%) 1° Επίπεδο	SDr (%) 1° Επίπεδο	R (%) 2° Επίπεδο	SDr (%) 2° Επίπεδο	S/N στο LOQ
prochloraz	LC-MS/MS	108,24	14,08	69,45	20,36	130
profenofos	LC-MS/MS	90,79	23,61	70,62	13,64	41
propachlor	GC-MS/MS	74,25	2,55	106,81	15,09	208
propamocarb	LC-MS/MS	94,30	24,06	73,31	26,46	15
propargite	LC-MS/MS	118,93	9,90	84,03	26,80	410
propyzamide	GC-MS/MS	59,55	16,76	70,09	21,24	16
pyraclostrobin	LC-MS/MS	100,34	13,61	89,93	17,61	195
pyrifenox	LC-MS/MS	91,12	18,02	100,22	25,93	48
pyriproxyfen	LC-MS/MS	113,97	11,50	68,81	10,87	125
quinoxifen	LC-MS/MS	102,71	14,82	101,00	8,98	30
quintozene	GC-MS/MS	62,38	14,13	53,21	4,47	131
sethoxydime	LC-MS/MS	58,72	18,00	51,18	18,55	45
simazine	LC-MS/MS	84,29	26,00	80,81	18,03	10
spinosad	LC-MS/MS	122,00	18,43	84,00	9,25	30
spiroxamine	LC-MS/MS	113,88	14,36	68,82	8,87	500
tau-fluvalinate	GC-MS/MS	75,06	13,15	76,20	4,83	386
tebuconazole	LC-MS/MS	88,68	18,98	85,46	18,20	13
tebufenozide	LC-MS/MS	101,67	12,19	86,90	10,80	350
tebufenpyrad	LC-MS/MS	88,43	24,04	97,00	23,89	19
terbutylazine	LC-MS/MS	115,28	7,27	76,00	1,60	53
tetraconazole	LC-MS/MS	66,19	20,52	71,47	12,32	40
tetradifon	GC-MS/MS	66,47	2,86	63,82	7,71	196
thiacloprid	LC-MS/MS	86,64	14,52	103,38	11,22	400
thiamethoxam	LC-MS/MS	68,77	18,75	107,78	5,71	80
thiodicarb	LC-MS/MS	111,00	23,94	102,15	6,86	45
thiophanate methyl	LC-MS/MS	94,86	20,45	91,78	24,94	150
tolyfluanid	LC-MS/MS	64,71	20,15	72,55	9,10	40
triadimefon	LC-MS/MS	127,16	15,70	80,37	19,69	12

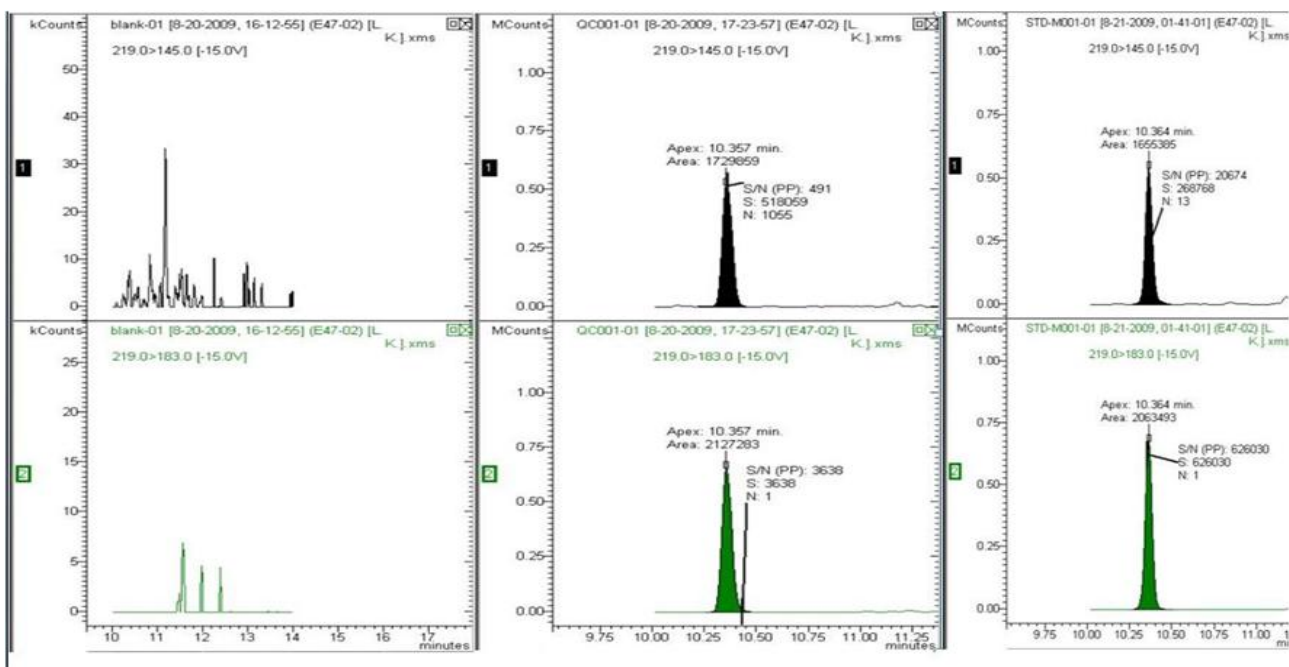
Αναλύτης	Σύστημα	R (%) 1 ^ο Επίπεδο	SDr (%) 1 ^ο Επίπεδο	R (%) 2 ^ο Επίπεδο	SDr (%) 2 ^ο Επίπεδο	S/N στο LOQ
triadimenol	LC-MS/MS	77,38	3,29	100,87	24,85	33
triazophos	LC-MS/MS	75,57	25,66	92,65	11,59	11
trifloxystrobin	LC-MS/MS	118,82	5,75	72,32	11,89	295
vamidothion	LC-MS/MS	78,20	9,28	105,97	11,94	750
vinclozolin	GC-MS/MS	105,82	5,76	79,84	7,20	81

Πίνακας 4.1. Σύστημα προσδιορισμού, μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις (R%) για N=5 και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (SDr) των αναλυτών για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού για την μέθοδο εκχύλισης των ζωοτροφών, τιμές S/N για το LOQ

Ορισμένοι αναλύτες παρουσίασαν χαμηλές μέσες ανακτήσεις -κάτω από τα αποδεκτά όρια- αλλά με καλή πιστότητα. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τυπούς, μετά από διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς την ανάκτηση ή για ημιποσοτικό προσδιορισμό. Στα Σχήματα 4.2 και 4.3 απεικονίζονται παραδείγματα εμβολιασμένων δειγμάτων μάρτυρα ζωοτροφής σε διαφορετικά συστήματα αέριας χρωματογραφίας.



Σχήμα 4.2. Χρωματογράφημα για τον αναλύτη α-HCH σε εμβολιασμένο δείγμα ζωοτροφής σε επίπεδο 0,01 mg/kg και σε προτύπα δ/τα συγκεντρώσεων 0,007, 0,01, και 0,012 μg/mL, σε σύστημα GC με στήλη DB17 MS και ανιχνευτή ECD



Σχήμα 4.3. Χρωματογράφημα για τον αναλύτη α-HCH σε εμβολιασμένο δείγμα ζωοτροφής σε επίπεδο 0,01 mg/kg και σε πρότυπο δ/μα συγκεντρώσης 0,01 μg/mL, σε σύστημα GC-MS/MS

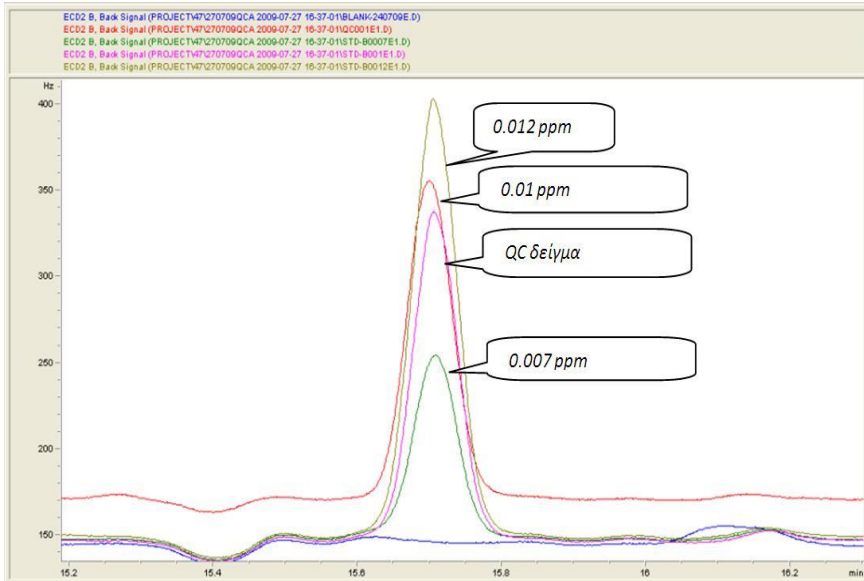
Η εργαστηριακή εκτίμηση της ορθότητας και πιστότητας προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα μάρτυρα (λίπους) σε πέντε επαναλήψεις. Ποσότητα $1 \pm 0,01$ gr του ζωικού λίπους εμβολιάστηκε σε δυο επίπεδα με γνωστές συγκεντρώσεις των αναλυτών και προσθήκη μικρού όγκου διαλυμάτων εργασίας. Το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού ήταν τα 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και το υψηλότερο το δεκαπλάσιό του.

Αναλύτης	R (%) 1 ^ο Επίπεδο	SDr (%) 1 ^ο Επίπεδο	R (%) 2 ^ο Επίπεδο	SDr (%) 2 ^ο Επίπεδο	S/N στο LOQ
Aldrin	104,8	16,4	71	20,3	425
Azinphos-ethyl	88,6	12,5	97,1	13,9	11
Bifenthrin	81,2	20,4	74	10,8	42
Chlordane, alpha (cis)	110,7	8,7	88,6	11,5	333
Chlordane, gamma (trans)	114,7	10,2	89,6	11,4	175
Chlorobenzilate	102,2	17,1	95,7	8,9	15
Chlorpyrifos	110	11,6	81,5	11,4	142
Chlorpyrifos-methyl	104,8	13,7	98	20,6	100
Cyfluthrin (total)	89,5	16,3	70,2	17,2	29
Cypermethrin (total)	89,9	12,2	79	18,1	42
DDT, p,p'-	104,7	3,1	89,6	13,7	46
DDT, o,p'-	105,5	11	89	10,7	67
DDE, p,p'-	102,7	11,9	85,1	9,1	200
DDD (TDE), p,p'-	96,1	8,4	85	4,1	85
Deltamethrin (cis-)	99,1	8,7	94	18	50
Diazinon	92	16,6	85,8	20,4	254
Dieldrin	105,4	10,8	85,6	11,9	308
Endosulfan alpha-	103,9	13,5	89,6	9,1	275
Endosulfan beta-	100,3	17,4	93,2	11,1	133

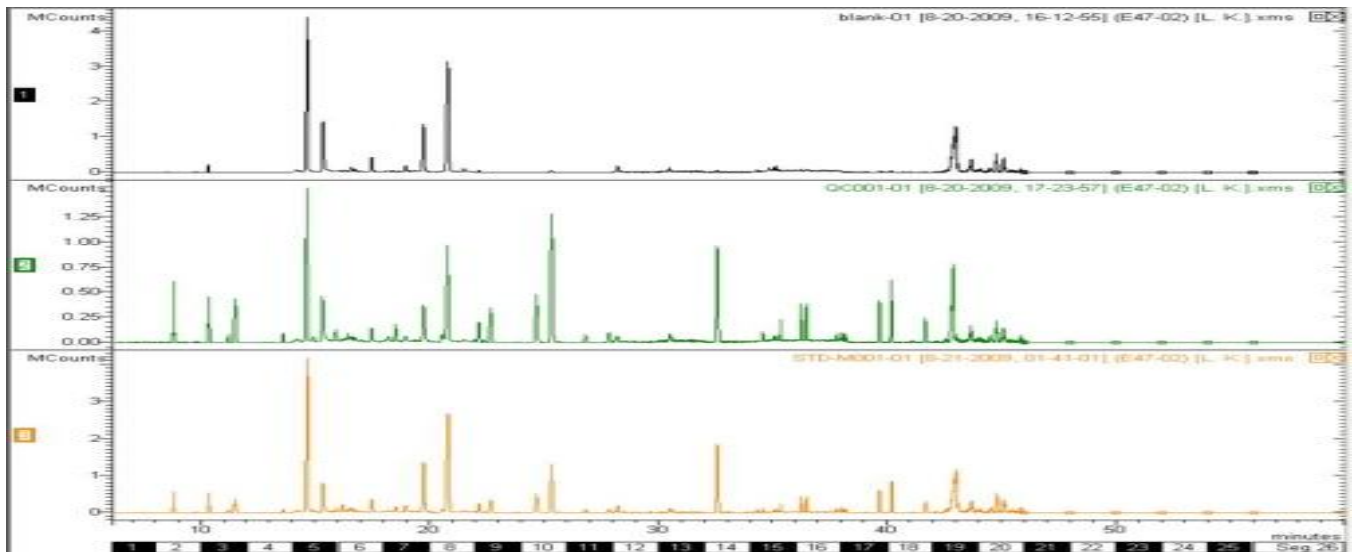
Αναλύτης	R (%)	SDr (%)	R (%)	SDr (%)	S/N
Endosulfan sulfate	94,2	13,9	93,5	19,7	34
Endrin	103,5	14,8	89,8	8,9	188
esfenvalerate	88,3	15,4	79,3	14,4	75
fenvalerate	95,8	15,2	82,1	9,9	75
HCH, alpha-	104,6	8,8	72	18,7	487
HCH, beta-	109,8	9	83,6	5,7	75
Heptachlor	101,5	10,7	70,6	12,1	358
Heptachlorepoxyde cis-	104,4	12	84	14,1	217
Heptachlorepoxyde trans-	106,1	7,5	80,8	5,3	258
Hexachlorobenzene (HCB)	100,8	8,9	101	16,6	508
Lindane (HCH, gamma-)	104,9	11	109,3	19,3	358
Methidathion	85,8	16,7	87,1	11,1	13
Oxychlorane	111,9	11,4	88,4	10,2	292
Parathion	92,9	18,5	76,5	18,8	50
Parathion-methyl	96,8	17,6	97,5	15,6	45
Permethrin cis-/ trans-	104,7	18,6	95,6	12,7	13
Pirimiphos-methyl	94,8	18,3	82,1	9,4	13
Profenofos	99,1	19,3	88,4	15,1	31
Pyrazophos	90,6	14,3	88,6	9,6	24
Quintozene	100,5	10,3	103,6	20,1	366
Triazophos	96,3	15,7	80,7	11,2	24

Πίνακας 4.2. Μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις (R%) για N=5 και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (SDr) των αναλυτών για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού, τιμές S/N για το LOQ για την μέθοδο εκχύλισης των ζωοτροφών.

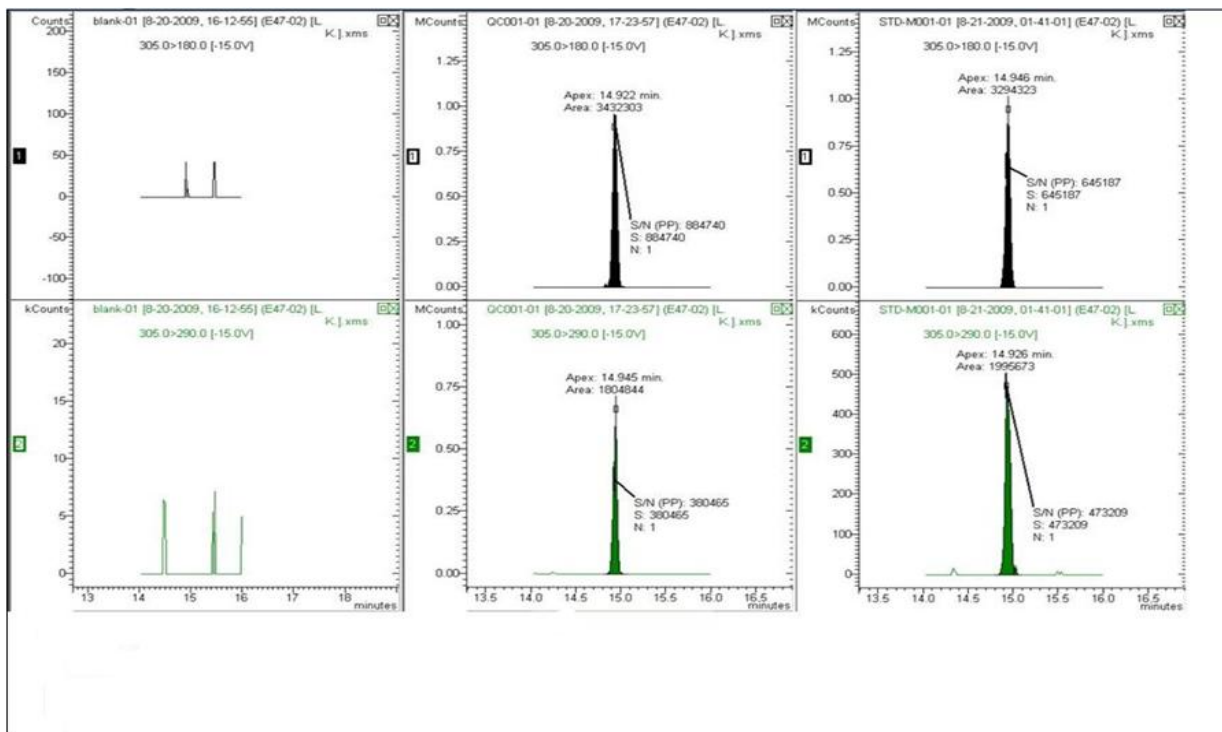
Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι για την πλειονότητα των αναλυτών οι μέσες ανακτήσεις στο χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης κυμάνθηκαν από 81.2-114.7%, με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 20.4%. Στο μεγαλύτερο επίπεδο ήταν 70.2-109.3% με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 20.6%. Οι μέσες ανακτήσεις και οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις παρουσιάζονται λεπτομερειακά στον Πίνακα 4.2, ενώ στα Σχήματα 4.4 – 4.6 απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα των εμβολιασμένων δειγμάτων με μάρτυρες ζωοτροφής σε διαφορετικά συστήματα αέριας χρωματογραφίας.



Σχήμα 4.4. Χρωματογράφηματα για τον αναλύτη chlorpyrifos σε εμβολιασμένο δείγμα λίπους σε επίπεδο 0,01 mg/kg και σε πρότυπα δ/τα συγκεντρώσεων 0,007, 0,01, και 0,012 μg/mL, σε σύστημα GC με στήλη DB17 MS και ανιχνευτή ECD



Σχήμα 4.5. Χρωματογράφηματα TIC σε σύστημα GC-MS/MS μάρτυρα λίπους (αριστερά) εμβολιασμένο δείγμα λίπους σε συγκέντρωση 0,01 μg/mL (μέση) και πρότυπο δ/μα συγκέντρωσης 0,01 μg/mL, σε υπόστρωμα λίπους (δεξιά).



Σχήμα 4.6. Χρωματογράφημα για τον αναλύτη α-HCH σε μάρτυρα λίπους (αριστερά), εμβολιασμένο δείγμα λίπους σε επίπεδο 0,01 mg/kg (μεση) και σε προτύπο δ/μα συγκεντρώσεως 0,01 µg/mL (δεξιά), σε σύστημα GC-MS/MS

4.14.2. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίζεται το ελάχιστο επίπεδο συγκεντρώσεως στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα, δηλαδή με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα. Η παράμετρος που ελέγχθηκε είναι το σήμα/θόρυβος (S/N). Στο LOQ πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10^4$. Σύμφωνα με τα παραπάνω ως όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίστηκε το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού, δηλαδή τα 10 µg/kg για τους περισσότερους αναλύτες στις ζωοτροφές και για την πλειοψηφία τους στο λίπος.

4.14.3. Διεργαστηριακές Εξετάσεις Ελέγχου Ικανότητας

Η απόδοση της μεθόδου ελέγχθηκε μέσω της συμμετοχής του εργαστηρίου σε διεργαστηριακή δοκιμή που διοργανώθηκε από το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς της Ε.Ε. για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης και προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Αντικείμενο της δοκιμής ήταν πενήντα πέντε αναλύτες με κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης 2–10μg/kg, ανάλογα με τον αναλύτη, ενώ το υπόστρωμα που στάλθηκε ήταν λίπος. Με εφαρμογή της μεθόδου που αναπτύχθηκε έγινε δυνατός ο επιτυχής προσδιορισμός του συνόλου των αναλυτών (δώδεκα αναλύτες) που εμπεριέχονταν στο δείγμα και η ακριβής τους ποσοτικοποίηση, σύμφωνα με τις τιμές των z score του παρακάτω **Πίνακα:**

Αναλύτης	Z score
Azinphos ethyl	-0.3
Chlordane cis	-0.4
Chlordane trans	0.0
DDT	-1.6
Diazinon	0.0
Deltamethrin	1.4
Endosulfan	0.2
Endosulfan sulfate	0.3
Lindane	0.4
Methidathion	0.0
Permethrin	-0.1
Pyrazophos	0.2
Λίπος: 6,4% (διάμεση τιμή εργαστηρίων 5,5%)	

Το εργαστήριο απέδωσε τιμές z-score από 0,4 έως 1,6 και κατατάχθηκε στην κατηγορία Α των εργαστηρίων (βέλτιστη τιμή $z=0$).

4.15. Ανάλυση δειγμάτων γάλακτος και ζωοτροφών

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια δυο διαφορετικών πειραματισμών:

A. Την περίοδο Ιανουαρίου–Φεβρουαρίου 2009 εξετάστηκαν συνολικά δεκαοκτώ δείγματα ζωοτροφών (έξι χλωράς νομής και δώδεκα δείγματα μιγμάτων αλεύρων) τα οποία συλλέχτηκαν από είκοσι κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις εκτροφής αιγοπροβάτων. Από τις ίδιες εκμεταλλεύσεις συλλέχτηκαν δείγματα γάλακτος των ζώων που είχαν τραφεί με αυτές. Η δειγματοληψία έγινε από το εργαστήριο Διατροφής αγροτικών ζώων του τμήματος Ζωικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Τα αποτελέσματα των αναλύσεων παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.3**.

B. Στα πλαίσια παρακολούθησης των επιπέδων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ζωοτροφές που διακινούνται στην ελληνική αγορά αναλύθηκαν σαρανταέξι δείγματα ζωοτροφών κατά την χρονική περίοδο 2009-2011 (οκτώ το 2009, δεκοκτώ το 2010 και είκοσι το 2011). Τα αποτελέσματα των αναλύσεων συνοψίζονται στον **Πίνακα 4.5**.

Από τα αποτελέσματα των αναλύσεων ζωοτροφών της μελέτης A που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 4.3**, προκύπτει ότι σχεδόν σε όλα τα δείγματα που εξετάστηκαν προσδιορίστηκαν υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Αναλύτες	α -endosulfan		β - endosulfan		endosulfan sulfate		Σ endosulfan***	
	m \pm s (mg/kg)	Εύρος (mg/kg)	m \pm s (mg/kg)	Εύρος (mg/kg)	m (mg/kg) (n=2)*	Εύρος (mg/kg)	m \pm s (mg/kg)	Εύρος (mg/kg)
Μίγματα αλεύρων (n=20) *	2.82 \pm 0.57	1.16-7.53	2.39 \pm 0.52	0.96- 6.85	0.15	0.02-0.27	5.36 \pm 1.16	0.02-14.58
Χλωρά νομή (n=20) *	0.08 \pm 0.06	0.01-0.20	0.02 \pm 0.01	0.01- 0.05	ND	ND	0.10 \pm 0.07	0.02-0.25
Γάλα (n=200) *	ND**	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

*=αριθμός δειγμάτων, **ND= όριο ανίχνευσης, *** Σ endosulfan = άθροισμα των α -endosulfan, β - endosulfan, endosulfan sulfate

Πίνακας 4.3. Μέσες τιμές συγκεντρώσεων (m) και διασπορά των τιμών (s) των αναλυτών α -endosulfan, β -endosulfan, endosulfan sulfate και Σ endosulfan στα δείγματα ζωοτροφών και γάλακτος

Αναλύτες	Μίγματα αλεύρων	Χλωρά νομή	Γάλα
Azoxystobin	0.005 (n=1)*	ND**	ND
	0.013 (n=1)		
Malathion	0.13 (n=1)	ND	ND
Pirimiphos methyl	0.011 (n=1)	ND	ND
Carbaryl	0.033 (n=1)	0.003 (n=1)	ND
Dimethoate	0.136 (n=1)	ND	ND
Bupirimate	ND	0.013 (n=1)	ND
Phosmet	ND	0.004 (n=1)	ND
Desmetryn	ND	0.003 (n=1)	ND

*=αριθμός δειγμάτων, **ND= όριο ανίχνευσης

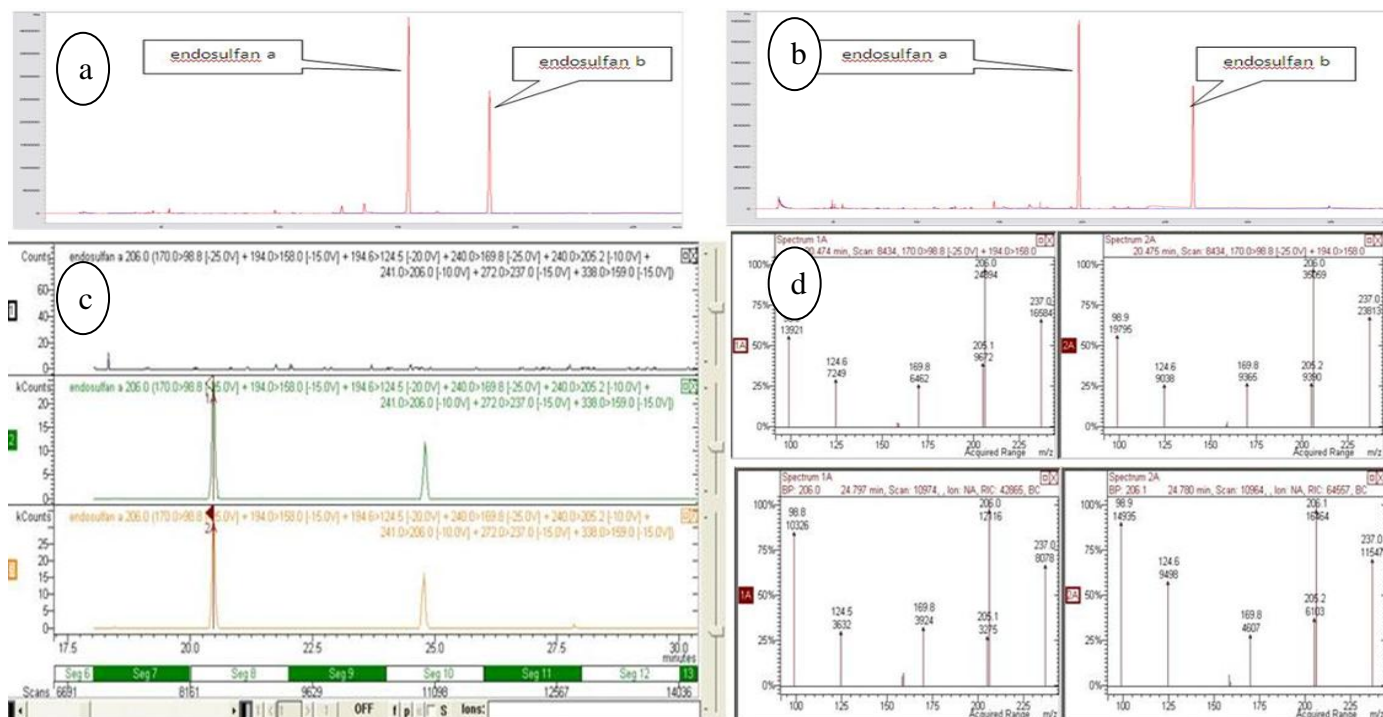
Πίνακας 4.4. Ουσίες και συγκεντρώσεις (mg/kg) στα δείγματα ζωοτροφών και γάλακτος από κτηνοτροφικές εκμεταλλεύσεις εκτροφής αιγοπροβάτων

Ο αναλύτης που ανιχνεύτηκε σε όλα σχεδόν τα δείγματα ήταν το οργανοχλωριωμένο εντομοκτόνο endosulfan, μόριο του οποίου η παραγωγή έχει σταματήσει -λόγω υψηλής τοξικότητας- σε Ευρώπη, Αμερική και άλλες αναπτυγμένες περιοχές. Η πλήρης απαγόρευση της χρήσης του ολοκληρωθεί το 2012, αν και οι περισσότερες χώρες ήδη απαγορεύουν τη χρήση του. Στις μόνες χώρες που επιτρέπεται η συστηματική παραγωγή και χρήση του είναι η Κίνα και η Ινδία.

Αναλυτικότερα, η παρουσία στα δείγματα των δυο ισομερών του endosulfan (α και β) και σε λίγες περιπτώσεις του μεταβολίτη του endosulfan sulfate ήταν εκτεταμένη. Όπως φαίνεται στον **Πίνακα 4.3**, η μέση συγκέντρωση του Σendosulfan στο σύνολο των δειγμάτων από συμπυκνωμένες ζωοτροφές ήταν 5.36 mg/ kg και στα δείγματα μηδικής 0,1 mg/ kg. Η συγκέντρωση του αναλύτη στο τελικό προς έγχυση διάλυμα υπολογίζεται με τις παρακάτω δύο τεχνικές:

✓ Απευθείας σύγκριση: Η απευθείας σύγκριση της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής του δείγματος με την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής ενός μόνο προτύπου διαλύματος γίνεται όταν οι επιφάνειες κορυφής δείγματος και προτύπου δεν διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από 50%.

✓ Χρήση καμπύλης αναφοράς (για το Σendosulfan) : Πραγματοποιήθηκε με κατασκευή καμπύλης αναφοράς με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η γραμμικότητα ελέγχθηκε στα παρακάτω έντεκα επίπεδα συγκεντρώσεων εύρους 0,01–0,02–0,04–0,06–0,08–0,1–0,15–0,25–0,35–0,5–0,75 mg/L. Τα πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε υπόστρωμα ζωοτροφής, η οποία αναλύθηκε προηγούμενος για τυχόν ύπαρξη των υπό εξέταση αναλυτών. Στο **Σχήμα 7** απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα δείγματος που περιέχει endosulfan α και β.



Σχήμα 4.7. Χρωματογράφημα δείγματος ζωοτροφής (μίγμα αλεύρων) με endosulfan α και β σε συγκεντρώσεις 7.83 και 6.85 mg/kg αντίστοιχα σε διάφορα χρωματογραφικά συστήματα: (a) σύστημα GC με στήλη DB-5MS και ανιχνευτή ECD. (b) σύστημα GC με στήλη DB-17MS και ανιχνευτή ECD. (c) Σύστημα GC-MS/MS το οποίο απεικονίζει ανακατασκευασμένο χρωματογράφημα με τις μεταπτώσεις του endosulfan: μάρτυρα ζωοτροφής (πάνω), αγνώστου δείγματος (μέση), και πρότυπου δ/τος endosulfan α and β at 0.5 mg/mL σε μάρτυρα ζωοτροφή (κάτω). (d) Φάσματα που αντιστοιχούν στις κορυφές του endosulfan α στο δείγμα (πάνω αριστερά) και στο πρότυπο (πάνω δεξιά) και του endosulfan β στο δείγμα (κάτω αριστερά) και στο πρότυπο (κάτω δεξιά)

Οι αναλύσεις ζωοτροφών της μελέτης Β (ελληνική αγορά) έδειξαν ότι δέκα από τα σαράντα έξι δείγματα (δυο του 2010 και οκτώ του 2011) βρέθηκαν θετικά στην παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Η ποσοτικοποίηση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της απευθείας σύγκρισης και τα αποτελέσματα των 10 δειγμάτων με ευρήματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 4.5.

Έτος	α/α	αναλύτης / συγκέντρωση	αναλύτης / συγκέντρωση	Αναλύτης / συγκέντρωση
2010	1	carbaryl (0,212 mg/kg)	pirimiphos methyl (0,032 mg/kg)	
2010	2	pirimiphos methyl (0,019 mg/kg)		
2011	3	pirimiphos methyl (0,013 mg/kg)		
2011	4	pirimiphos methyl (0,089 mg/kg)		
2011	5	pirimiphos methyl (0,067 mg/kg)		
2011	6	Tricyclazole (0,011 mg/kg)		
2011	7	phosmet (0,63 mg/kg)	diazinon (0,009 mg/kg)	chlorpyrifos (3,8 mg/kg)
2011	8	permethrin (0,21 mg/kg)	pirimiphos methyl (0,012 mg/kg)	
2011	9	phosmet (0,98 mg/kg)	diazinon (0,022 mg/kg)	chlorpyrifos (2,4 mg/kg)
2011	10	pirimiphos methyl (0,042 mg/kg)		

Πίνακας 4.5. Ουσίες και συγκεντρώσεις (mg/kg) στα δείγματα ζωοτροφών στα πλαίσια παρακολούθησης των επιπέδων φ.π. στην Ελληνική αγορά

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η οργανοφωσφορική ένωση pirimiphos methyl βρέθηκε σε επτά από τα δέκα θετικά δείγματα. Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις phosmet, diazinon και chlorpyrifos απαντήθηκαν σε δυο από τα δέκα και οι αναλύτες carbaryl, permethrin και tricyclazole από μια φορά. Στα τρία από τα δέκα δείγματα διαπιστώθηκε η παρουσία τριών ουσιών σε ανά δείγμα και σε ένα δείγμα η παρουσία δυο ουσιών. Στις περισσότερες περιπτώσεις σε κάθε δείγμα περιείχε μια ουσία.

Η ανίχνευση υπολειμμάτων του αναλύτη endosulfan σε ζωοτροφές έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες σε πληθώρα ειδών συμπυκνωμένων ζωοτροφών και χλωράς νομής σε επίπεδα συγκεντρώσεων περί τα 6 mg/ kg^{81,87,88,89}. Αντίθετα, αναλύσεις δειγμάτων ζωοτροφών (καλαμπόκι, ελαιοκράμβη και ανόργανες τροφές) που προορίζονταν για τη διατροφή μηρυκαστικών, χοίρων, αλόγων και κατοικίδιων ζώων τα οποία πραγματοποιήθηκαν στην Γερμανία κατά την περίοδο 2003-2004 έδειξαν ότι μόνο σε δυο από τα εκατόν τέσσερα δείγματα ανιχνεύτηκαν περίπου 7 mg/ kg από τον αναλύτη Σendosulfan⁸² με όριο ανίχνευσης της μεθόδου το 1 mg/ kg. Στο Ηνωμένο Βασίλειο διεξήχθη έρευνα ελέγχου του επιπέδου υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ζωοτροφές κατά την οποία αναλύθηκαν εκατόν πενήντα ένα δείγματα δημητριακών (κριθάρι, σίτος και καλαμπόκι), ζωοτροφών (κριθάρι, άχυρο σίτου, καλαμπόκι), σπόρων (κράμβη, βαμβακόσπορος, ηλιόσπορος) και σογιάλεου. Σε κανένα από αυτά δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω από το LOD της μεθόδου (50 mg/ kg)⁹⁰.

Από τις αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής και αφορούσαν δείγματα γάλακτος έδειξαν ότι δεν περιέχουν υπολείμματα του endosulfan σε επίπεδα πάνω από το όριο αναφοράς της μεθόδου. Στην βιβλιογραφία υπάρχουν διατροφικές μελέτες σχετικά με την παρουσία υπολειμμάτων endosulfan στο γάλα, στις οποίες συγκεκριμένη ποσότητα του αναλύτη χορηγήθηκε στα ζώα μέσω της διατροφής. Τα αποτελέσματα όμως παρουσιάζουν μια αντίφαση. Οι Indraningsih et al. (1993)⁹¹ χορήγησαν endosulfan σε αίγες σε αναλογία 1mg/kg σωματικού βάρους για 28 ημέρες και ανίχνευσαν υπολείμματα από την πρώτη ημέρα. Αντίθετα, οι Surendra et al. (2000)⁹² δεν ανίχνευσαν υπολείμματα σε αγελαδινό γάλα μετά από χορήγηση 50mg/ημέρα endosulfan για 4 εβδομάδες. Οι Nag et al. (2007)⁹³ χορηγώντας endosulfan στη διατροφή αιγών σε 2 δόσεις 15 και 30 mg/αίγα/ημέρα, για 25 συνεχόμενες ημέρες ανίχνευσαν υπολείμματα στο γάλα της τάξης των 0.194 mg/kg και 0.282 mg/kg αντίστοιχα, γεγονός που δηλώνει ότι το endosulfan μεταφέρεται από την τροφή στο γάλα.

Η παρούσα μελέτη δεν είχε ως στόχο τη διατροφή έτσι δεν πραγματοποιήθηκε συστηματική -ούτε ελεγχόμενη- χορήγηση του endosulfan, η οποία ήταν μικρότερη σε σχέση με ημερήσια πρόσληψη που αναφέρεται στις παραπάνω μελέτες.

Σε επίπεδο ασφάλειας των καταναλωτών, υπάρχουν αρκετές αναφορές για ανίχνευση endosulfan σε εμπορικά δείγματα γάλακτος. Όταν οι Chauhan et al (1982)⁹⁴ ανάλυσαν εκατόν πέντε δείγματα αγελαδινού γάλακτος από την περιοχή Hisar (Haryana, Ινδία) βρήκαν ότι τρία από αυτό ήταν θετικά με επίπεδα της τάξης των 2,5 mg/L. Οι Kathpal et al. (2001)⁹⁵ σε παρόμοια μελέτη ανίχνευσαν endosulfan πάνω από τα MRLs για δεκαπέντε από τα εκατό δείγματα αγελαδινού γάλακτος που συλλεχθήκαν από διάφορα μέρη της Ινδίας. Δύο χρόνια μετά, οι Nag and Raikwar (2003)⁹⁶ ανίχνευσαν endosulfan σε εικοσιέξι από ογδοντατρία δείγματα αγελαδινού γάλακτος που συλλέχτηκαν από την περιοχή Bundelkhand (Ινδία). Ομοίως οι Sharma et al. (2007)⁸⁴ ανέλυσαν εκατόν σαράντα επτά δείγματα γάλακτος και βρίσκοντας υπολείμματα endosulfan α στο 7% από αυτά σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν έως τα 0,0079 µg/mL και endosulfan β στο 44% των δειγμάτων σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν έως 0.028 µg/mL. Οι ίδιοι το 2008 αναλύοντας δείγματα από διάφορα μέρη της Ινδίας ανίχνευσαν υπολείμματα endosulfan (endosulfan a, endosulfan b και endosulfan sulfate) σε ογδονταεννέα από τα τριακόσια είκοσι πέντε δείγματα αγελαδινού γάλακτος. Η συχνότητα των ευρημάτων του endosulfan a ήταν μεγαλύτερη (23,69%) σε σχέση με το endosulfan b (19,07%), ενώ η μέση συγκέντρωση της ουσίας (0.0065 mg/kg) ήταν μικρότερη (0.0229 mg/kg). Η μέση συγκέντρωση του endosulfan στα ογδονταεννέα δείγματα εκτιμάται στα 0.0492 mg/kg.

Σε αντίθεση με τις παραπάνω μελέτες οι Darko και Acquah (2008)⁸⁶ ανίχνευσαν υπολείμματα endosulfan σε συγκέντρωση 0.09 µg/kg σε αγελαδινό γάλα (κάτω από το MRL που θεσπίζει ο FAO⁹⁷ στην Δημοκρατία της Γκάνα. Οι Salem et al. (2009) ανίχνευσαν υπολείμματα endosulfan (endosulfan a) σε συγκέντρωση 0,03 mg/ kg(εκφραζόμενο σε gr λίπους) σε ένα από εβδομήντα δείγματα αγελαδινού γάλακτος και σε κανένα δείγμα αιγοπρόβιου γάλακτος.

Στα πλαίσια της διατριβής, εκτός του endosulfan ανιχνευτήκαν υπολείμματα και άλλων φυτοπροστατευτικών προϊόντων όπως το azoxystrobin (δυο δείγματα) σε συγκεντρώσεις 0,005 και 0,013 mg/kg, malathion (ένα δείγμα) 0,13 mg/kg, pirimiphos methyl (ένα δείγμα) 0,011 mg/kg, carbaryl (ένα δείγμα) 0,033 mg/kg και dimetoate (ένα δείγμα) 0,136 mg/kg, όλα σε δείγματα συμπυκνωμένης ζωοτροφής. Επίσης, στα δείγματα μηδικής ανιχνεύτηκε η παρουσία των bupirimate, phosmet, carbaryl and desmetryn σε συγκεντρώσεις 0,013, 0,004, 0,003 και 0,003 mg/kg αντιστοίχως. Όλα τα επίπεδα που ανιχνεύτηκαν ήταν χαμηλότερα του MRL. Στα δείγματα βοσκής και άχυρου δεν ανιχνεύτηκαν υπολείμματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.

Μια άλλη σημαντική ρύπανση του γάλακτος αφορά τη ρύπανση του γάλακτος των αιγοπροβάτων από υπολείμματα HCH και DDT, κυρίως σε δείγματα των χωρών Κίνα⁹⁸, Ιορδανία⁹⁹, Ινδία^{84,85,100}, και Δημοκρατία της Γκάνας,⁸⁶ στις οποίες οι ουσίες αυτές αποτελούν τον πρωταρχικό

παράγοντα ρύπανσης από φυτοπροστατευτικά προϊόντα. Οι ουσίες αυτές συμπεριλήφθηκαν στους στόχους της μεθόδου ωστόσο δεν ανιχνεύθηκαν υπολείμματά τους στα δείγματα που μελετήθηκαν στα πλαίσια της διατριβής.

4.16. Συμπεράσματα

Μια σειρά δειγμάτων ζωοτροφών από διάφορα μέρη της Ελλάδας και το γάλα αιγοπροβάτων τα οποία διατράφηκαν με αυτές μελετήθηκαν με στόχο την ανίχνευση της παρουσίας υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Για το σκοπό αυτό, δυο νέες, οικονομικές, εύκολες και αξιόπιστες πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι προσδιορισμού των φυτοπροστατευτικών προϊόντων αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν σε ζωοτροφές και λίπος. Η μέθοδος ανάλυσης των ζωοτροφών παρουσίασε καλή ορθότητα και πιστότητα με ανακτήσεις που κυμάνθηκαν από 48-129.2% και τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 26.8%. Παράλληλα, η μέθοδος ανάλυσης του λίπους παρουσίασε καλή ορθότητα και πιστότητα με ανακτήσεις που κυμάνθηκαν από 70.2-114.7% και με τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης μικρότερες από 20.6%. Πέραν από την επιτυχή επικύρωσή τους, η αξιοπιστία των νέων μεθόδων επισφραγίστηκε με την επιτυχή συμμετοχή τους σε διεργαστηριακές δοκιμές της Ε.Ε.

Συνολικά, στα πλαίσια της διατριβής αναλύθηκαν σαρανταέξι δείγματα ζωοτροφών και τριαντατέσσερα δείγματα γάλακτος αιγοπροβάτων. Ένα σημαντικό ποσοστό τους βρέθηκε θετικό σε παρουσία υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, με ιδιαίτερα έντονη την παρουσία υψηλών επιπέδων συγκεντρώσεων του endosulfan, ενός αρκετά τοξικού μορίου που είναι απαγορευμένο σε Ευρώπη, Αμερική και άλλες χώρες. Η παρουσία του δεν επιβεβαιώθηκε στα δείγματα γάλακτος των αιγοπροβάτων που είχαν διατραφεί με τις τροφές αυτές.

5. Ανάπτυξη και επικύρωση μιας γρήγορης και εκλεκτικής μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων με τη χρήση GC-MS/MS σε ζωικά προϊόντα.

5.1. Εισαγωγή

Τα ζωικά προϊόντα αποτελούν μια ευρεία ομάδα τροφίμων τα οποία σύμφωνα με τον κανονισμό 853/2004 της Ε.Ε. χωρίζονται σε οκτώ μεγάλες κατηγορίες (κρέας, ζώντα δίθυρα μαλάκια, αλιευτικά προϊόντα, γάλα, αυγά, βατραχοπόδαρα και σαλιγκάρια, μεταποιημένα προϊόντα, λοιπά προϊόντα).

Από αναλυτική πλευρά τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης αποτελούν μια ιδιαίτερη κατηγορία υποστρωμάτων που χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά¹⁰¹ και κατηγοριοποιούνται σε:

1. γάλα και προϊόντα γάλακτος,
2. κρέας και προϊόντα κρέατος,
3. αλιεύματα και προϊόντα αλιείας
4. αυγά πτηνών.

Τα αγροτικά ζώα που εκτρέφονται για πάχυνση συσσωρεύουν οργανικούς ρύπους μέσω της διατροφής (νερό και ζωοτροφές) ή του περιβάλλοντος (π.χ. χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε βοσκοτόπια ή από απ' ευθείας επέμβαση στα ζώα για την καταπολέμηση εντόμων υγειονομικής σημασίας). Η συσσώρευση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων γίνεται στο λιπώδη ιστό και τους μυς. Σε σπάνιες περιπτώσεις είναι δυνατόν υπολείμματα των ουσιών αυτών να ανιχνευτούν και σε άλλα όργανα, όπως ο εγκέφαλος, το συκώτι και οι πνεύμονες. Στην βιβλιογραφία έχουν δημοσιευτεί μελέτες που αναφέρουν την παρουσία υπολειμμάτων σε εντόσθια^{102,103,104} και τροφές που περιέχουν προϊόντα κρέατος όπως οι παιδικές¹⁰⁵ και οι μεταποιημένες¹⁰⁶. Είναι φανερό ότι και τα ζώα γαλακτοπαραγωγής είναι εκτεθειμένα στα φυτοπροστατευτικά αυτά προϊόντα μέσω της διατροφής τους. Σε αυτά η συσσώρευση των υπολειμμάτων εκτός από τα μέρη του σώματος που προαναφέρθηκαν γίνεται και στο γάλα τους. Βέβαια, η μόλυνση του γάλακτος των ζώων αυτών μπορεί να πραγματοποιηθεί και μέσω άλλων διαδικασιών, όπως η απολύμανση των χώρων των κτηνοτροφικών μονάδων ή των χώρων επεξεργασίας του γάλακτος^{107,108,109}. Η ρύπανση του γάλακτος είναι μείζονος σημασίας αφού το γάλα αποτελεί τη βασική τροφή του ανθρώπου κατά τα πρώτα στάδια της ζωής του¹⁰⁷.

Όπως προαναφέρθηκε, το λίπος είναι το χαρακτηριστικό που προσδίδει αναλυτική ιδιαιτερότητα στα τρόφιμα αυτά. Το λίπος είναι το συστατικό του υποστρώματος που πρέπει να αφαιρεθεί από το τελικό εκχύλισμα στο δυνατόν μέγιστο βαθμό, αφού μπορεί να προκαλέσει σημαντικά προβλήματα στην ανάλυση παρεμποδίζοντας το υπόστρωμα ή προκαλώντας σημαντικές ζημιές στον αναλυτικό εξοπλισμό (π.χ. μόλυνση του εγχυτή, μείωση του χρόνου ζωής ή μείωση απόδοσης της χρωματογραφικής στήλης).

Πληθώρα τεχνικών έχουν υιοθετηθεί για τον καθαρισμό των δειγμάτων τροφίμων από το λίπος. Οι περισσότερες βασίζονται στις διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες των μορίων του λίπους και των φυτοπροστατευτικών ουσιών.

Εκχύλιση μεταξύ 2 υγρών

Η εκχύλιση μεταξύ 2 υγρών αποτελεί την πλέον διαδεδομένη τεχνική απομόνωσης, η οποία για καλύτερη αποτελεσματικότητα, συνδυάζεται με μια μεγάλη ποικιλία συμπληρωματικών τεχνικών απομόνωσης των αναλυτών όπως εκχύλιση στερεής φάσης, χρωματογραφία πηκτής. Οι συνδυασμοί ακετονιτριλίου και εξανίου ή ισοοκτανίου αποτελούν τους πλέον διαδεδομένους συνδυασμούς διαλυτών για το διαχωρισμό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων με εντομοκτόνο δράση από τα βιολογικά λιπώδη και κήρους^{108,110,111,112,113,114,115}. Οι Pagliuca et al⁸³ και οι Argauer et al¹¹⁰ χρησιμοποίησαν για την εκχύλιση οργανοφωσφορικών ενώσεων από γάλα και κρέας μίγμα διαλυτών ακετόνης:ακετονιτριλίου (1:4) σε συνδυασμό με διαχωρισμό με διχλωρομεθάνιο. Η προαναφερθείσα μέθοδος εκχύλισης δεν είναι πλέον επαρκής για τα επίπεδα συγκέντρωσης των αναλυτών που αναμένεται-απαιτείται να επιτευχθούν. Στις περισσότερες περιπτώσεις η τεχνική αυτή απαιτεί ένα επιπλέον στάδιο καθαρισμού του δείγματος, συνήθως την εκχύλιση στερεάς φάσης^{83,110,114,116}.

Χρωματογραφία προσρόφησης

Είναι μια από τις πλέον δημοφιλείς τεχνικές καθαρισμού μετά από την εκχύλιση μεταξύ 2 υγρών. Αν και πολλά προσροφητικά μέσα είναι διαθέσιμα στην αγορά, για τις πρώτες μεθόδους που αναπτύχθηκαν χρησιμοποιήθηκαν στήλες με οξειδίο του μαγνησίου και Florisil^{117,118,119}. Άλλα υλικά που χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του λίπους είναι το τριοξειδίο του αργιλίου (alumina), και το διοξειδίο του πυριτίου (silica gel)^{120,121,122}. Αυτές οι τεχνικές καθαρισμού συνίστανται για την εκχύλιση αναλυτών με χαμηλή πολικότητα όπως οι οργανοχλωριωμένοι αναλύτες και τα PCBs.

Σαπωνοποίηση

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει τη σαπωνοποίηση των λιπαρών οξέων με υδροξείδιο του καλίου για το σχηματισμό υδατοδιαλυτών προϊόντων και στην συνέχεια εκχύλισή τους με πετρελαϊκό αιθέρα^{117,118,119,123}. Η τεχνική αυτή είναι αποτελεσματική αλλά η χρήση της περιορίζεται για αναλύτες οι οποίοι είναι ανθεκτικοί σε αυτή την διαδικασία όπως μερικά οργανοχλωριωμένα.

Οξίνη χώνευση

Η τεχνική αυτή αφορά την επεξεργασία του δείγματος με ισχυρό οξύ (π.χ. θεικό) για τη διάσπαση του ζωικού λίπους και στη συνέχεια ανάλυση με GC. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων ουσιών όπως τα TCDD, PCBs και DDT (και τους μεταβολίτες τους), λόγω της ανθεκτικότητας που παρουσιάζουν σε βάσεις και οξέα, ιδιότητα που δικαιολογεί και τον μικρό βαθμό διάσπασής τους στο περιβάλλον¹²⁴.

Απομόνωση μέσω απόσταξης (Sweep codistillation)

Ο όρος αυτός αρχικά χρησιμοποιήθηκε για να περιγραφεί μια μέθοδος καθαρισμού για τον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά¹²⁵. Η τεχνική αυτή βρήκε σημαντικές εφαρμογές στον προσδιορισμό οργανοχλωριωμένων φυτοφαρμάκων σε κρέας, βούτυρο και λοιπά γαλακτοκομικά προϊόντα. Βασίζεται δε στην πτητικότητα ορισμένων φυτοφαρμάκων σε σχέση με τα μη πτητικά λιπαρά οξέα. Αρκετά δημοφιλής ήταν σε εμπορική κλίμακα μια συσκευή με ακρωνύμιο Unitrex, η οποία αποτελεί μια μορφή προπαρασκευαστικής αέριας χρωματογραφίας¹²⁴.

Χρωματογραφία πηκτής

Η χρωματογραφική αυτή τεχνική που στηρίζεται στον διαχωρισμό των συστατικών με βάση το μέγεθος τους, έχει εφαρμοστεί σε προηγούμενο κεφάλαιο της διατριβής. Στην συγκεκριμένη περίπτωση τα μόρια του λίπους που είναι μεγαλύτερα (μοριακές μάζες $M_R=600-1500$) από τα μόρια των φυτοφαρμάκων (μοριακές μάζες $M_R=100-700$) δεν κατακρατούνται από την στατική φάση της στήλης με αποτέλεσμα να εκκλύονται πρώτα. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως για τον

καθαρισμό ζωικών προϊόντων με υψηλή περιεκτικότητα σε λίπος¹²⁵. Σε ορισμένα όμως υποστρώματα η τεχνική αυτή δεν επαρκεί γιατί το τελικό έκλουσμα μπορεί να περιέχει υπολείμματα λίπους¹²⁵.

Εκχύλιση στερεής φάσης (SPE)

Η εκχύλιση στερεής φάσης χρησιμοποιείται συστηματικά ως τεχνική καθαρισμού ποικιλίας φυτικών και ζωικών υποστρωμάτων σε μεθόδους προσδιορισμού υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Οι Doong and Lee¹²⁶ σύγκριναν την απόδοση τριών διαφορετικών προσροφητικών υλικών (C₁₈, alumina, florisil) για τον καθαρισμό εκχυλίσματος οστρακοειδών που είχε εμβολιαστεί με δεκατέσσερις διαφορετικά οργανοφωσφορικά. Το C₁₈ έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα για τους δώδεκα από τους αναλύτες αυτούς, σε αντίθεση με την alumina και το florisil που έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα για το σύνολο των αναλυτών, ενώ με το florisil έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από πλευράς ανακτήσεων, επαναληψιμότητας και εξάλειψης της επίδρασης του υποστρώματος. Ο Schenck et al. παρατήρησαν ότι μια ελαφριά αύξηση της πολικότητας του διαλύτη έκλουσης αύξησε την αποτελεσματικότητα της τεχνικής SPE για τον προσδιορισμό οργανοφωσφορικών ουσιών¹²⁷. Ομοίως οι Hong et al.¹¹¹ μελέτησαν την επίδραση των C₁₈ και florisil για τον καθαρισμό εκχυλίσματος ιχθύων που ήταν εμβολιασμένα με οργανοχλωριωμένα βρίσκοντας το florisil ως αποτελεσματικότερο μέσο καθαρισμού των λιπαρών οξέων. Για καλύτερη ανάκτηση και ελαχιστοποίηση της επίδρασης του υποστρώματος, χρησιμοποιούνται συνδυασμός δυο ή τριών φυσιγγίων SPE^{128,129,130,131}.

Κατακρήμνιση του λίπους υπό συνθήκες κατάψυξης

Η τεχνική της κατακρήμνισης σε χαμηλές θερμοκρασίες (-79°C) σε λουτρό με ξηρό πάγο-μεθανόλη χρησιμοποιείται για τον διαχωρισμό πολικών και άπολων φυτοπροστατευτικών ουσιών από λίπη, κηρούς και νερό, τα οποία παγώνουν και κατακρημνίζονται αφήνοντας στην οργανική φάση (ακετόνη-βενζόλιο) τους αναλύτες-στόχους. Στη συνέχεια, η οργανική φάση διηθείται για να απομακρυνθούν τα στερεά υπολείμματα και το τελικό εκχύλισμα είναι πλέον έτοιμο για ανάλυση σε σύστημα GC. Τα προβλήματα που έχουν αναφερθεί σχετίζονται με την απώλεια αναλυτών μέσω της συγκαθίζησης τους με σωματίδια του υποστρώματος ή προσρόφησης τους κατά τη διαδικασία φιλτραρίσματος του παγωμένου εκχυλίσματος. Αν και αρκετά απλή, η τεχνική αυτή δεν έχει έως τώρα χρησιμοποιηθεί σε μεγάλο βαθμό.

5.2. Υλικά και Αντιδραστήρια

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
2. Ακετόνη, καθαρότητας Pestiscan(Lab Scan).
3. Τολουόλιο, καθαρότητας Pestiscan(Lab Scan).
4. 2.2.4 Τριμέθυλοπεντάνιο, καθαρότητας Pestiscan(Lab Scan).
5. Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (Fluka).
6. Μυρμηκικό Αμμώνιο (Fluka).
7. Πρωτοταγής-Δευτεροταγής αμίνη (Bondesil-PSA 40μm) (Varian Inc).
8. Φιάλες φυγοκέντρου των 50mL από teflon και με βιδωτό πώμα.
9. Φιάλες φυγοκέντρου των 15mL από polypropylene και με βιδωτό πώμα.
10. Γυάλινα φιαλίδια των 8 mL με πώμα από teflon (PTFE).
11. Ήλιο (He), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
12. Άζωτο (N₂), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
13. Συνθετικός αέρας, ελεύθερος υδρογονανθράκων.
14. Υδρογόνο (H₂), καθαρότητας χρωματογραφίας ECD (99,999%).
15. Σαράντα πρότυποι αναλύτες αναφοράς γνωστής καθαρότητας (Dr Ehrenstorfer Laboratories GmbH /Chem Service, Inc): acclonifen, acrinathrin, HCH-b, benalaxyl, bifenthrin, bitertanol A, bitertanol B, bromopropylate, chlorpropham, cyfluthrin, cypermethrin, DDD pp, DDE pp, DDE, o,p, DDT op, deltamethrin, dicloran, dicofol op, dicofol pp, endosulfan sulfate, ethalfluralin, ethion, fenpropathrin, fenthion, HCH-a, heptachlor, lambda cyhalothrin, lindane, methacrifos, methidathion, parathion methyl, permethrin, phorate, propizamide, quintozone, tau-fluvalinate, tetradifon, toclofos methyl, trifluralin, vinclozolin.

5.3. Εξοπλισμός

1. Φυγόκεντρος 4000 στροφών/min.
2. Αεριοχρωματογράφος με εγχυτή θερμοκρασιακά προγραμματιζόμενης εξαέρωσης (PTV) στήλη τύπου Factor Four Capillary Column VF-5 ms (30×0.25 mm I.D.×0.25 μm film thickness) με προστήλη (fused silica untreated capillary column 5×0.53 mm I.D cyano-phenyl-methyl deactivated) (Varian Inc) συνδεδεμένος με ανιχνευτή συζευγμένης φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου (MS/MS), για λειτουργία με τις τεχνικές ιοντισμού πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI) & χημικού ιοντισμού (CI) και τεχνική λειτουργίας ταυτόχρονης παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων, με εύρος λειτουργίας 50-1000 amu.

5.4. Επιλογή αναλυτών

Για την επικύρωση της μεθόδου επιλέχθηκαν να μελετηθούν κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων με υψηλή σταθερότητα στο περιβάλλον και τάση συσσώρευσης σε ζωικούς ιστούς (κυρίως στο λιπώδη ιστό), αφού τα μόρια απαντώνται σε ζωικά προϊόντα. Οι κύριες κατηγορίες αναλυτών αφορούν τις οργανοφωσφορικές και οργανοχλωριωμένες ενώσεις και τις πυρεθρίνες. Από κάθε κατηγορία επιλέχθηκαν αναλύτες με εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων (διαλυτότητα σε νερό, τάση ατμών, $\log P_{ow}$) που να καλύπτει όλο το εύρος τιμών της κατηγορίας τους.

5.5. Παρασκευή Προτύπων διαλυμάτων Παρακαταθήκης

Τα διαλύματα παρακαταθήκης συγκεντρώσεων 500-1000 ng/mL παρασκευάστηκαν σε ακετόνη και σε ελάχιστες περιπτώσεις σε μεθανόλη, ανάλογα με την διαλυτότητα του κάθε αναλύτη. Αυτά αποθηκεύτηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια με πώμα από Teflon και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Η ζύγιση της στερεάς δραστικής ουσίας για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών, ενώ ελήφθη υπόψη και ο βαθμός καθαρότητας τους. Ένα διάλυμα εργασίας στο οποίο εμπεριέχονται όλες οι παραπάνω ουσίες παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 1 μg/mL σε ακετονιτρίλιο.

5.6. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας

Για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας σε υπόστρωμα κρέατος ή γάλακτος στα οποία είχε πιστοποιηθεί η απουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Σε 1-x mL από το εκχύλισμα του μάρτυρα προστίθεται ποσότητα x mL προτύπου δ/τος. Ο χρησιμοποιούμενος όγκος x mL πρέπει να είναι αμελητέος σε σχέση με τον όγκο του τελικού δ/τος (1 mL) για να μην αραιωθεί η συγκέντρωση του υποστρώματος σε βαθμό που να μεταβάλλεται η επίδραση του. Στον επόμενο πίνακα δίνεται παράδειγμα τρόπου παρασκευής διαλυμάτων εργασίας με όγκο τελικού διαλύματος 1 mL.

Συγκέντρωση αρχικού δ/τος (μg/mL)	Χρησιμοποιούμενος όγκος (μL)	Συγκέντρωση τελικού δ/τος (μg/mL)
0,1	30	0,003
0,1	50	0,005
0,1	100	0,01
0,1	250	0,025
1	50	0,05
1	80	0,08
1	100	0,1
1	150	0,15
1	200	0,2
1	300	0,3

Τέλος, κάθε πρότυπο πριν από την χρωματογραφική ανάλυση διηθήθηκε από φίλτρο τύπου syringe filter 0,45μm σε φιαλίδιο των 2mL και πωματίστηκε με πώμα PTFE.

5.7. Μέθοδος Εκχύλισης

Σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL ζυγίστηκαν $5 \pm 0,05$ (m_s) g δείγματος προστέθηκαν 10 mL (V_1) ακετονιτριλίου, ακολούθησε ανακίνηση με το χέρι επί 1 min και κατάψυξη στους -20°C για > 12 ώρες. Στην κατάψυξη καθιζάνουν τα συνεκχυλισμάτα που παρουσιάζουν μικρή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο με αποτέλεσμα να καθιζάνει η μεγαλύτερη ποσότητα των λιπαρών ουσιών. Στη συνέχεια 6 mL από το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκαν εν ψυχρώ σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL, η οποία περιείχε 900 mg MgSO_4 και 150 mg PSA. Ακολουθεί ανακίνηση με το χέρι για 1 min και φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές/ min για 5 min. Το υπερκείμενο υγρό μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 8 mL, με πώμα PTFE και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη έτοιμο για ανάλυση με GC-MS/MS.

5.8. Προσδιορισμός λίπους

Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως τρόφιμα με περιεκτικότητα σε λίπος >10%, η συγκέντρωση του υπολείμματος εκφράζεται ως mg/kg λίπους, με αποτέλεσμα να είναι αναγκαίος ο προσδιορισμός του λίπους του προϊόντος που αναλύθηκε. Η διαδικασία που ακολουθείται είναι ως παρακάτω:

Τμήμα του δείγματος (10g) ζυγίζεται σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 250 mL, προστίθενται 50 mL οξικού αιθυλεστέρα, αναδεύονται για 3 min σε ultra turrax (μεσαία ταχύτητα) και φυγοκεντρούνται για 5 min στις 4000 στροφές/min. Στη συνέχεια, 45 mL από το υπερκείμενο υγρό αφού μεταφέρθηκαν σε προζυγισμένη φιάλη των 100 mL εξατμίστηκαν σε περιστροφικό εξατμιστήρα υπό κενό στους 40° C, για να παραληφθεί μόνο το λίπος η ποσότητα του οποίου προσδιορίστηκε ως η διαφορά του βάρους της φιάλης μεταξύ των 2 ζυγίσεων.

5.9. Προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου

Ο διαχωρισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με στήλη τύπου Factor Four Capillary Column VF-5 ms (30×0.25 mm I.D.×0.25 μm film thickness) και προστήλη (fused silica untreated capillary column 5×0.53 mm I.D. cyano-phenyl-methyl deactivated). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του φούρνου περιλάμβανε: Από αρχική θερμοκρασία 70°C (παραμονή για 2 λεπτά), άνοδος στους 180°C με ρυθμό ανόδου 30°C/ λεπτό, άνοδος στους 230°C με ρυθμό 1,8°C/ λεπτό, άνοδος στους 280° C με ρυθμό 30° C/ λεπτό.

Εγχύθηκαν 5 μL του τελικού εκχυλίσματος σε λειτουργία split ως εξής:

0 min	Split on, 60:1
0,75 min	Split off
3 min	Split on, 50:1
6 min	Split 10:1

Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του εγχυτή περιλάμβανε: 90°C (παραμονή για 0,75 λεπτά) άνοδος στους 280°C με ρυθμό 200°C/λεπτό και κάθοδος στους 90° C με ρυθμό 200° C/ λεπτό.

Οι βασικές παράμετροι του φασματόμετρου μάζας ρυθμίστηκαν ως εξής:

- ✓ Θερμοκρασία πηγής: 250 °C,
- ✓ Θερμοκρασία διασυνδετή 280 °C,
- ✓ Καθυστέρηση ενεργοποίησης filament: 6 min.

- ✓ Αέριο κελιού θραυσματοποίησης: Αργό καθαρότητας 99.999 %, 0,2Pa.
- ✓ Τάση ανιχνευτή: 1500Volt.
- ✓ Τεχνική ιονισμού: Πρόσκρουση ηλεκτρονίων σε θετικό ιονισμό (EI⁺)
- ✓ Χρόνος συλλογής μεταπτώσεων: 10-50msec ανάλογα με τον αναλύτη.
- ✓ Ενέργεια θραυσματοποίησης: παρουσιάζεται στον **Πίνακα II του Παραρτήματος** και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.

5.10. Ταυτοποίηση

Η παρουσία αναλύτη στο δείγμα ταυτοποιήθηκε αφενός με την εμφάνιση χρωματογραφικών κορυφών σε χρόνο πλησίον του χρόνου κατακράτησης της πρότυπης ουσίας ($\pm 1,5\%$ για GC) και αφετέρου από το λόγο των δυο μεταπτώσεων που πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις του παρακάτω Πίνακα⁵⁵.

Σχετική ένταση ιόντος (% της βασικής κορυφής)	GC-MS-MS (επιτρεπόμενη απόκλιση %)
> 50 %	± 20 %
> 20 % ως 50 %	± 25 %
> 10 % ως 20 %	± 30 %
$\leq 10\%$	± 50 %

5.11. Προσδιορισμός

Η περιεκτικότητα του αναλύτη στο δείγμα, σε mg/kg, υπολογίζεται, από την εξίσωση:

$$C = f \times C_I$$

όπου:

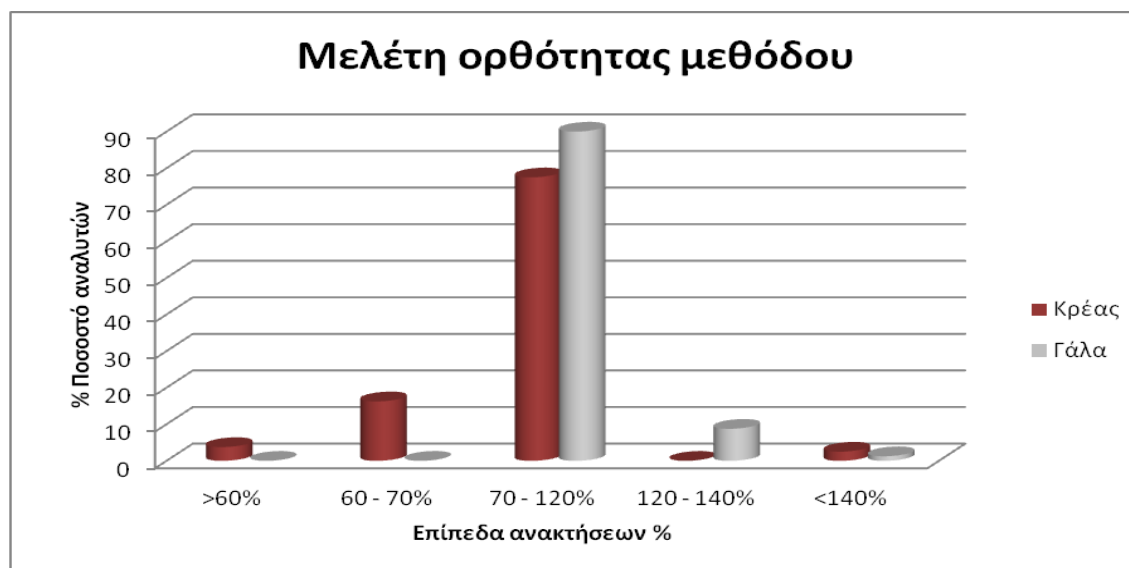
- ✓ C_I είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο τελικό προς έγχυση διάλυμα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με πρότυπα διαλύματα αναφοράς. και
- ✓ ο συντελεστής $f = V_I / m_s$ (V_I , ο όγκος των διαλυτών και m_s η μάζα του δείγματος) που στην παρούσα μέθοδο είναι ίσος με την τιμή: $f=2$

5.12. Αποτελέσματα και συζήτηση

5.12.1. Ορθότητα – Πιστότητα

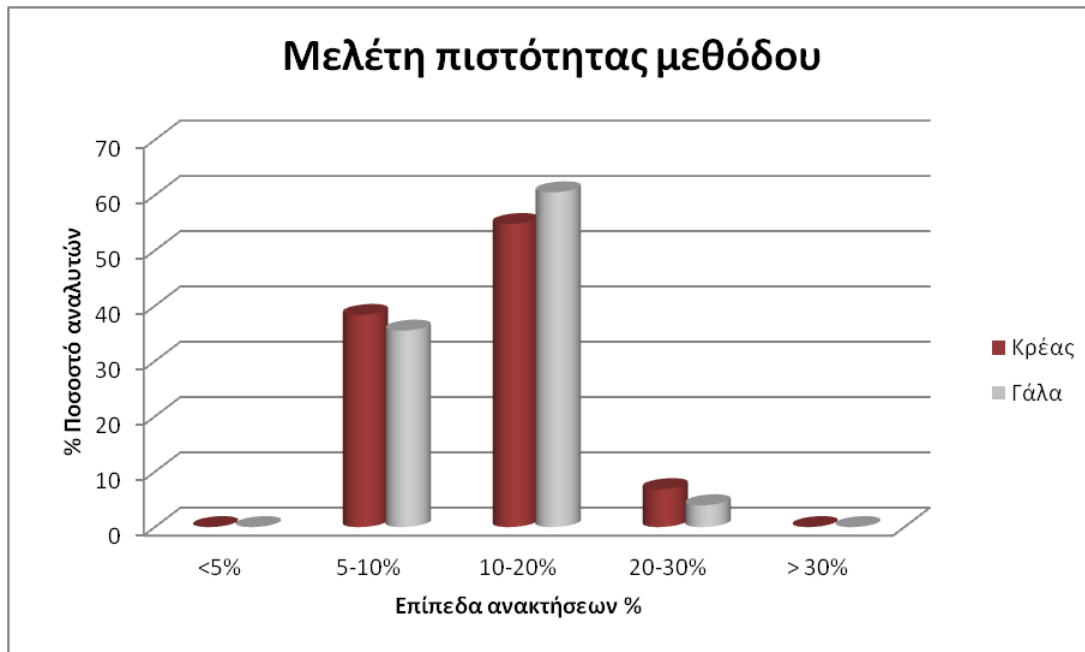
Η εργαστηριακή εκτίμηση της ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου προσδιορίστηκε με την εφαρμογή της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα μάρτυρα (κρέας και γάλα) για 5 επαναλήψεις. Στο πλαίσιο αυτό, ποσότητα $5 \pm 0,05$ gr από το κρέας ή το γάλα εμβολιάστηκε σε 2 επίπεδα με γνωστές συγκεντρώσεις των αναλυτών και προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος εργασίας. Ως χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού προστέθηκαν 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και ως υψηλότερο το δεκαπλάσιό του. Για την εκτίμηση της ορθότητας ελέγχτηκε η ανάκτηση και της πιστότητας η σχετική τυπική απόκλιση (SDr).

Όπως παρατηρείται στο **Διάγραμμα 5.1** το 77,5% και το 90% των αναλυτών για το κρέας και το γάλα αντίστοιχα, παρουσίασαν ανακτήσεις εντός του αποδεκτού εύρους 70-120%. Στο κρέας ένα ποσοστό 16,25% των ουσιών παρουσίασε ανακτήσεις από 60-70% ενώ ένα 6,25% ανακτήσεις μεγαλύτερες από 140% ή μικρότερες από 60%. Για τις τιμές με ανακτήσεις εκτός των ορίων, η μέθοδος δύναται να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των αναλυτών σε δείγματα μετά από διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς την ανάκτηση, καθώς οι τιμές των σχετικών τυπικών αποκλίσεων είναι αποδεκτές.



Διάγραμμα 5.1. Μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις των 40 αναλυτών για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα κρέας (κόκκινο) και γάλα (λευκό) κατανεμημένες σε 5 κατηγορίες

Σχετικά με την πιστότητα (Διάγραμμα 5.2), η μέθοδος παρουσίασε καλή επαναληψιμότητα, με την πλειονότητα των αναλυτών (93,15% για το κρέας και 96,05% για το γάλα) να έχουν σχετικές τυπικές αποκλίσεις κάτω του 20%.



Διάγραμμα 5.2. Σχετικές τυπικές αποκλίσεις των 40 αναλυτών για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα κρέας (κόκκινο) και γάλα (λευκό) κατανεμημένες σε 5 κατηγορίες

Αναλυτικότερα, οι επιμέρους τιμές των μέσων ανακτήσεων και των σχετικών τυπικών αποκλίσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1.

Αναλύτης	Επίπεδο (N=6)	Κρέας		Γάλα	
		R (%)	SDr	R (%)	SDr
acлонifen	0,010	88,21	6,44	117,64	19,11
acлонifen	0,100	83,28	10,52	116,07	7,54
acrinathrin	0,010	102,60	17,64	119,75	4,74
acrinathrin	0,100	99,01	10,65	87,85	9,24
benalaxyl	0,010	141,72	11,48	100,23	19,61
benalaxyl	0,100	91,95	5,19	119,82	0,80
bifenthrin	0,010	94,24	8,26	83,55	5,82

Αναλύτης	Επίπεδο (N=6)	Κρέας		Γάλα	
		R (%)	SDr	R (%)	SDr
bifenthrin	0,100	81,28	8,43	113,85	10,62
bitertanol A	0,010	85,89	5,78	90,25	6,00
bitertanol A	0,100	80,10	9,16	120,01	9,45
bitertanol B	0,010	88,48	4,50	111,80	8,98
bitertanol B	0,100	76,06	9,68	112,10	15,96
bromopropylate	0,010	92,73	6,32	108,72	9,85
bromopropylate	0,100	91,21	9,20	143,10	12,06
chlorpropham	0,010	99,58	17,38	84,53	19,71
chlorpropham	0,100	96,51	15,24	74,70	19,05
cyfluthrin	0,010	79,14	10,78	106,64	15,70
cyfluthrin	0,100	83,21	5,77	110,57	10,29
cypermethrin	0,010	77,95	10,59	109,33	2,42
cypermethrin	0,100	80,27	4,79	107,76	10,41
DDD pp	0,010	62,82	11,33	87,68	10,48
DDD pp	0,100	64,22	8,53	119,96	7,39
DDE pp	0,010	85,68	16,27	72,85	11,93
DDE pp	0,100	52,01	10,55	87,54	16,48
DDE, o,p	0,010	90,48	15,38	71,06	6,98
DDE, o,p	0,100	60,28	8,37	85,29	5,89
DDT op	0,010	61,12	11,65	87,53	10,08
DDT op	0,100	64,94	9,08	119,70	7,62
deltamethrin	0,010	76,44	6,45	103,23	13,82
deltamethrin	0,100	69,68	4,29	120,06	6,78
dicloran	0,010	72,40	9,12	77,57	16,37
dicloran	0,100	77,23	4,02	85,15	15,42
dicofol op	0,010	157,71	13,46	88,79	16,90
dicofol op	0,100	89,41	3,98	114,36	7,24

Αναλύτης	Επίπεδο (N=6)	Κρέας		Γάλα	
		R (%)	SDr	R (%)	SDr
dicofol pp	0,010	107,47	15,71	105,94	25,89
dicofol pp	0,100	73,38	8,46	120,07	7,79
endosulfan sulfate	0,010	68,73	10,60	94,58	15,92
endosulfan sulfate	0,100	75,69	9,20	131,85	12,20
ethalfluralin	0,010	60,36	11,74	75,67	19,35
ethalfluralin	0,100	75,94	8,91	73,90	5,81
ethion	0,010	105,08	6,85	100,05	9,09
ethion	0,100	100,78	12,20	100,39	11,34
fenpropathrin	0,010	90,82	9,29	109,48	9,95
fenpropathrin	0,100	88,09	7,11	115,55	13,95
fenthion	0,010	88,95	8,01	70,73	15,62
fenthion	0,100	86,31	11,50	103,55	9,73
HCH-a	0,010	89,85	24,84	84,98	18,12
HCH-a	0,100	68,70	16,60	70,09	10,09
HCH-b	0,010	75,36	19,36	105,87	10,64
HCH-b	0,100	78,59	12,58	113,80	7,79
heptachlor	0,010	93,04	19,96	95,87	11,69
heptachlor	0,100	108,03	21,30	70,10	20,74
lambda cyhalothrin	0,010	104,39	21,30	120,49	5,31
lambda cyhalothrin	0,100	96,66	10,21	117,00	6,50
lindane	0,010	67,65	16,07	101,62	13,75
lindane	0,100	101,69	13,19	111,42	6,44
methacrifos	0,010	107,25	16,95	107,79	16,45
methacrifos	0,100	104,53	10,46	117,11	14,30
methidathion	0,010	119,71	14,56	121,01	1,84
methidathion	0,100	119,76	13,96	122,76	7,69
parathion methyl	0,010	54,37	13,03	83,64	18,96

Αναλύτης	Επίπεδο (N=6)	Κρέας		Γάλα	
		R (%)	SDr	R (%)	SDr
parathion methyl	0,100	111,92	9,67	88,81	19,02
permethrin	0,010	76,49	10,89	109,06	9,58
permethrin	0,100	72,06	10,56	116,58	7,27
phorate	0,010	104,57	18,37	108,34	20,41
phorate	0,100	90,78	14,39	83,51	10,96
propizamide	0,010	41,89	14,42	110,73	9,63
propizamide	0,100	86,51	26,58	116,67	7,79
quintozene	0,010	68,90	19,18	81,13	14,95
quintozene	0,100	61,48	8,43	91,72	16,99
tau-fluvalinate	0,010	84,01	11,77	104,60	17,80
tau-fluvalinate	0,100	86,35	5,15	115,67	15,18
tetradifon	0,010	74,76	2,75	118,63	17,10
tetradifon	0,100	72,81	8,12	101,16	18,46
toclofos methyl	0,010	91,22	3,46	106,74	13,78
toclofos methyl	0,100	95,70	6,96	89,78	11,57
trifluralin	0,010	66,11	13,70	95,55	14,12
trifluralin	0,100	72,51	25,95	80,63	19,26
vinclozolin	0,010	112,27	13,51	111,96	12,96
vinclozolin	0,100	89,44	6,44	105,12	10,52

Πίνακας 5.1. Μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις R (%) για N=6 και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (SDr) των 40 αναλυτών για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα κρέας και γάλα.

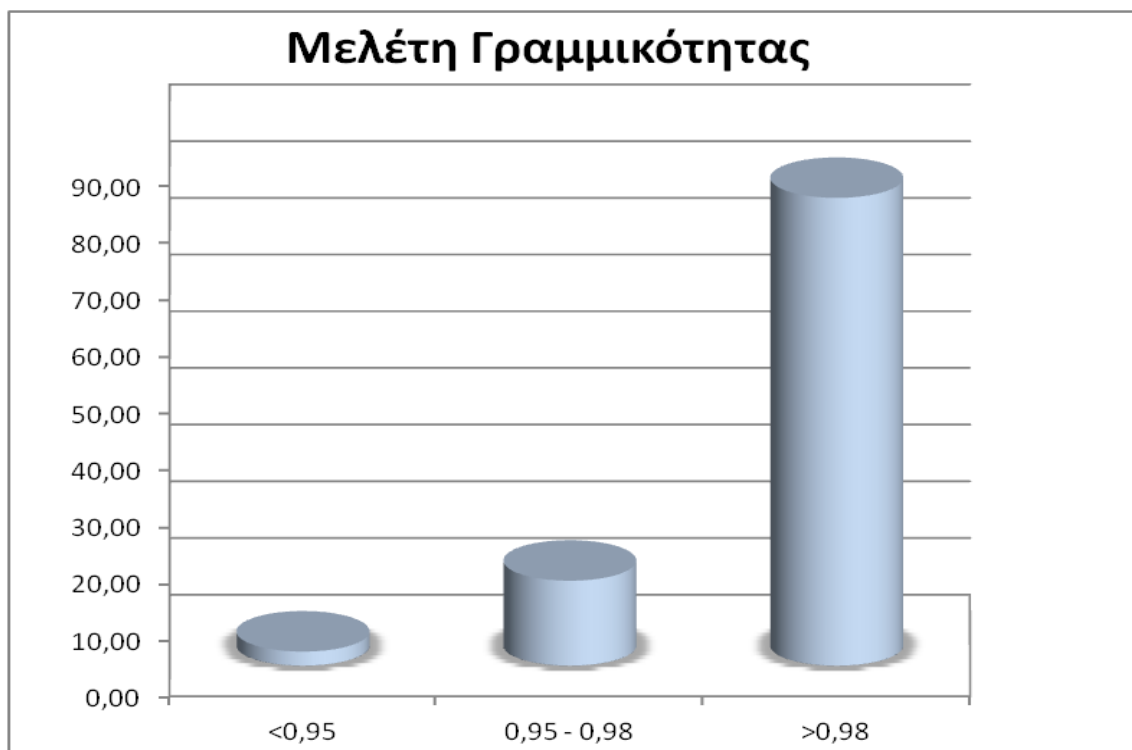
5.12.2. Γραμμικότητα

Η γραμμικότητα ελέγχθηκε σε όλο το εύρος της περιοχής της αναλυτικής μεθόδου. Το σχετικό διάγραμμα κατασκευάστηκε πραγματοποιώντας σειρά εγχύσεων για έξι συγκεντρώσεις των προτύπων (5.0–10–25–50–75–100 μg/L που είχαν διαλυθεί σε ακετονιτρίλιο. Οι βασικές παράμετροι της γραμμής παλινδρόμησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα 5.2**.

Αναλύτης	r	r ²	b	Sb	a	Sa	Su
acлонifen	0.979	0.958	2262349	236604	10909	22290	0.017
acrinathrin	0.983	0.966	21950066	2059136	171031	193985	0.016
benalaxyl	0.989	0.979	8236728	607791	67859	57258	0.012
bifenthrin	0.985	0.971	39838049	3441590	314298	324223	0.014
bitertanol A	0.863	0.745	14722436	4308722	848738	405913	0.049
bitertanol B	0.980	0.960	28149145	2861246	214684	269550	0.017
bromopropylate	0.977	0.955	9930385	1082248	123799	101956	0.018
chlorpropham	0.997	0.994	507864	19691	177	1855	0.006
cyfluthrin	0.987	0.974	1608775	132700	5535	12501	0.014
cypermethrin	0.977	0.954	27878852	3048013	331847	287145	0.018
DDD pp	0.981	0.963	28498990	2791566	210395	262986	0.016
DDE pp	0.991	0.981	6935087	478101	53732	45041	0.012
DDE op	0.994	0.989	5890777	315963	49227	29766	0.009
DDT op	0.982	0.964	28523171	2767074	211182	260678	0.016
deltamethrin	0.985	0.970	3600017	315405	25238	29713	0.015
dicloran	0.994	0.989	1216586	64517	4082	6078	0.009
dicofol op	0.996	0.991	10898967	510463	14657	48089	0.008
dicofol pp	0.998	0.996	10924098	352920	47449	33248	0.005
endosulfan sulfate	0.986	0.971	9714286	834398	53312	78606	0.014
ethalfuralin	0.999	0.998	2299948	45429	1567	4280	0.003
ethion	0.985	0.970	7858958	691405	42514	65135	0.015
fenpropathrin	0.982	0.965	9894090	943147	74910	88851	0.016
fenthion	0.992	0.984	2026047	129640	14455	12213	0.011
HCH-a	0.996	0.992	4350066	196732	20061	18534	0.008
HCH-b	0.992	0.983	7486028	486867	50208	45866	0.011
heptachlor	0.998	0.997	1265246	37466	-11336	3530	0.005
lambda cyhalothrin	0.983	0.965	26365770	2492499	281757	234811	0.016
lindane	0.992	0.984	7034398	445317	61879	41952	0.011
methacrifos	0.996	0.991	318229	14815	890	1396	0.008
methidathion	0.978	0.956	1014117	108525	9562	10224	0.018
parathion methyl	0.998	0.997	603970	17356	508	1635	0.005
permethrin	0.983	0.966	4578930	427563	51914	40279	0.016
phorate	0.997	0.993	338660	13984	1248	1317	0.007
propizamide	0.995	0.991	11587722	557583	69489	52528	0.008
quintozene	0.993	0.985	1568205	95781	4182	9023	0.010
tau-fluvalinate	0.981	0.962	2466916	244692	12133	23052	0.017
tetradifon	0.951	0.905	2366892	383702	-31831	36147	0.027
toclofos methyl	0.998	0.996	3611691	118250	12511	11140	0.005
trifluralin	0.997	0.993	1248041	51823	2130	4882	0.007
vinclozolin	0.987	0.975	898009	71714	7593	6756	0.013

Πίνακας 5.2. Βασικές παράμετροι γραμμών παλινδρόμησης για τους 40 αναλύτες σε δ/τη. (συντελεστής συσχέτισης (r), και το τετράγωνο αυτού (r²), τεταγμένη επί της αρχής (a) η τυπική απόκλιση της (S_a), κλίση της γραμμής (b), η τυπική απόκλιση της (S_b) και η αβεβαιότητα (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις

Σύμφωνα με τα δεδομένα του Πίνακα 5.2 και του Διαγράμματος 5.3 η πλειονότητα των αναλυτών (82,5%) παρουσιάζουν καλή γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης (r) πάνω από 0,98. Ένα 15% παρουσίασε ικανοποιητική γραμμικότητα με r να κυμαίνεται μεταξύ 0,95 και 0,98. Τέλος, ένα μικρό ποσοστό αναλυτών της τάξης του 2,5 % παρουσίασε κακή γραμμικότητα ($r < 0,95$). Για την ποσοτικοποίηση των τελευταίων συνιστάται να χρησιμοποιηθεί κάποια άλλη τεχνική.



Διάγραμμα 5.3. Τιμές συντελεστών συσχέτισης των 40 αναλυτών κατανομημένες σε 3 κατηγορίες

5.12.3. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα, δηλαδή με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα. Για το σκοπό αυτό ελέγχεται ο λόγος σήμα/θόρυβο (S/N), για τον οποίο πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10^{55}$. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου βρέθηκε ίσο με το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού δηλαδή τα 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για όλους τους αναλύτες στο κρέας και στο γάλα.

5.12.4. Διεργαστηριακές Εξετάσεις Ελέγχου Ικανότητας

Η αξιοπιστία της μεθόδου αξιολογήθηκε μέσω της εφαρμογής της στο διεργαστηριακό σχήμα που διοργάνωσε το κοινοτικό εργαστήριο αναφοράς της Ε.Ε. για τρόφιμα ζωικής προέλευσης και προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά. Το υπόστρωμα που στάλθηκε ήταν κρέας κοτόπουλου. Το πεδίο της δοκιμής περιελάμβανε εξηναδύο αναλύτες με απαίτηση για κατώτατο όριο ποσοτικοποίησης που κυμαίνεται από 2–10 µg/kg ανάλογα με τον αναλύτη. Το εργαστήριο εφαρμόζοντας την αναπτυχθείσα μέθοδο προσδιόρισε με επιτυχία και τους δέκα αναλύτες που εμπεριέχονταν στο δείγμα και τους ποσοτικοποίησε με ακρίβεια, όπως διακρίνεται και από τις τιμές των z score του παρακάτω Πίνακα 5.5.

Αναλύτης	Z score
cis-chlordane	0,0
chlorpyrifos ethyl	0,6
chlorpyrifos methyl	0,3
cyfluthrin	0,1
DDT (total)	-0,5
DDD p,p (TDE)	-0,4
deltamethrin	0,9
diazinon	0,2
fevalerate	0,2
Pirimiphos methyl	-0,4
Λίπος: Βρήκαμε 6,4% με διάμεση τιμή 5,5%	

Πίνακας 5.5. Τιμές z-score για τους 10 αναλύτες της διεργαστηριακής δοκιμής με την αναπτυχθείσα μέθοδο.

Η μέθοδος απέδωσε τιμές z-score από -0,4 έως 0,9 και κατατάχθηκε 3^ο μεταξύ 105 εργαστηρίων στην κατηγορία Α.

5.13. Ανάλυση δειγμάτων γάλακτος και κρέατος

Η αναπτυχθείσα μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε πραγματικά δείγματα αγοράς. Συνολικά αναλύθηκαν τριανταοκτώ δείγματα ζωικών προϊόντων (εικοσιτέσσερα κρέατος πουλερικών και δεκατέσσερα δείγματα συκωτιού από βοειδή ή πουλερικά). Η μέθοδος δειγματοληψίας ήταν σύμφωνα με την οδηγία 2002/63/EC¹⁶⁰. Σε κανένα από τα αναλυθέντα δείγματα δεν διαπιστώθηκε η παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

5.14. Συμπεράσματα

Ο τομέας της ανάλυσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ζωικά τρόφιμα χαρακτηρίζεται από πληθώρα πολύπλοκων και υψηλού κόστους τεχνικών ανάλυσης, λόγω της ανάγκης απομάκρυνσης του λίπους από τα εν λόγω προϊόντα. Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε μια νέα, απλή, σύντομη, οικονομική και αξιόπιστη πολυδύναμη μέθοδος προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ζωικά προϊόντα. Ο προσδιορισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας την τεχνική της φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπολού, μια σύγχρονη αλλά όχι τόσο διαδεδομένη τεχνική για την ανάλυση των ξενοβιοτικών ουσιών στα τρόφιμα. Η μέθοδος επικυρώθηκε επιτυχώς για την αξιοπιστία της σε κρέας και γάλα, δύο χαρακτηριστικά και υψηλής κατανάλωσης από βρέφη και παιδιά τρόφιμα, εξασφαλίζοντας έτσι το πολυδύναμο της μεθόδου ως προς την κατηγορία των ζωικών προϊόντων. Από τα στοιχεία επικύρωσης προκύπτει ότι η μέθοδος για την πλειοψηφία των αναλυτών παρουσιάζει αποδεκτή γραμμικότητα με $r \geq 0,99$, αποδεκτή ορθότητα με ποσοστά ανάκτησης 70-120% και πιστότητα με $SD_R \leq 20\%$. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίστηκαν τα 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Τέλος, η αξιοπιστία της μεθόδου επιβεβαιώθηκε επιτυχώς μέσω της διεργαστηριακής δοκιμής της E.E. κατατάσσοντας το εργαστήριο στην κατηγορία Α με 3^η καλύτερη απόδοση μεταξύ 105 συμμετεχόντων εργαστηρίων. Συνολικά κατά την διάρκεια 2010-11 αναλύθηκαν εικοσιτέσσερα δείγματα αγοράς ζωικών προϊόντων και σε κανένα από αυτά δεν διαπιστώθηκε η παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου.

6. Ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών ομάδων φυτορμονών σε φυτικά προϊόντα με την χρήση LC-MS/MS και LC-TOF/MS

6.1. Εισαγωγή

Πριν από 60 περίπου χρόνια άρχισαν οι πρώτες προσπάθειες χρησιμοποίησης χημικών ουσιών με στόχο να επηρεάσουν τις διάφορες φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών και να οδηγήσουν στην αύξηση της απόδοσης τους. Βάση για την ανάπτυξη των ουσιών αυτών αποτέλεσε η ανίχνευση στα φυτά ουσιών αναλόγων των ορμονών του ανθρώπου και των ζώων, οι οποίες ονομάστηκαν ως φυτορμόνες⁴⁷. Η χρήση τους στη φυτική παραγωγή έχει αυξηθεί τα τελευταία χρόνια, ειδικά των συνθετικών φυτορμονών (ορμόνες που παράγονται συνθετικά στο εργαστήριο και μιμούνται τη δράση των φυσικών ορμονών).

Από την πλευρά των αγροτών το μοντέλο της εντατικής γεωργίας, το οποίο χρησιμοποιείται σε αρκετές χώρες, απαιτεί μικρές αγροτικές εκμεταλλεύσεις οι οποίες εστιάζονται στην αύξηση της παραγωγής ανά στρέμμα. Στην Ελλάδα, το μοντέλο αυτό βρίσκει εφαρμογή μέσω της αύξησης των εισροών κεφαλαίου (φυτοπροστατευτικά προϊόντα, λιπάσματα και φυτορμόνες) ή εργασίας στις αγροτικές εκμεταλλεύσεις σε αναλογία με την καλλιεργούμενη έκταση. Από την πλευρά της αγοράς, οι καταναλωτές προτιμούν προϊόντα που τους ελκύουν οπτικά με χαρακτηριστικά τα οποία μπορούν να επιτευχθούν με τη χρήση φυτορμονών (π.χ. στρογγυλό σχήμα, έντονα χρώματα, μεγάλο μέγεθος). Παρόλη την εντατική χρήση τους στην γεωργική παραγωγή δεν υπάρχουν οργανωμένα προγράμματα παρακολούθησης των επιπέδων των φυτορμονών σε εθνικό ή κοινοτική επίπεδο, ούτε πολλά στοιχεία στη βιβλιογραφία σχετικά με την παρουσία τους σε γεωργικά προϊόντα. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί διάφορες μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων των φυτορμονών σε ποικίλα φυτικά υποστρώματα, όμως υπολείπονται σημαντικά των μεθόδων προσδιορισμού άλλων ξενοβιοτικών ουσιών όπως τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.

Η εκχύλιση των φυτορμονών πραγματοποιείται με διάφορους συνδυασμούς διαλυτών και τεχνικών απομόνωσης από το υπόστρωμα. Ένα από τα πλέον χρησιμοποιούμενα σύστημα διαλυτών για την εκχύλιση κυτοκινινών από φυτικά υποστρώματα είναι το μίγμα Bielecki's (μεθανόλη/χλωροφόρμιο/νερό/μυρμιγκικό οξύ (12/5/2/1 v/v/v/v)¹³² και μια παραλλαγή του¹³³ που δεν επιτρέπει την ενζυμική τους αποδόμηση και δεν συνεκχυλίζει μεγάλες ποσότητες λιπιδίων¹³⁴. Η εκχύλιση σε χαμηλή θερμοκρασία με ακετόνη και εν συνεχεία με θερμό (38 °C) όξινο ύδωρ (pH 3.5)

και εκχύλιση μεταξύ 2 υγρών με βουτανόλη κορεσμένη με όξινο ύδωρ είναι ένα ακόμα σύστημα διαλυτών που χρησιμοποιείται ευρέως¹³⁵.

Ο καθαρισμός των εκχυλισμάτων που προκύπτουν βασίζεται σε ποικίλες τεχνικές, όπως η εκχύλιση μεταξύ 2 υγρών που αναφέρθηκε και προηγούμενος¹³⁶, η εκχύλιση στερεής φάσης^{72,136-146}, η υγρή εκχύλιση υπό πίεση¹⁴⁶, η μικροεκχύλιση στερεής φάσης και η εκχύλιση με χρήση γης διατόμων¹⁴⁸.

Η υγρή χρωματογραφία σε συνδυασμό με υψοφασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που έχουν παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες με τις φυτορμόνες ή για ουσίες οι οποίες χρησιμοποιούνται στην πράξη είτε για φυτοπροστατευτικούς σκοπούς είτε ως φυτορμόνες π.χ. 2,4D¹⁴⁹, chlormequat^{150,151}, meperquat^{150,151} και daminozide¹⁵². Τα τελευταία χρόνια η τεχνική αυτή επεκτείνεται και την ανάλυση φυτορμονών όπως αυξίνες^{141,153,154}, αμπισικό οξύ^{137,142}, γιββερελίνες¹⁴¹ και κυτοκινίνες¹³³.

Αν και οι ανωτέρω τεχνικές εκχύλισης και προσδιορισμού είναι αποτελεσματικές και παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση, η χρήση τους περιορίζεται στον προσδιορισμό ενός ή μίας ομάδας αναλυτών με παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Επίσης, κάποιες από αυτές περιλαμβάνουν πολλαπλά στάδια επεξεργασίας του δείγματος τα οποία είναι χρονοβόρα, αυξάνουν το κόστος της ανάλυσης και την αβεβαιότητα της μεθόδου.

Στόχος της παρούσας ενότητας της διατριβής είναι η δημιουργία μιας εύκολης, απλής και οικονομικής μεθόδου που επιτρέπει τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτορμονών διαφόρων φυσικοχημικών κατηγοριών. Η μέθοδος εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε βασίζεται στην προηγούμενος επικυρωθείσα παραλλαγή της μεθόδου QuEChERS για παιδικές τροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά¹⁴⁹. Η ανίχνευση της ταυτότητας των αναλυτών στο δείγμα πραγματοποιήθηκε με δυο διαφορετικές τεχνικές, την πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική LC-MS/MS και τη σχετικά νέα στον τομέα του προσδιορισμού υπολειμμάτων των φυτορμονών, την τεχνική της LC-TOF/MS. Η τεχνική αυτή καταγράφει τα ιόντα με ακρίβεια μάζας 4 δεκαδικών ψηφίων σε λειτουργία πλήρους φάσματος, ενώ ποσοτικοποίηση των φυτορμονών γίνεται με LC-MS/MS.

6.2. Υλικά και Αντιδραστήρια

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν:

1. Ακετονιτρίλιο, καθαρότητας Pestiscan (Lab Scan).
2. Άνυδρο θειικό μαγνήσιο (Fluka).
3. Χλωριούχο νάτριο (ACS reagent grade $\geq 99.0\%$).
4. Διένυδροδρο κιτρικό νάτριο (Sigma-Aldrich).
5. Τετραένυδρο όξινο κιτρικό νάτριο (Fluka).
6. Θειικό Νάτριο, (Fluka).
7. Μυρμηκικό Αμμώνιο (Fluka).
8. Διάλυμα Θειικού οξέος συγκέντρωσης 1N (Merck & Co. Inc.)
9. Διάλυμα Υδροξειδίου του Νατρίου συγκέντρωσης 1N (Merck & Co. Inc.)
10. Φιάλες φυγοκέντρου των 50mL από teflon και με βιδωτό πώμα.
11. Φιάλες φυγοκέντρου των 15mL από polypropylene και με βιδωτό πώμα.
12. Γυάλινα φιαλίδια των 8 mL με πώμα από teflon (PTFE).
13. Φίλτρα (syringe filters) PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μm .
14. Δεκατέσσερεις πρότυποι αναλύτες αναφοράς γνωστής καθαρότητας (Dr Ehrenstorfer Laboratories GmbH /Chem Service, Inc/ Sigma-Aldrich/ AccuStand Inc/ BASF) 1-naphthylacetic acid, 2.4-D, 2-naphthylloxyacetic acid, 4-Chlorophenoxyacetic acid, 6-benzyladenine, forchlorfenuron, gibberellic acid, mefluidide, prohexadione, IBA, 2iP, thidiazuron, chlormequat, mepiquat.

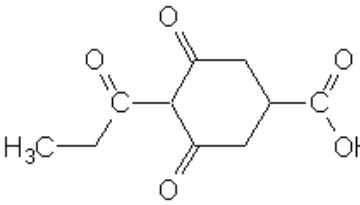
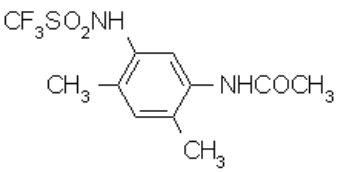
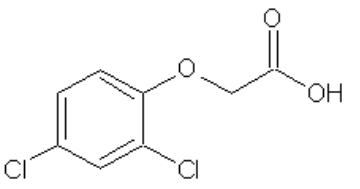
6.3. Εξοπλισμός

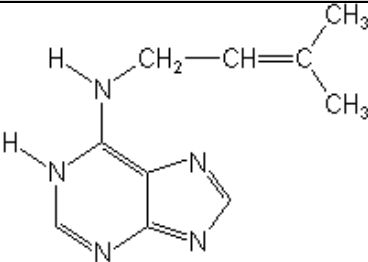
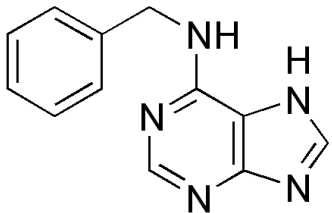
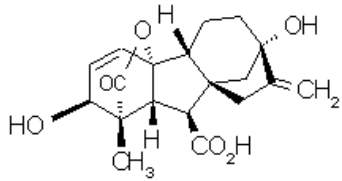
1. Φυγόκεντρος 4000 στροφών / min.
2. LC-MS/MS: Υγρός χρωματογράφος με σύστημα δυο αντλιών Varian Prostar 210, αυτόματο δειγματολήπτη Prostar 420, 100 θέσεων, συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας τριπλού τετράπολου Varian 1200L και με πηγή ηλεκτροδιάχυσης (ESI) με δυνατότητα λειτουργίας θετικού ή αρνητικού ιονισμού. Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Varian MS Workstation software version 6.8.
3. LC-TOF/MS: Υγρός χρωματογράφος με σύστημα αντλίας δυο καναλιών (Agilent 1200), σύστημα απαέρωσης κινητών φάσεων, αυτόματο δειγματολήπτη 100 θέσεων ελεγχόμενης θερμοκρασίας (G1330B) και θάλαμο στήλης ελεγχόμενης θερμοκρασίας συνδεδεμένο με

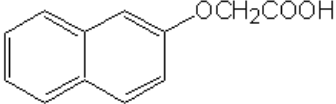
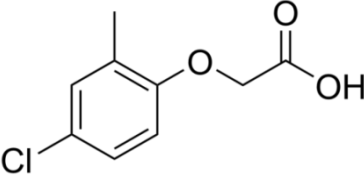
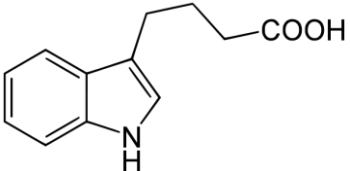
φασματομέτρο μάζας χρόνου πτήσης ιόντων (Agilent 6220). Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.02.00.

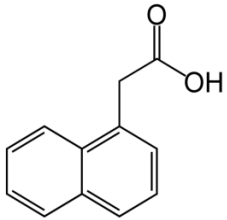
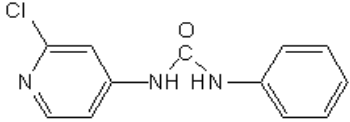
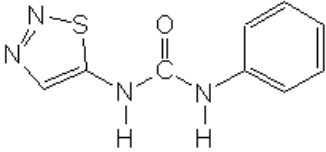
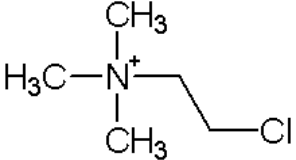
6.4. Επιλογή αναλυτών

Για την επικύρωση της μεθόδου επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικοί αναλύτες διαφόρων χημικών κατηγοριών, με στόχο την ανάδειξη του πολυδύναμου της μεθόδου (την ικανότητα τους δηλαδή να επεκτείνεται σε άλλους αναλύτες της κατηγορίας). Οι αναλύτες αυτοί έχουν εύρος φυσικοχημικών ιδιοτήτων (διαλυτότητα σε νερό, τάση ατμών, $\log P_{ow}$) που καλύπτει όλο το εύρος τιμών των φυσικοχημικών ιδιοτήτων όλων των ενώσεων της κατηγορίας που ανήκουν. Οι χημικές ομάδες στις οποίες ανήκουν οι υπό μελέτη αναλυτές παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.1**.

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Τρόπος Δράσης	Χημική δομή	Συντακτικός τύπος	Μοριακό Βάρος	pKow	Υδατο-διαλυτότητα	Τάση ατμών
prohexadione	Ακυλο-Κυκλοεξανεδιόνη (Acylcyclohexanedione)	Επιβράδυνση της ανάπτυξης		$C_{10}H_{12}O_5$	212.2	-0.55	Μικρή διαλυτότητα στο νερό	1.53E-09 mmHg at 25°C
mefluidide	Ανιλίνη (Anilide)	Επιβράδυνση της ανάπτυξης		$C_{11}H_{13}F_3N_2O$ 3S	310.3	2.02	180 (σε H ₂ O, 23 °C)	< 0.01 Pa (25°C)
2.4-D	Αρυλόξυ Αλκανοϊκά οξέα (Aryloxyalkanoic acid)	Αυξάνει την καρπόδεση, εμποδίζει την καρπόπτωση, αυξάνει την ριζοβολία και τον σχηματισμό ανθέων		$C_8H_6Cl_2O_3$	221	0.19	23180 (pH 7)	1.9E-05 Pa (25°C)

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Τρόπος Δράσης	Χημική δομή	Συντακτικός τύπος	Μοριακό Βάρος	pKow	Υδατο-διαλυτότητα	Τάση ατμών
2iP	Κυτοκινίνες (Cytokines)	Διεγείρει την κυτταρική διαίρεση		C ₁₀ H ₁₃ N ₅	203.2	0.81		2.87E-09 mmHg at 25°C
6-benzyladenine	Κυτοκινίνες (Cytokines)	Αλλάζει το σχήμα των φρούτων, το αδελφωμα των στελεχών των δημητριακών, καθυστερεί την γήρανση		C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225.2	2.19	62.2 (20 °C)	< 0.000148 Pa (20°C)
gibberellic acid	Γιββερελίνες (Gibberellins)	Καθυστερεί την γήρανση, Διεγείρει την βλάστηση των σπόρων και των κονδύλων και την άνθηση, βελτιώνει την		C ₁₉ H ₂₂ O ₆	346.4	0.008	5000 (25°C)	

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Τρόπος Δράσης	Χημική δομή	Συντακτικός τύπος	Μοριακό Βάρος	pKow	Υδατο-διαλυτότητα	Τάση ατμών
		καρπόδεση και αυξάνει το μέγεθος των άσπερμων καρπών						
2-naphthoxyacetic acid	Γλυκολύτες (Glycolates)	Βελτιώνει την καρπόδεση		C ₁₂ H ₁₀ O ₃	202.2	2.572	Δυσδιάλυτο	
4-chlorophenoxyacetic acid	Γλυκολύτες (Glycolates)	Βελτιώνει την καρπόδεση		C ₈ H ₇ ClO ₃	186.6	2.572	Δυσδιάλυτο	
indole-3-butyric acid (IBA)	Ινδόλες (Indoles)	Βελτιώνει την καρπόδεση και την βλάστηση των μοσχευμάτων		C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	203.2	2.34	Μικρή διαλυτότητα στο νερό	4.9E-08 mmHg at 25°C

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Τρόπος Δράσης	Χημική δομή	Συντακτικός τύπος	Μοριακό Βάρος	pKow	Υδατο-διαλυτότητα	Τάση ατμών
1-naphthylacetic acid	Ναφθαλίνο-οξικά οξές (Naphthalene acetic Acids)	Προκαλεί λέπτυνση στα φρούτα, διεγείρει το σχηματισμό ανθέων και ριζών. Προκαλεί καρπόπτωση		C ₁₂ H ₁₀ O ₂	186.2	2.736	420 (20°C)	< 1E-05 Pa (25°C)
forchlorfenuron	Φαινιλουρίες (Phenylurea)	Διεγείρει την κυτταρική διαίρεση		C ₁₂ H ₁₀ ClN ₃ O	247.7	3.3	39 (21°C, δεν εξαρτάται από το pH)	4.6E-08 Pa (25°C)
thidiazuron	Φαινιλουρίες (Phenylurea)	Διεγείρει την κυτταρική διαίρεση		C ₉ H ₈ N ₄ OS	220.2	1.43	<0.01mPa (25°C)	31mg/L
chlormequat	Τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα (Quarternary ammonium)	Επιβραδύνει την ανάπτυξη, περιορίζει το αδελφωμα των στελεχών του		C ₅ H ₁₃ ClN	122.6	-3.47	>886000	< 1E-06 Pa (25°C)

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Τρόπος Δράσης	Χημική δομή	Συντακτικός τύπος	Μοριακό Βάρος	pKow	Υδατο-διαλυτότητα	Τάση ατμών
		δημητριακών, διεγείρει το σχηματισμό μπουμπουκιών, αυξάνει την καρπόδεση και την συγκέντρωση χρωστικών. Επιβραδύνει την γήρανση						
meriquat	Τεταρτοταγή αμμωνιακά άλατα (Quarternary ammonium)	Επιβραδύνει την ανάπτυξη		C ₇ H ₁₆ N	114.2	-3.55	500000	< 1E-07 Pa (20°C)

Πίνακας 6.1. Χημικές ομάδες, τρόπος δράσης, συντακτικός τύπος, μοριακός τύπος, μοριακό βάρος, συντελεστής οκτανόλης:νερό, διαλυτότητα και τάση ατμών των 14 φυτορμονών

6.5. Επιλογή υποστρωμάτων

Οι θερμοκηπιακές καλλιέργειες αποτελούν μία από τις πλέον προσοδοφόρες μορφές γεωργίας στην Ελλάδα παράγοντας προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό (π.χ. κολοκυνθοειδή, σολανώδη) και χρωστικές (π.χ. φυλλώδη λαχανικά, φράουλες). Τα υποστρώματα που επιλέγηκαν για την επικύρωση της μεθόδου είναι η τομάτα και η φράουλα, δύο καλλιέργειες αρκετά διαδεδομένες στην Ελλάδα και αντιπροσωπευτικές μιας μεγάλης κατηγορίας υποστρωμάτων με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και/ή χρωστικές (καρποφόρα λαχανικά και μικρούς καρπούς).

6.6. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων παρακαταθήκης

Τα πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης της τάξης των 500-1000 ng/mL παρασκευάστηκαν σε ακετονιτρίλιο και για τους αναλύτες chloromequat και meriquat σε μεθανόλη. Τοποθετήθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια με πώμα από Teflon και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Η ζύγιση της καθαρής δραστικής ουσίας για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών, ενώ ελήφθη υπόψη και ο βαθμός καθαρότητας τους. Ένα διάλυμα εργασίας στο οποίο εμπεριέχονται όλες οι παραπάνω ουσίες παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 1 μg/mL σε μεθανόλη.

6.7. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας

Για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας σε υπόστρωμα τομάτας ή φράουλας στα οποία είχε πιστοποιηθεί η απουσία υπολειμμάτων φυτορμονών. Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν με προσθήκη ποσότητας x mL προτύπου δ/τος σε 1-x mL από το εκχύλισμα του μάρτυρα. Ο χρησιμοποιούμενος όγκος x mL πρέπει να είναι αμελητέος σε σχέση με τον όγκο του τελικού δ/τος (1 mL) για να μην αραιωθεί η συγκέντρωση του υποστρώματος σε βαθμό που να μεταβάλλεται η επίδραση του. Στον επόμενο πίνακα δίνεται παράδειγμα τρόπου παρασκευής διαλυμάτων εργασίας με όγκο τελικού διαλύματος 1 mL.

Συγκέντρωση αρχικού δ/τος ($\mu\text{g/mL}$)	Χρησιμοποιούμενος όγκος (μL)	Συγκέντρωση τελικού δ/τος ($\mu\text{g/mL}$)
0,1	30	0,003
0,1	50	0,005
0,1	100	0,01
0,1	250	0,025
1	50	0,05
1	80	0,08
1	100	0,1
1	150	0,15
1	200	0,2
1	300	0,3

Τέλος, πριν από την χρωματογραφική ανάλυση κάθε πρότυπο διηθήθηκε από φίλτρο τύπου syringe filter 0,45 μm σε φιαλίδιο των 2mL και πωματίστηκε με πώμα PTFE.

6.8. Μέθοδος Εκχύλισης

Σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL προστέθηκαν $10 \pm 0,1$ (m_s) g προϊόντος, 300 μL δ/τος NaOH 5N και το μίγμα ανακινήθηκε με το χέρι για 1 min. Έτσι, το pH ρυθμίστηκε περίπου στο 12 και το μίγμα αφέθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min με περιστασιακή ανακίνηση. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 μL δ/τος H₂SO₄ 5N, ανακινήθηκαν με το χέρι για 1 min,⁷⁸ προστέθηκαν 10 mL (V_I) ακετονιτρίλιου ανακινήθηκαν με το χέρι για 1 min, και προστέθηκε μίγμα αλάτων από τα παρακάτω συστατικά:

- ✓ 4 g \pm 0.2 g άνυδρο θειικό μαγνήσιο,
- ✓ 1 g \pm 0.05 g χλωριούχο νάτριο,
- ✓ 1 g \pm 0.05 g διένυδροδρο κιτρικό νάτριο
- ✓ 0.5 g \pm 0.03 g τετραένυδρο όξινο κιτρικό νάτριο

Μετά από ανακίνηση με το χέρι για 1 min η φιάλη φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές/ min για 5 min. Τμήμα 1 mL από το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 8 mL, εξατμίστηκε μέχρι ξηρού με ρεύμα αζώτου, διαλύθηκε σε 1 mL μεθανόλη, διηθήθηκε από φίλτρο τύπου syringe filter 0,45 μm σε φιαλίδιο των 2mL και τοποθετήθηκε στην κατάψυξη. Η αλλαγή του τελικού διαλύτη από ακετονιτρίλιο σε μεθανόλη είχε ως αποτέλεσμα καλύτερο σχήμα χρωματογραφικών κορυφών, κυρίως για τους αναλύτες που εκλύονται νωρίς.

6.9. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS)

Στο σύστημα LC-MS/MS που χρησιμοποιήθηκε, ο διαχωρισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε σε στήλη Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2.1mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm. Η θερμοκρασία στήλης ήταν αυτή του περιβάλλοντος ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$). Ως διαλύτης έκλουσης A χρησιμοποιήθηκε μίγμα μεθανόλης–νερού (10:90) που περιείχε 1mM HCOONH₄ και ως διαλύτης έκλουσης B μίγμα μεθανόλης–νερού (90:10) που περιείχε 1mM HCOONH₄. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν σταθερή 0,25 mL/min.

Ως πρόγραμμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω:

Χρόνος (min)	%A	%B
0,00	90,0	10,0
14,00	0,0	100,0
20,00	0,0	100,0
20,12	90,0	10,0
30,00	90,0	10,0

Εγχύθηκαν 10 μL του τελικού εκχυλίσματος του δείγματος στο LC. Για την αποφυγή μολύνσεων, πριν από κάθε έγχυση ο αυτόματος δειγματολήπτης εκπλύθηκε με διάλυμα μεθανόλη:νερού (50:50). Το σύστημα φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου (Varian model 1200L) λειτουργούσε σε θετικό και αρνητικό ιονισμό και η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική λειτουργίας παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων (MRM). Οι βασικές παράμετροι συστήματος ρυθμίστηκαν ως εξής:

- ✓ Θερμοκρασία πηγής ιονισμού: 50 °C
- ✓ Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης: 250 °C
- ✓ Αέριο ξήρανσης και εκνέφωσης: Άζωτο υψηλής καθαρότητας.
- ✓ Πίεση αερίου ξήρανσης: 18psi
- ✓ Πίεση αερίου εκνέφωσης: 55psi
- ✓ Αέριο κελιού θραυσματοποίησης: Αργό καθαρότητας 99.999 %, 0,2Pa.
- ✓ Χρόνος συλλογής μεταπτώσεων: 100-250msec ανάλογα με τον αναλύτη.

✓ Τάση τριχοειδούς: Αναγράφονται στον **Πίνακα I του Παραρτήματος** και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.

✓ Ενέργεια θραυσματοποίησης: Αναγράφονται στον **Πίνακα I του Παραρτήματος** και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.

✓ Τάση ανιχνευτή: 1500Volt.

6.10. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία χρόνου πτήσης ιόντων

Στο σύστημα LC-TOF/MS που χρησιμοποιήθηκε ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2.1mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm. Η θερμοκρασία στήλης ήταν αυτή του περιβάλλοντος ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$). Ως διαλύτης έκλουσης A χρησιμοποιήθηκε 5mM HCOONH₄, 0,1% HCOOH και 0,02% ακετονιτρίλιο σε νερό και ο διαλύτης έκλουσης B 5mM HCOONH₄ και 0,1% HCOOH σε μεθανόλη. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν σταθερή 0,25 mL/min.

Ως πρόγραμμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω:

Χρόνος (min)	%A	%B
0,00	70,0	30,0
5,00	0,0	100,0
10,00	0,0	100,0
10,12	70,0	30,0
15,00	70,0	30,0

Εγχύθηκαν 10 μL του τελικού εκχυλίσματος του δείγματος στο LC. Για αποφυγή μολύνσεων, μετά από κάθε έγχυση ο αυτόματος δειγματολήπτης εκπλύθηκε αυτόματα με διαλύτη όμοιας σύστασης με την κινητή φάση B για 10 sec. Το σύστημα φασματομετρίας μάζας χρόνου πτήσης ιόντων λειτουργούσε σε θετικό ή αρνητικό ιονισμό και η συλλογή των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την τεχνική της πλήρους σάρωσης.

Οι βασικές παράμετροι συστήματος ρυθμίστηκαν ως εξής:

✓ Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης: 300 °C

✓ Αέριο ξήρανσης και εκνέφωσης: Άζωτο υψηλής καθαρότητας.

✓ Πίεση αερίου ξήρανσης: 10L/min

✓ Πίεση αερίου εκνέφωσης: 45psi

- ✓ Τάση τριχοειδούς (capillary voltage): 4000V
- ✓ Τάση θραυσματοποίησης πηγής (fragmentor voltage-in-source CID): 190V
- ✓ Τάση ανιχνευτή: 1500Volt.
- ✓ RF οκταπόλου: 250V
- ✓ Λειτουργία καταγραφής ιόντων: Πλήρες φάσμα.
- ✓ Εύρος καταγραφής φασμάτων: 100-1000amu

6.11. Ταυτοποίηση

Η παρουσία αναλύτη στο δείγμα ταυτοποιήθηκε αφενός με την εμφάνιση χρωματογραφικών κορυφών σε χρόνο πλησίον του χρόνου κατακράτησης της πρότυπης ουσίας ($\pm 3\%$) και αφετέρου από το λόγο των δυο μεταπτώσεων ιόντων (LC-MS/MS) ή ιόντων (LC-TOF/MS) ο οποίος πρέπει να πληροί τις απαιτήσεις του παρακάτω πίνακα⁵⁵.

Σχετική ένταση ιόντος (% της βασικής κορυφής)	LC-MS/MS και LC-TOF (επιτρεπόμενη απόκλιση %)
> 50 %	± 20 %
> 20 % ως 50 %	± 25 %
> 10 % ως 20 %	± 30 %
$\leq 10\%$	± 50 %

Όταν η ταυτοποίηση των αναλυτών πραγματοποιείται με σύστημα LC-TOF/MS, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η παράμετρος της ακρίβειας μάζας, αφού η αξιόπιστη ταυτοποίηση προϋποθέτει το σφάλμα που προκύπτει μεταξύ θεωρητικής και πειραματικής τιμής είναι μικρότερο των 5ppm⁵⁵.

6.12. Προσδιορισμός

Η περιεκτικότητα του αναλύτη στο δείγμα -σε mg/kg- υπολογίζεται, από την εξίσωση:

$$C = f \times C_I$$

όπου:

- ✓ C_I είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο τελικό προς έγχυση διάλυμα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με πρότυπα διαλύματα αναφοράς και

✓ ο συντελεστής $f = V_I / m_s$ (V_I ο όγκος του διαλύτη και m_s η μάζα του δείγματος) που στην παρούσα μέθοδο είναι ίσος με την μονάδα.

Η συγκέντρωση του αναλύτη στο τελικό προς έγχυση διάλυμα υπολογίζεται με τις παρακάτω δύο τεχνικές:

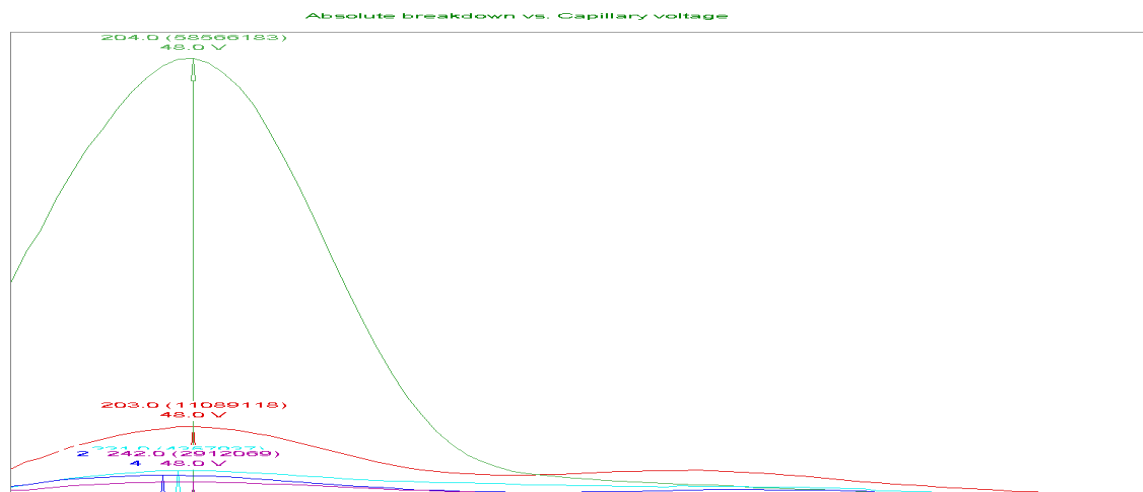
✓ **Απευθείας σύγκριση** της επιφάνειας της χρωματογραφικής κορυφής του δείγματος με την επιφάνεια της χρωματογραφικής κορυφής ενός μόνο προτύπου διαλύματος, όταν οι επιφάνειες κορυφής δείγματος και προτύπου δεν διαφέρουν μεταξύ τους περισσότερο από 50%.

✓ **Εγκλωβισμού** όταν η σύγκριση γίνεται με τη χρήση δύο προτύπων διαλυμάτων. Η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα πρέπει να βρίσκεται ανάμεσα στις συγκεντρώσεις του στα πρότυπα διαλύματα, ενώ η σειρά έγχυσης είναι τέτοια ώστε τα δύο πρότυπα διαλύματα να βρίσκονται αμέσως πριν και μετά το δείγμα.

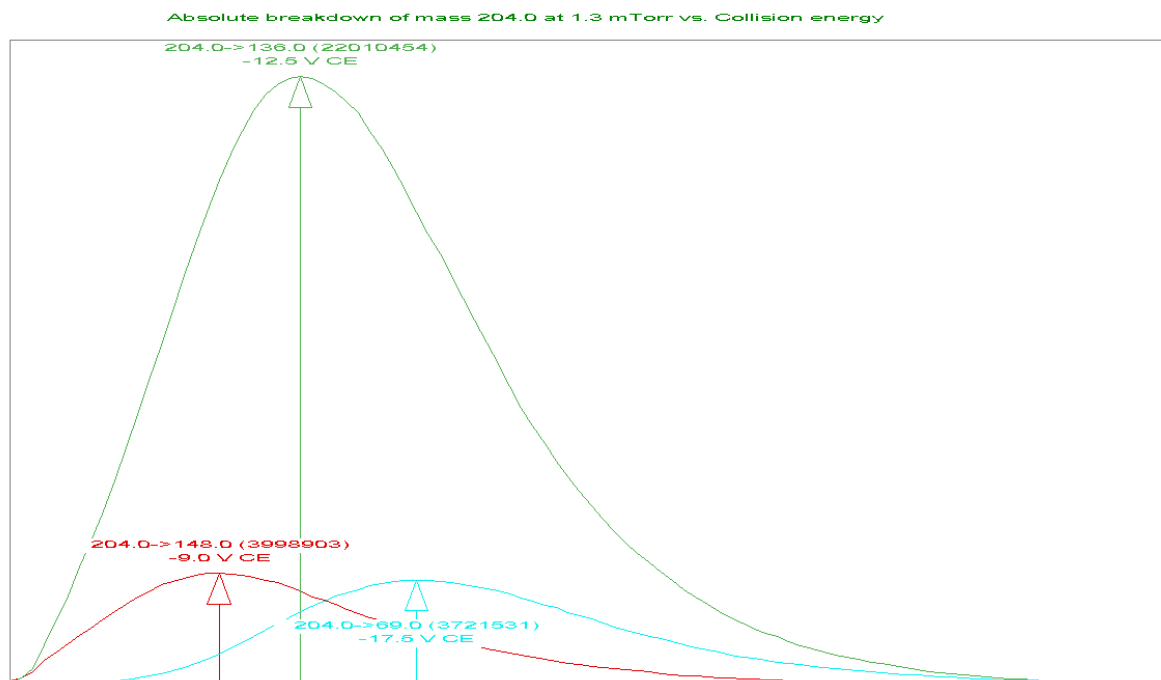
6.13. Αποτελέσματα και συζήτηση

6.13.1. Βελτιστοποίηση παραμέτρων του Φασματομέτρου Μαζών

Στην ενότητα αυτή μελετήθηκε ο σχηματισμός και η θραυσματοποίηση των αναλυτών σε θετικό και σε αρνητικό ιονισμό. Για το σκοπό αυτό, διαλύματα από κάθε μεμονωμένο αναλύτη συγκέντρωσης 100 μg/L παρασκευάστηκαν και εγχύθηκαν απευθείας στο σύστημα για να βελτιστοποιηθούν οι τιμές της τάσης του τριχοειδούς και της ενέργειας θραυσματοποίησης για κάθε μετάπτωση ξεχωριστά. Στο **Σχήμα 6.1 (a, b)** απεικονίζονται οι καμπύλες βελτιστοποίησης της τάσης τριχοειδούς για τον αναλύτη 2iP και της ενέργειας θραυσματοποίησης των θυγατρικών του ιόντων. Το μέγιστο της κορυφής δείχνει τη βέλτιστη τιμή (τάση τριχοειδούς ή ενέργεια θραυσματοποίησης) στην οποία επιτεύχθηκε η καλύτερη ευαισθησία και εκφράζεται ως η ένταση ιόντων που οδηγούνται στον ανιχνευτή. Αναλυτικότερα, οι μεταπτώσεις (πρόδρομα και θυγατρικά ιόντα), η τάση του τριχοειδούς η ενέργεια θραυσματοποίησης, καθώς και οι υπόλοιπες βασικές χρωματογραφικές παράμετροι παρουσιάζονται στον **Πίνακα III του Παραρτήματος**.



Σχήμα 6.1(a). Καμπύλη βελτιστοποίησης της τάσης τριχοειδούς για το ψευδομοριακό ιόν $([M+H]^+)$ 204 του αναλύτη 2iP.



Σχήμα 6.1(b). Καμπύλη βελτιστοποίησης της ενέργειας θραυσματοποίησης για τα θυγατρικά ιόντα 136 και 148 του αναλύτη 2iP.

6.13.2. Ορθότητα – Πιστότητα

Η εργαστηριακή εκτίμηση της ορθότητας και πιστότητας της μεθόδου προσδιορίστηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο σε εμβολιασμένα δείγματα μάρτυρα (τομάτα και φράουλα) και πέντε επαναλήψεις. Στο πλαίσιο αυτό, ποσότητα $10 \pm 0,1$ gr του μάρτυρα εμβολιάστηκαν σε δυο επίπεδα με γνωστές συγκεντρώσεις των αναλυτών και προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος εργασίας. Το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού ήταν τα 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και το υψηλότερο το δεκαπλάσιό του. Για την εκτίμηση της ορθότητας ελέγχτηκε η ανάκτηση και της πιστότητας η σχετική τυπική απόκλιση (SDr).

Όπως παρατηρείται στον Πίνακα 6.2, το μεγαλύτερο ποσοστό των αναλυτών (δώδεκα από τους δεκατέσσερεις) παρουσιάζουν μέσες ανακτήσεις -στο χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης- που κυμαίνονται από 61.9–128.5 % με SDr 3–19.7 % και 72.6–118.7 % με SDr 3.4–15.3 % στο υψηλότερο. Οι αναλύτες chlormequat και meriquat παρουσίασαν συστηματικά χαμηλές ανακτήσεις (30,2-40,5% και 30,9-58,3% αντίστοιχα). Οι αναλύτες αυτοί χαρακτηρίζονται από υψηλή πολικότητα ($\log K_{ow} = -3.47$ and -3.55 αντίστοιχα), με αποτέλεσμα το ακετονιτρίλιο να μην είναι ο καταλληλότερος διαλύτης εκχύλισής τους από υποστρώματα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Για τους αναλύτες αυτούς η μέθοδος είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό τους μετά από διόρθωση των αποτελεσμάτων ως προς την ανάκτηση, καθώς οι τιμές των σχετικών αποκλίσεων είναι αποδεκτές (9.4-17.5% και 5.8-15.6% αντίστοιχα).

Υπόστρωμα	Αναλυτής	Επίπεδο φόρτισης (mg/kg)	R (%)	SDr (%)
φράουλα	1-naphthylacetic acid	0.02	97.9	14.9
φράουλα	1-naphthylacetic acid	0.1	87.9	8.9
τομάτα	1-naphthylacetic acid	0.02	109.5	19.5
τομάτα	1-naphthylacetic acid	0.1	118.7	10.1
φράουλα	2.4-D	0.02	106.2	7.7
φράουλα	2.4-D	0.1	105.9	8.4
τομάτα	2.4-D	0.02	112.2	8.8
τομάτα	2.4-D	0.1	89.7	4.4
φράουλα	2iP	0.02	93.5	6.8

Υπόστρωμα	Αναλυτής	Επίπεδο φόρτισης (mg/kg)	R (%)	SDr (%)
φράουλα	2iP	0.1	84.8	3.4
τομάτα	2iP	0.02	100.1	9.9
τομάτα	2iP	0.1	96.0	6.2
φράουλα	2-naphthoxyacetic acid	0.02	109.2	9.3
φράουλα	2-naphthoxyacetic acid	0.1	80.8	6.7
τομάτα	2-naphthoxyacetic acid	0.02	101.6	3.1
τομάτα	2-naphthoxyacetic acid	0.1	94.1	4.1
φράουλα	4-Chlorophenoxyacetic acid	0.02	87.2	5.2
φράουλα	4-Chlorophenoxyacetic acid	0.1	82.1	7.4
τομάτα	4-Chlorophenoxyacetic acid	0.02	95.5	12.1
τομάτα	4-Chlorophenoxyacetic acid	0.1	96.2	11.1
φράουλα	6-benzyladenine	0.02	72.7	8.7
φράουλα	6-benzyladenine	0.1	78.5	10.9
τομάτα	6-benzyladenine	0.02	122.4	8.1
τομάτα	6-benzyladenine	0.1	110.2	6.3
φράουλα	chlormequat	0.02	40.4	17.5
φράουλα	chlormequat	0.1	32.5	9.4
τομάτα	chlormequat	0.02	86.4	9.4
τομάτα	chlormequat	0.1	72.6	10.6
φράουλα	forchlorfenuron	0.02	100.8	10.1
φράουλα	forchlorfenuron	0.1	95.1	8.5
τομάτα	forchlorfenuron	0.02	109.7	5.2
τομάτα	forchlorfenuron	0.1	108.7	5.4
φράουλα	gibberellic acid	0.02	78.4	7.8
φράουλα	gibberellic acid	0.1	77.7	14.9
τομάτα	gibberellic acid	0.02	128.5	7.8
τομάτα	gibberellic acid	0.1	117.9	5.5
φράουλα	IBA	0.1	53.2	12.2

Υπόστρωμα	Αναλυτής	Επίπεδο φόρτισης (mg/kg)	R (%)	SDr (%)
φράουλα	IBA	0.02	-	-
τομάτα	IBA	0.02	128.2	6.6
τομάτα	IBA	0.1	89.3	9.6
φράουλα	mefluidide	0.02	74.1	5.2
φράουλα	mefluidide	0.1	83.5	5.5
τομάτα	mefluidide	0.02	61.9	19.7
τομάτα	mefluidide	0.1	88.3	6.2
φράουλα	meriquat	0.02	46.7	13.7
φράουλα	meriquat	0.1	30.9	9.0
τομάτα	meriquat	0.02	58.3	15.6
τομάτα	meriquat	0.1	48.8	5.8
φράουλα	prohexadione	0.02	71.5	3.0
φράουλα	prohexadione	0.1	74.4	15.3
τομάτα	prohexadione	0.02	119.1	15.1
τομάτα	prohexadione	0.1	92.7	7.2
φράουλα	Thidiazuron	0.02	101.0	5.9
φράουλα	Thidiazuron	0.1	95.6	7.6
τομάτα	Thidiazuron	0.02	93.7	11.8
τομάτα	Thidiazuron	0.1	72.6	4.9

Πίνακας 6.2. Μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις R (%) για N=5 και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (SDr) των 14 αναλυτών για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού και για τα 2 υποστρώματα

Όσον αφορά τις μέσες ανακτήσεις για το υπόστρωμα της τομάτας, στο χαμηλότερο επίπεδο φόρτισης κυμαίνονται από 71.5–109.2 % με SDr 3–17.5 % και στο υψηλότερο από 53.2–105.9 % με SDr 3.4–15.3%. Για τις φράουλες, οι οποίες παρουσιάζουν ως υπόστρωμα υψηλότερη συγκέντρωση χρωστικών σε σχέση με την τομάτα, στο χαμηλότερο επίπεδο οι μέσες ανακτήσεις κυμαίνονται από 71.5–109.2 % με SDr 3–17.5 % και στο υψηλότερο από 53.2–105.9 % με SDr 3.4–15.3 %. Στην περίπτωση του IBA οι ανακτήσεις στο υψηλότερο επίπεδο ήταν 63,2% με SDr 6,6%, ενώ η ποσοτικοποίησή του δεν ήταν δυνατή στο χαμηλότερο επίπεδο λόγω χαμηλής ευαισθησίας (S/N<10).

6.13.3. Γραμμικότητα

Για την κατασκευή του διαγράμματος γραμμικότητας πραγματοποιήθηκε σειρά εγχύσεων προτύπων σε υπόστρωμα για έξι συγκεντρώσεις (10-20-50-100-200-300 µg/L). Τα πρότυπα παρασκευάστηκαν σε δύο διαφορετικά υποστρώματα (φράουλα ή τομάτα) και δ/τη για να είναι δυνατή η αξιολόγηση της επίδρασης του υποστρώματος στη μελέτη της γραμμικότητας. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνό του (r^2), η τεταγμένη επί της αρχής (a) η τυπική απόκλιση αυτής (S_a), η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης (b) η τυπική απόκλιση αυτής (S_b) και η αβεβαιότητα (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις που εκτιμήθηκαν, παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.3**.

Υπόστρωμα	Ουσία	r	r^2	b	S_b	a	S_a	S_u
διαλύτης	1-naphthylacetic acid	0.999	0.999	344286083	13953179	3216134	2154098	0.027
φράουλα	1-naphthylacetic acid	1.000	1.000	328125881	5497034	1250469	848635	0.011
τομάτα	1-naphthylacetic acid	1.000	1.000	708871816	15490460	-3475855	2618758	0.017
διαλύτης	2.4-D	0.998	0.995	1069037156	77097821	17366410	11902399	0.048
φράουλα	2.4-D	1.000	1.000	886676499	7868442	806710	1214734	0.006
τομάτα	2.4-D	1.000	1.000	1606834002	15469436	2913804	2388179	0.006
διαλύτης	2iP	0.999	0.998	8684218241	531419875	126373387	82040857	0.041
φράουλα	2iP	1.000	1.000	4780308392	62012470	12813075	9573515	0.009
τομάτα	2iP	1.000	1.000	7694289446	113191750	-23165742	17474597	0.010
διαλύτης	2-naphthoxyacetic acid	0.997	0.995	1867155181	159007354	37018612	24547632	0.056
φράουλα	2-naphthoxyacetic acid	1.000	1.000	1635340972	24232423	-5212005	3741013	0.010
τομάτα	2-naphthoxyacetic acid	1.000	1.000	2679799537	28893693	-3973929	4460622	0.007
διαλύτης	4-Chlorophenoxyacetic acid	0.999	0.998	1202377756	65591822	15557157	10126097	0.036
φράουλα	4-Chlorophenoxyacetic acid	1.000	1.000	1088249116	14463042	-2927799	2232811	0.009
τομάτα	4-Chlorophenoxyacetic acid	1.000	1.000	1828007027	39142564	-9259685	6042848	0.014
διαλύτης	6-benzyladenine	0.998	0.996	757979229	42522969	9162507	6564716	0.037

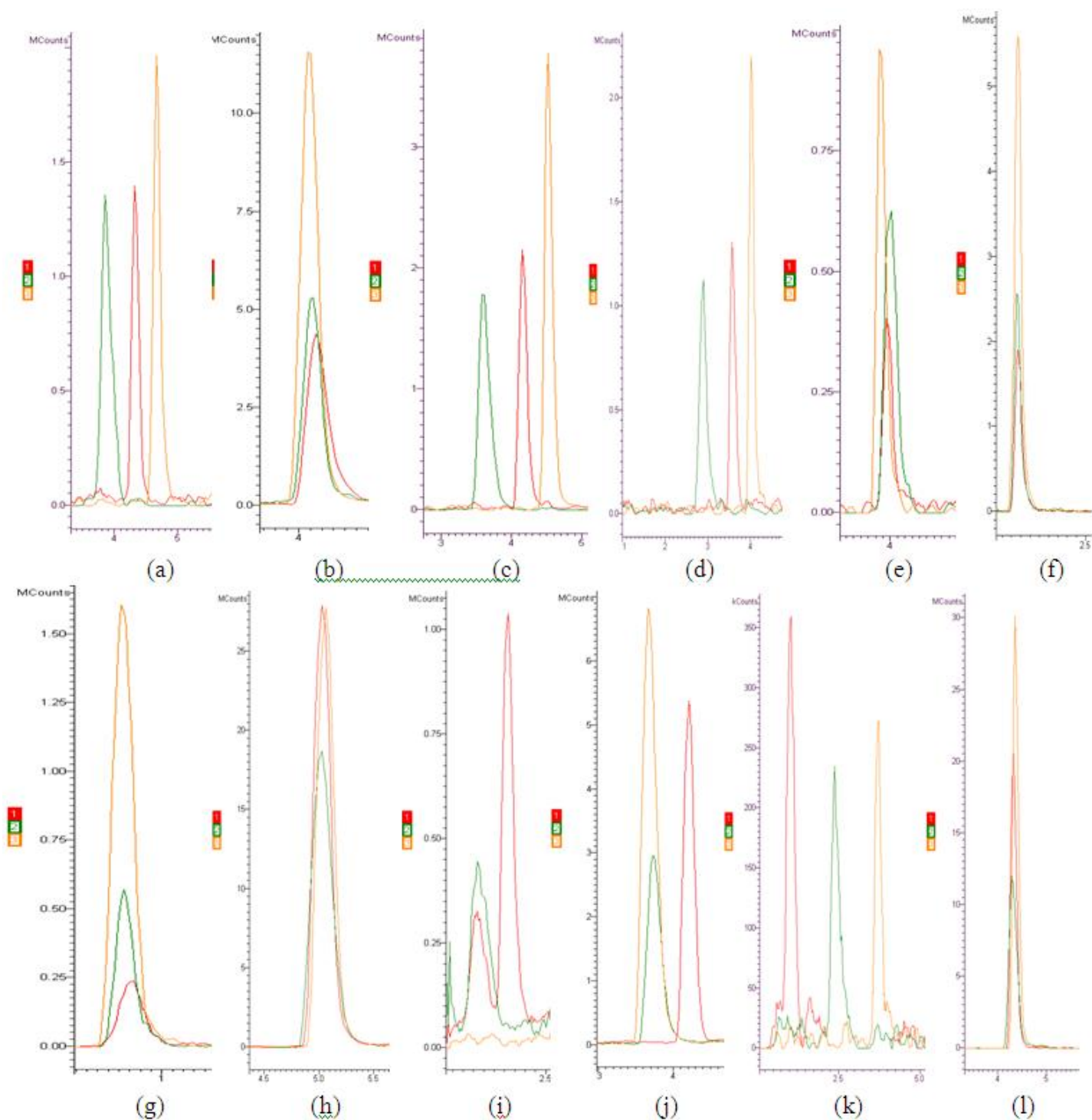
φράουλα	6-benzyladenine	1.000	0.999	332447998	4706493	-560237	726591	0.009
τομάτα	6-benzyladenine	1.000	1.000	984397076	9401428	-1701564	1451397	0.006
διαλύτης	chlormequat	0.994	0.988	944617617	141252513	33322448	21806631	0.099
φράουλα	chlormequat	0.999	0.998	458178979	20145578	4582576	3110084	0.029
τομάτα	chlormequat	1.000	1.000	481984944	2545488	181406	392974	0.003
διαλύτης	forchlorfenuron	0.998	0.995	16681596768	1477470924	353303854	228092674	0.059
φράουλα	forchlorfenuron	0.999	0.998	19786149327	922195653	218849162	142369010	0.031
τομάτα	forchlorfenuron	1.000	1.000	25981986998	358897368	73533698	55406749	0.009
διαλύτης	gibberellic acid	0.997	0.995	380114234	25302388	5393563	3906195	0.044
φράουλα	gibberellic acid	0.999	0.999	311388308	5781971	-575388	892624	0.012
τομάτα	gibberellic acid	1.000	0.999	420463410	11925428	2795484	1841053	0.019
διαλύτης	IBA	0.999	0.997	136585379	8248747	1932690	1273446	0.040
φράουλα	IBA	1.000	0.999	120909015	7084791	1708912	1197728	0.045
τομάτα	IBA	1.000	0.999	197589072	7816803	1889588	1206762	0.026
διαλύτης	mefluidide	0.989	0.978	714206671	389886593	94768039	65912747	0.420
φράουλα	mefluidide	0.999	0.998	3476749456	198671649	48151554	30671025	0.038
τομάτα	mefluidide	0.999	0.999	4583971449	102269986	18319695	15788490	0.015
διαλύτης	meriquat	0.996	0.993	4769165253	429455500	95726969	66299547	0.060
φράουλα	meriquat	1.000	0.999	2304913708	40380444	7001893	6233952	0.012
τομάτα	meriquat	1.000	1.000	3040035893	45751313	9289362	7063110	0.010
διαλύτης	prohexadione	0.998	0.995	276320568	13064648	2217012	2016927	0.031
φράουλα	prohexadione	1.000	0.999	230776754	5066129	-1082773	782111	0.015
τομάτα	prohexadione	1.000	1.000	327106192	4301359	898803	664046	0.009
διαλύτης	Thidiazuron	0.996	0.992	10666366252	1356147788	324036073	209362750	0.084
φράουλα	Thidiazuron	0.998	0.996	10486703374	859606667	203207079	132706492	0.054
τομάτα	Thidiazuron	1.000	1.000	14631858715	209242331	36072916	32302932	0.009

Πίνακας 6.3. Βασικές παράμετροι γραμμών παλινδρόμησης για τους 14 αναλύτες σε υπόστρωμα φράουλα, τομάτα και δ/τη. (συντελεστής συσχέτισης (r), και το τετράγωνο αυτού (r^2), τεταγμένη επί της αρχής (a) η τυπική απόκλιση της (S_a), κλίση της γραμμής (b), η τυπική απόκλιση της (S_b) και η αβεβαιότητα (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι όλοι οι αναλύτες παρουσιάζουν πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης μεγαλύτερους από 0,989.

6.13.4. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα, δηλαδή με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα. Για το σκοπό αυτό ελέγχεται ο λόγος σήμα / θόρυβο (S/N), για τον οποίο πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10^{55}$. Με βάση τα παραπάνω το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου βρέθηκε ότι είναι το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού δηλαδή τα 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για όλους τους αναλύτες εκτός από το IBA στην φράουλα που ήταν τα 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Στο **Σχήμα 6.2** απεικονίζονται τα χρωματογραφήματα των αναλυτών συγκέντρωσης 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και για τα δύο υποστρώματα.



Σχήμα 6.2. LC-ESI-MSMS χρωματογραφήματα στα 0.02μg/mL σε υπόστρωμα τομάτα (πράσινο), φράουλα (κόκκινο), σε διαλύτη (πορτοκαλί) των αναλυτών: (a) 2,4D, (b) 2iP, (c) 2-naphthoxyacetic acid, (d) 4-Chlorophenoxyacetic acid, (e) 6-benzyladenine, (f) meperquat, (g) chlormequat, (h) forchlorfenuron, (i) IBA, (j) mefluidide, (k) prohexadione, (l) thidiazuron.

6.13.4. Επίδραση του υποστρώματος

Η επίδραση του υποστρώματος αφορά την συνολική επίδραση όλων των συνεκλουσμάτων που προέρχονται από το υπόστρωμα και υπάρχουν στο τελικό εκχύλισμα, στην μέτρηση του αναλύτη-στόχου¹⁵⁵. Η επίδραση του υποστρώματος στα συστήματα χρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών είναι δυνατόν να εκφραστεί με διάφορους τρόπους, οι οποίοι επηρεάζουν τη μέτρηση είτε στο στάδιο της χρωματογραφίας είτε στο στάδιο του ιονισμού. Η τεχνική LC-MS/MS από μόνη της αποτελεί μια αρκετά εξειδικευμένη τεχνική, η οποία δύναται να «απομονώσει» τα ιόντα των αναλυτών-στόχων από πολύπλοκα εκχυλίσματα με εξαιρετική ακρίβεια. Λόγο του πλεονεκτήματος αυτού η τεχνική εκχύλισης της παρούσας μελέτης στερείται σταδίου καθαρισμού. Η μη ύπαρξη σταδίου καθαρισμού και λαμβάνοντας υπόψη ότι μελετήθηκαν διαφορετικά υποστρώματα, το τελικό εκχύλισμα βρέθηκε να εμπεριέχει σημαντική ποσότητα διαφορετικών -ανάλογα με το υπόστρωμα- συνεκχυλισμάτων τα οποία επηρεάζουν το κάθε ένα με τον δικό του τρόπο τη μέτρηση. Όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 6.2**, αν και το σχήμα των κορυφών δεν επηρεάζεται σε σημαντικό βαθμό, επηρεάζεται σημαντικά ο χρόνος κατακράτησης και η απόκριση του ανιχνευτή των αναλυτών.

Η επίδραση στο χρόνο κατακράτησης οφείλεται στο γεγονός ότι τα συνεκχυλίσματα του υποστρώματος κατακρατούνται από τη στατική φάση της στήλης, επηρεάζοντας αντίστοιχα την κατακράτηση των αναλυτών-στόχων και συνεπώς το χρόνο έκλουσής τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις η επίδραση αυτή έχει ως επακόλουθο την έκλυση των αναλυτών-στόχων σε χρόνο μεγαλύτερο σε σχέση με αυτόν που θα είχε σε ένα διάλυμα χωρίς υπόστρωμα (διαλύτη μεθανόλη). Ο χρόνος κατακράτησης αποτελεί ένα σημαντικό κριτήριο ταυτοποίησης. Για τον λόγο αυτό, όπως αναφέρεται και σε προηγούμενη ενότητα, για την ταυτοποίηση των αναλυτών η χρήση πρότυπων διαλυμάτων που να περιέχουν υπόστρωμα κρίνεται αναγκαία⁵⁵.

Η επίδραση του υποστρώματος στην απόκριση του ανιχνευτή μπορεί να εκφραστεί ως ενίσχυση ή καταστολή του σήματος. Ως αιτία καταστολής του σήματος δύναται να είναι η μείωση του ποσοστού των αναλυτών-στόχων που ιονίζονται σε σχέση με τις ουσίες του υποστρώματος, ένα φαινόμενο το οποίο δεν έχει μελετηθεί σε μεγάλο βαθμό αλλά οι επιπτώσεις του μπορεί να οδηγήσουν σε σφάλματα στην ποσοτικοποίηση και τελικά μειώνουν την ευαισθησία της μεθόδου.

Για την μελέτη της σημαντικότητας της επίδρασης του υποστρώματος στην απόκριση του ανιχνευτή (και εμμέσως στην ευαισθησία της μεθόδου), συγκρίθηκαν οι κλίσεις των γραμμών παλινδρόμησης που προέκυψαν χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα δύο διαφορετικά υποστρώματα (τομάτα και φράουλα) και σε καθαρό διαλύτη (μεθανόλη). Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε κατά ζεύγη

με τη χρήση του στατιστικού τεστ Student *t-test*. Η πειραματική τιμή t_{cal} υπολογίστηκε από την παρακάτω σχέση:

$$t_{cal} = \frac{|b_1 - b_2|}{\sqrt{S_{b_1}^2 - S_{b_2}^2}}$$

Όπου b_1 και b_2 είναι οι κλίσεις των γραμμών παλινδρόμησης και S_{b_1} και S_{b_2} οι τυπικές τους αποκλίσεις. Η θεωρητική τιμή για $6+6-4=8$ βαθμούς ελευθερίας και επίπεδο εμπιστοσύνης 0,05 για αμφίπλευρες δοκιμασίες είναι 2,306¹⁵⁹. Αν η θεωρητική τιμή (t_{theo}) είναι μεγαλύτερη από την πειραματική t_{cal} , η μηδενική υπόθεση (ότι οι κλίσεις των γραμμών δεν διαφέρουν μεταξύ τους) είναι αποδεκτή.

Συνολικά για κάθε αναλύτη πραγματοποιήθηκαν 3 ζεύγη συγκρίσεων των γραμμών παλινδρόμησης μεταξύ:

1. Χρήση προτύπων σε δυο διαφορετικά υποστρώματα (τομάτα και φράουλα)
2. Χρήση προτύπων σε διαλύτη και σε υπόστρωμα φράουλα.
3. Χρήση προτύπων σε διαλύτη και σε υπόστρωμα τομάτα.

Για την πρώτη περίπτωση η μηδενική υπόθεση, δηλαδή μη ύπαρξη σημαντικής διαφοράς στις κλίσεις των καμπυλών μεταξύ των δυο υποστρωμάτων, δηλώνει ότι η επίδραση του υποστρώματος είναι σταθερή και δεν μεταβάλλεται ανάλογα με το υπόστρωμα. Αντίθετα, στις περιπτώσεις δυο και τρία, η μηδενική υπόθεση (μη σημαντική διαφορά στις κλίσεις των καμπυλών μεταξύ διαλύτη και υποστρώματος) δηλώνει ότι η επίδραση του υποστρώματος δεν είναι σημαντική. Όπως συμπεραίνεται από τη μελέτη του **Πίνακα 6.4** σημαντικές διαφορές παρουσιάζονται μεταξύ των κλίσεων των καμπυλών, γεγονός που δηλώνει ότι η επίδραση του υποστρώματος είναι σημαντική. Έτσι η ποσοτικοποίηση με την χρήση προτύπων σε υπόστρωμα είναι αναγκαία για να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως του 2iP και gibberellic acid στην τομάτα και 1-naphthylacetic acid, 2-naphthoxyacetic acid, 4-Chlorophenoxyacetic acid, forchlorfenuron, IBA και thiadiazuron στις φράουλες, η ποσοτικοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί αξιόπιστα και με την χρήση προτύπων σε διαλύτη καθώς η επίδραση του υποστρώματος δεν αποδείχτηκε σημαντική.

Ζεύγος σύγκρισης	Αναλύτης	t_{cal}	Διαφορά
φράουλα-τομάτα	1-naphthylacetic acid	23.16	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	1-naphthylacetic acid	1.08	μη σημαντική
τομάτα-διαλύτης	1-naphthylacetic acid	17.49	σημαντική
φράουλα-τομάτα	2.4-D	41.49	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	2.4-D	2.35	σημαντική
τομάτα-διαλύτης	2.4-D	6.84	σημαντική
φράουλα-τομάτα	2iP	22.58	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	2iP	7.30	σημαντική
τομάτα-διαλύτης	2iP	1.82	μη σημαντική
φράουλα-τομάτα	2-naphtnoxyacetic acid	27.70	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	2-naphtnoxyacetic acid	1.44	μη σημαντική
τομάτα-διαλύτης	2-naphtnoxyacetic acid	5.03	σημαντική
φράουλα-τομάτα	4-Chlorophenoxyacetic acid	17.73	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	4-Chlorophenoxyacetic acid	1.70	μη σημαντική
τομάτα-διαλύτης	4-Chlorophenoxyacetic acid	8.19	σημαντική
φράουλα-τομάτα	6-benzyladenine	62.01	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	6-benzyladenine	9.95	σημαντική
τομάτα-διαλύτης	6-benzyladenine	5.20	σημαντική
φράουλα-τομάτα	chlormequat	1.17	μη σημαντική
φράουλα-διαλύτης	chlormequat	3.41	σημαντική
τομάτα-διαλύτης	chlormequat	3.27	σημαντική
φράουλα-τομάτα	forchlorfenuron	6.26	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	forchlorfenuron	1.78	μη σημαντική
τομάτα-διαλύτης	forchlorfenuron	6.12	σημαντική
φράουλα-τομάτα	gibberellic acid	8.23	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	gibberellic acid	2.65	σημαντική
τομάτα-διαλύτης	gibberellic acid	1.44	μη σημαντική
φράουλα-τομάτα	IBA	7.27	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	IBA	1.44	μη σημαντική

Ζεύγος σύγκρισης	Αναλύτης	t_{cal}	Διαφορά
τομάτα-διαλύτης	IBA	5.37	σημαντική
φράουλα-τομάτα	mefluidide	4.96	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	mefluidide	6.31	σημαντική
τομάτα-διαλύτης	mefluidide	9.60	σημαντική
φράουλα-τομάτα	meriquat	12.05	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	meriquat	5.71	σημαντική
τομάτα-διαλύτης	meriquat	4.00	σημαντική
φράουλα-τομάτα	prohexadione	14.49	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	prohexadione	3.25	σημαντική
τομάτα-διαλύτης	prohexadione	3.69	σημαντική
φράουλα-τομάτα	thidiazuron	4.69	σημαντική
φράουλα-διαλύτης	thidiazuron	0.11	μη σημαντική
τομάτα-διαλύτης	thidiazuron	2.89	σημαντική

Πίνακας 6.4. Αποτελέσματα σημαντικότητας (t-test) της επίδρασης του υποστρώματος στη μέτρηση με χρήση καμπύλης αναφοράς για τους υπό μελέτη αναλύτες

6.14. Ανάλυση δειγμάτων

Η αναπτυχθείσα μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων των φυτορμονών σε πραγματικά δείγματα αγοράς. Αναλύθηκαν συνολικά σαραντατρία δείγματα διαφόρων αγροτικών προϊόντων (δύο κολοκύθι, επτά αγγούρι, δεκαοκτώ τομάτα, έξι πιπεριά και δέκα φράουλα), η δειγματοληψία των οποίων διενεργήθηκε σύμφωνα με την οδηγία 2002/63/EK¹⁶⁰. Ο αρχικός έλεγχος των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στο σύστημα LC-TOF/MS για την παρουσία ή όχι των ουσιών σε αυτά. Το 9% των δειγμάτων βρέθηκε θετικό στην παρουσία φυτορμονών και ανιχνεύτηκαν τα μόρια (και συγκεντρώσεις τους) που παρουσιάζονται στον **Πίνακα 6.5**. Οι φυτορμόνες που ανιχνεύτηκαν ήταν το 1-naphthylacetic acid, 2,4-D, chlormequat, 4-Chlorophenoxyacetic acid, thiadiazuron, και 2iP. Σε τρία από τα επτά δείγματα, τα επίπεδα των αναλυτών βρέθηκε να είναι κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου με αποτέλεσμα -παρόλο που η ταυτοποίηση τους ήταν αξιόπιστη- να μην πραγματοποιηθεί περαιτέρω ποσοτικοποίηση τους.

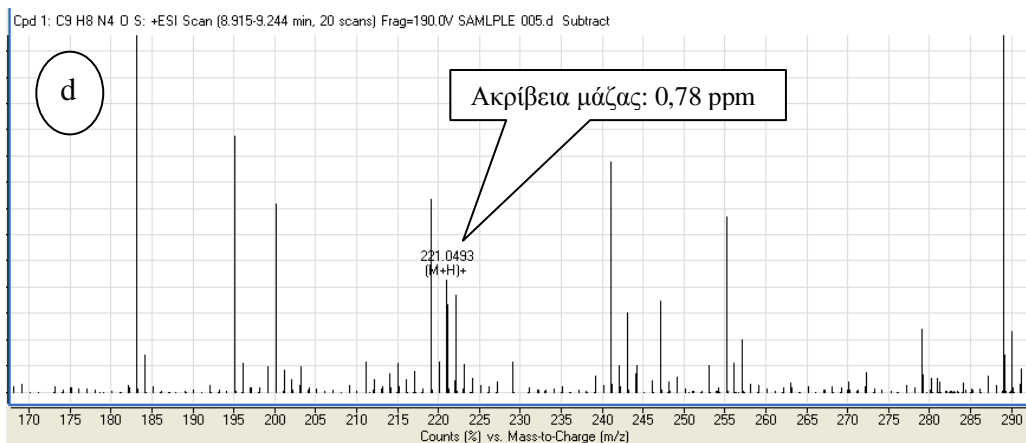
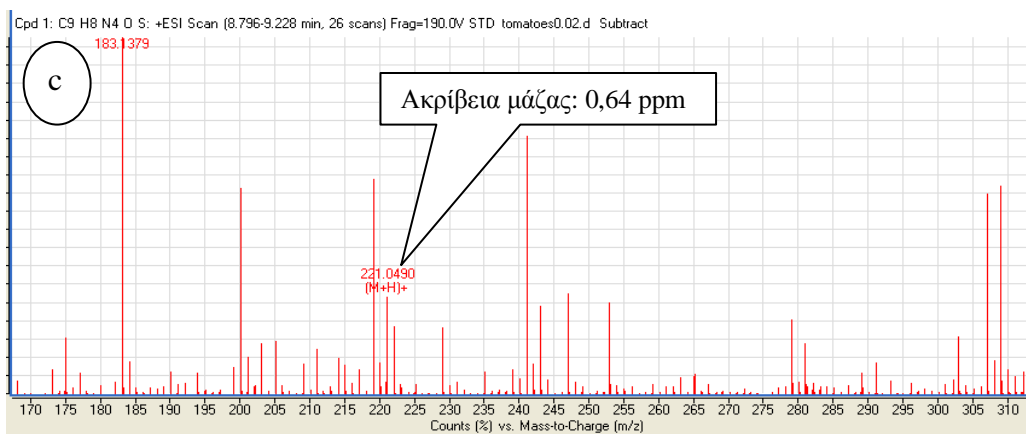
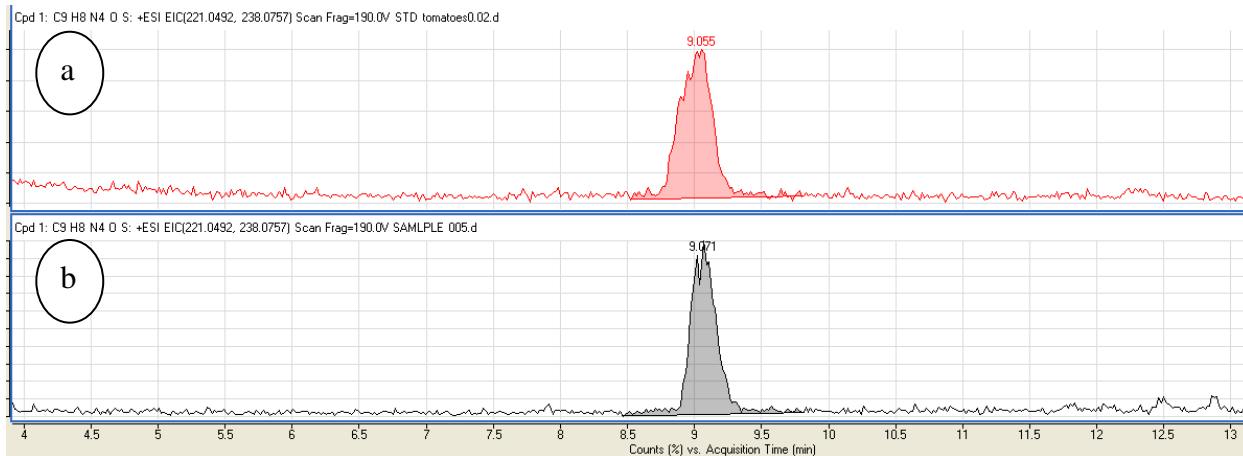
Υπόστρωμα	Αναλύτης	Αναλογία ιόντων (δείγμα)	Αναλογία ιόντων (πρότυπο)	C (mg/kg)
peppers	1-naphthylacetic acid	51	58.7	0.08
tomatoes	2,4-D	5.4	4.1	0.011
tomatoes	chlormequat	32	31	4.20
courgettes	4-Chlorophenoxyacetic acid	37.5	39.9	0.35
courgettes	thiadiazuron	0.8	1.1	L.O.D.<C<L.O.Q.
strawberries	2iP	33.6	31.1	L.O.D.<C<L.O.Q.
strawberries	2iP	28.8	31.1	L.O.D.<C<L.O.Q.

Πίνακας 6.5. Σύνοψη ευρημάτων από τα 43 αναλυθείσα δείγματα καταναμημένα ανά υπόστρωμα και αναλύτη. Οι αναλογίες ιόντων μεταξύ του δείγματος και του προτύπου επιβεβαιώνουν την ταυτότητα της ουσίας (LC-MS/MS).

Στο Σχήμα 6.3 απεικονίζεται ο αναλύτης 2,4D σε δείγμα τομάτας.



Σχήμα 6.3. LC-MS/MS χρωματογράφημα δείγματος τομάτας το οποίο περιέχει υπολείμματα του αναλύτη 2,4 D σε συγκέντρωση 0.01 mg/kg



Σχήμα 6.4. LC-TOF/MS χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος thiadiazuron συγκέντρωσης 0,02mg/L σε υπόστρωμα τομάτας (a) και δείγματος αγγουριού το οποίο περιέχει υπολείμματα της ουσίας thiadiazuron (b) Στα σχήματα (c) και (d) απεικονίζονται τα φάσματα των κορυφών της ουσίας thiadiazuron στο πρότυπο (a) και στο δείγμα (b) αντίστοιχα.

6.15. Συμπεράσματα

Ο τομέας της ανάλυσης των φυτορμονών απαιτεί μεθόδους απλές, πολυδύναμες και οικονομικές. Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια νέα μέθοδος η οποία είναι απλή (σύντομη διαδικασία εκχύλισης χωρίς πολύπλοκο εξοπλισμό), οικονομική (μικρή κατανάλωση αναλωσίμων ανά δείγμα), πολυδύναμη (κατάλληλη για ανάλυση φυτορμονών διαφορετικών χημικών κατηγοριών) και ευαίσθητη, πληρώνοντας παράλληλα τα όρια που έχει θεσπίσει η Ε.Ε για την παρουσία των φυτορμονών στα τρόφιμα. Η ταυτοποίηση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική LC-MS/MS η οποία εξασφαλίζει χαμηλά όρια ανίχνευσης σε πολύπλοκα υποστρώματα και την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση τους. Επιπρόσθετα η χρησιμοποίηση του LC-TOF/MS ως τεχνικής σάρωσης εξασφάλισε την αξιόπιστη ταυτοποίηση των αναλυτών σε άγνωστα δείγματα. Η μέθοδος επικυρώθηκε με επιτυχία και χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων αγοράς στα οποία ανιχνεύτηκε η παρουσία υπολειμμάτων φυτορμονών. Από τα σαραντατρία δείγματα διαφόρων αγροτικών προϊόντων που αναλύθηκαν, τα επτά βρέθηκαν θετικά στην παρουσία υπολειμμάτων φυτορμονών. Οι φυτορμόνες που ανιχνεύτηκαν ήταν οι 1-naphthylacetic acid, 2,4-D, chlormequat, 4-Chlorophenoxyacetic acid, thiadiazuron, και 2iP σε επίπεδα συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από <0,01 – 4,2 mg/kg.

7. Ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών ομάδων Μυκοτοξινών σε ζωοτροφές και γάλα με την χρήση LC-MS/MS

7.1. Εισαγωγή

Η πλειονότητα των μυκοτοξινών που απαντώνται στις ζωοτροφές είναι αφλατοξίνες, ωχρατοξίνες και τριχοθισίνες¹⁶¹, οι οποίες προσδιορίζονται με ποικίλες αναλυτικές μεθόδους. Στις ζωοτροφές ο προσδιορισμός των τοξινών αυτών πραγματοποιείται με μεθόδους αέριας^{162,163} και υγρής¹⁶⁴ χρωματογραφίας. Ο προσδιορισμός με αέρια χρωματογραφία απαιτεί παραγωγοποίηση, η οποία χαρακτηρίζεται από πολυπλοκότητα με αποτέλεσμα οι τεχνικές αυτές να μην είναι τόσο διαδεδομένες. Η υγρή χρωματογραφία αποτελεί την πλέον χρησιμοποιούμενη τεχνική, η οποία σε συνδυασμό με την φασματομετρία μάζας (MS) αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία για την ανάλυση των ουσιών αυτών σε τρόφιμα και ζωοτροφές^{164,165,166}. Οι τεχνικές συζευγμένης φασματομετρίας μάζας (MS/MS) γίνονται όλο και περισσότερο δημοφιλείς αφού είναι σε θέση να προσδιορίσουν με αξιοπιστία μεγάλο αριθμό μυκοτοξινών σε συνεκχυλίσματα που προέρχονται από τεχνικές επεξεργασίας δειγμάτων με ελάχιστο ή και καθόλου στάδιο καθαρισμού.

7.2. Υλικά και Αντιδραστήρια

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιηθήκαν:

1. Μεθανόλη, καθαρότητας HPLC (Lab Scan).
2. Νερό, καθαρότητας HPLC (Lab Scan).
3. Μυρμηκικό οξύ, (Fluka)
4. Φιάλες φυγοκέντρου των 50mL από teflon και με βιδωτό πώμα.
5. Φιάλες φυγοκέντρου των 15mL από polypropylene και με βιδωτό πώμα.
6. Γυάλινα φιαλίδια των 8 mL με πώμα από teflon (PTFE).
7. Φίλτρα (syringe filters) PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μm.
8. Εννέα πρότυποι αναλύτες αναφοράς γνωστής καθαρότητας (Sigma-Aldrich) Aflatoxin B1, Aflatoxin B2, Aflatoxin G1, Aflatoxin G2, Diacetoxyscirpenol (DAS), Ochratoxin A (OTA), Toxin HT-2, Toxin T-2, Zearalenone (ZON).

7.3. Εξοπλισμός

1. Φυγόκεντρος 4000 στροφών / min.
2. Αναδευτήρας Vortex mixer (K-550-GE, Scientific industries inc. Bohemia).
3. Υγρός χρωματογράφος με σύστημα αντλίας δυο καναλιών (Agilent 1200), σύστημα απαέρωσης κινητών φάσεων (G1379B), αυτόματο δειγματολήπτη 100 θέσεων ελεγχόμενης θερμοκρασίας (Hip/ALS G1367A) και θάλαμο στήλης ελεγχόμενης θερμοκρασίας (TCC G1316A) συνδεδεμένο με φασματομέτρο μάζας τριπλού τετραπόλου (Agilent Triple Quad 6410). Για τον έλεγχο του συστήματος και την συλλογή των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Agilent Mass Hunter data acquisition Triple Quad B.01.04 και για την επεξεργασία τους το λογισμικό Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.01.04.
4. Γεννήτρια παραγωγής αζώτου (Nitroflow Basic Mobile, Parker Filtration & Separation B.V.)

7.4. Επιλογή αναλυτών

Για την επικύρωση της μεθόδου επιλέχθηκαν αντιπροσωπευτικοί αναλύτες διαφόρων χημικών κατηγοριών, με στόχο την ανάδειξη του πολυδύναμου της μεθόδου (δηλαδή την ικανότητά τους να επεκτείνεται σε άλλους αναλύτες της κατηγορίας). Οι αναλύτες που επιλέχθηκαν προέρχονται από τις τέσσερις πλέον διαδεδομένες -λόγω της συνήθους παρουσίας τους σε τρόφιμα και ζωοτροφές- κατηγορίες μυκοτοξινών: τις αφλατοξίνες (Aflatoxin B1, B2, G1, G2), τις οχρατοξίνες (οχρατοξίνη A), τις τριχοθισίνες (DAS, Toxin HT-2, Toxin T-2) και την ζεαρλενόνη η οποία επίσης παράγεται από μύκητες είδους fusarium.

7.5. Παρασκευή Προτύπων διαλυμάτων Παρακαταθήκης

Τα πυκνά διαλύματα παρακαταθήκης (100-500 ng/mL) παρασκευάστηκαν σε μεθανόλη, τοποθετήθηκαν σε ειδικά γυάλινα φιαλίδια με πώμα από Teflon και αποθηκεύτηκαν στους -20 °C. Η ζύγιση της στερεάς δραστικής ουσίας για την παρασκευή των διαλυμάτων έγινε σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών, ενώ ελήφθη υπόψη και ο βαθμός καθαρότητάς τους. Ένα διάλυμα εργασίας στο οποίο εμπεριέχονται όλες οι παραπάνω ουσίες παρασκευάστηκε σε συγκέντρωση 1 µg/mL σε μεθανόλη.

7.6. Παρασκευή διαλυμάτων εργασίας (matrix matched standards)

Για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών παρασκευάστηκαν διαλύματα εργασίας σε υπόστρωμα ζωοτροφής ή γάλακτος στα οποία είχε πιστοποιηθεί η απουσία υπολειμμάτων των μυκοτοξινών. Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν με προσθήκη ποσότητας x mL προτύπου δ/τος σε $1-x$ mL από το εκχύλισμα του μάρτυρα. Ο χρησιμοποιούμενος όγκος x mL πρέπει να είναι αμελητέος σε σχέση με τον όγκο του τελικού δ/τος (1 mL) για να μην αραιωθεί η συγκέντρωση του υποστρώματος σε βαθμό που να μεταβάλλεται η επίδραση του. Τα διαλύματα εργασίας παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την διαδικασία που περιγράφεται στον Πίνακα της **Ενότητας 6.7**.

Τέλος, κάθε πρότυπο πριν από την χρωματογραφική ανάλυση διηθήθηκε από φίλτρο τύπου syringe filter 0,45 μ m σε φιαλίδιο των 2mL και πωματίστηκε με πώμα PTFE.

7.7. Μέθοδος Εκχύλισης

7.7.1. Μέθοδος επεξεργασίας ζωοτροφών

Σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL προστίθενται 2 ± 0.02 g (m_s), 8 mL (V_0) νερού και αναδεύονται για 1min. Στη συνέχεια προστίθενται 8 mL (V_1) οξινισμένης μεθανόλης (1% HCOOH), αναδεύονται για 1min και φυγοκεντρούνται για 5 min στις 4000 στροφές/min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκαν σε φιαλίδιο των 8 mL με πώμα PTFE και αποθηκεύτηκαν σε κατάψυξη. Πριν από την ανάλυση το τελικό εκχύλισμα διηθήθηκε από φίλτρο τύπου syringe filter 0,45 μ m μέσα σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη των 2mL με πώμα PTFE και εγχύθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα.

7.7.2. Μέθοδος επεξεργασίας γάλακτος

Σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL ζυγίστηκαν 2 ± 0.02 g (m_s) δείγμα, προστέθηκαν 4 mL (V_1) οξινισμένης μεθανόλης (1% HCOOH) και ακολούθησε ανάδευση επί 1min και φυγοκέντρωση στις 4000 στροφές/ min για 5 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο των 8 mL με πώμα PTFE και αποθηκεύτηκε στην κατάψυξη για τουλάχιστον 12 ώρες για να καθιζάνει το λίπος του γάλακτος. Πριν την ανάλυση το τελικό εκχύλισμα διηθήθηκε από φίλτρο τύπου syringe filter

0,45 μ m μέσα σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη των 2mL, με πώμα PTFE και εγχύθηκε στο χρωματογραφικό σύστημα.

7.8. Προσδιορισμός με υγρή χρωματογραφία – φασματομετρία μαζών τριπλού τετραπόλου

Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2.1mm και μεγέθους σωματιδίων 5 μ m. Η θερμοκρασία στήλης ήταν αυτή του περιβάλλοντος (25 \pm 4°C). Ως διαλύτης έκλουσης A χρησιμοποιήθηκε 5mM HCOONH₄, 0,1% HCOOH και 0.02% ακετονιτρίλιο σε νερό και ως διαλύτης έκλουσης B 5mM HCOONH₄, 0,1% HCOOH σε μεθανόλη. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν σταθερή 0,25 mL/min.

Ως πρόγραμμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω:

Χρόνος (min)	%A	%B
0,00	70,0	30,0
5,00	0,0	100,0
10,00	0,0	100,0
10,12	70,0	30,0
15,00	70,0	30,0

Από το τελικό εκχύλισμα του δείγματος 10 μ L εγχύθηκαν στο LC. Για την αποφυγή μολύνσεων, μετά από κάθε έγχυση ο αυτόματος δειγματολήπτης εκπλύθηκε αυτόματα με διαλύτη όμοιας σύστασης με την κινητή φάση B για 10 sec.

Το σύστημα φασματομετρίας μάζας τριπλού τετραπόλου (Agilent Triple Quad 6410) λειτούργησε σε θετικό ιονισμό με την τεχνική λειτουργίας παρακολούθησης πολλαπλών μεταπτώσεων (MRM). Οι βασικές παράμετροι συστήματος ρυθμίστηκαν ως εξής:

- ✓ Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης: 300 °C
- ✓ Αέριο ξήρανσης και εκνέφωσης: Άζωτο υψηλής καθαρότητας.
- ✓ Πίεση αερίου ξήρανσης: 7L/min
- ✓ Πίεση αερίου εκνέφωσης: 30psi
- ✓ Τάση τριχοειδούς (capillary voltage): 4000V
- ✓ Τάση θραυσματοποίησης πηγής (fragmentor voltage-in-source CID): 190V
- ✓ Τάση ανιχνευτή: 1500Volt.
- ✓ RF οκταπόλου: 250V
- ✓ Αέριο κελιού θραυσματοποίησης: Αργό καθαρότητας 99.999 %, 1.5mTorr

- ✓ Χρόνος συλλογής μεταπτώσεων: 50msec
- ✓ Τάση τριχοειδούς: Αναγράφονται στον **Πίνακα I του Παραρτήματος** και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.
- ✓ Ενέργεια θραυσματοποίησης: Αναγράφονται στον **Πίνακα I του Παραρτήματος** και ποικίλει ανάλογα με τον αναλύτη.
- ✓ Τάση ανιχνευτή: 1500Volt.

7.9. Προσδιορισμός με γρήγη χρωματογραφία – φασματομετρία χρόνου πτήσης ιόντων

Ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση στήλης Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2.1mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm. Η θερμοκρασία στήλης ήταν του περιβάλλοντος ($25 \pm 4^{\circ}\text{C}$) και ως διαλύτης έκλουσης Α χρησιμοποιήθηκε 5mM HCOONH₄, 0,1% HCOOH και 0.02% ακετονιτρίλιο σε νερό και ως διαλύτης έκλουσης Β 5mM HCOONH₄, 0,1% HCOOH σε μεθανόλη. Η ροή του διαλύτη έκλουσης ήταν σταθερή 0,25 mL/min.

Ως πρόγραμμα έκλουσης χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω:

Χρόνος (min)	%A	%B
0,00	70,0	30,0
5,00	0,0	100,0
10,00	0,0	100,0
10,12	70,0	30,0
15,00	70,0	30,0

Από το τελικό εκχύλισμα του δείγματος εγχύθηκαν 10 μL στο LC. Για την αποφυγή μολύνσεων, μετά από κάθε έγχυση ο αυτόματος δειγματολήπτης εκπλένεται αυτόματα με διαλύτη όμοιας σύστασης με την κινητή φάση Β για 10 sec.

Ο προσδιορισμός των αναλυτών πραγματοποιήθηκε σε σύστημα φασματομετρίας μαζών χρόνου πτήσης ιόντων εφοδιασμένο με πηγή ηλεκτροδιάχυσης η οποία λειτουργεί σε θετικό ιονισμό.

Οι βασικές παράμετροι συστήματος ρυθμίστηκαν ως εξής:

- ✓ Θερμοκρασία αερίου ξήρανσης: 300 °C
- ✓ Αέριο ξήρανσης και εκνέφωσης: Άζωτο υψηλής καθαρότητας.
- ✓ Πίεση αερίου ξήρανσης: 10L/min
- ✓ Πίεση αερίου εκνέφωσης: 45psi
- ✓ Τάση τριχοειδούς (capillary voltage): 4000V

- ✓ Τάση θραυσματοποίησης πηγής (fragmentor voltage-in-source CID): 190V
- ✓ Τάση ανιχνευτή: 1500Volt.
- ✓ RF οκταπόλου: 250V
- ✓ Λειτουργία καταγραφής ιόντων: Πλήρες φάσμα.
- ✓ Εύρος καταγραφής φασμάτων: 100-1000amu

7.10. Ταυτοποίηση

Για την ανίχνευση του αναλύτη στο δείγμα πρέπει να εμφανιστούν χρωματογραφικές κορυφές σε χρόνο πλησίον του χρόνου κατακράτησης της πρότυπης ουσίας ($\pm 3\%$) και πρέπει ο λόγος των δυο μεταπτώσεων (LC-MS/MS) ή ιόντων (LC-TOF/MS) να πληροί τις απαιτήσεις του παρακάτω πίνακα⁵⁵:

Σχετική ένταση ιόντος (% της βασικής κορυφής)	LC-MS/MS και LC-TOF/MS (επιτρεπόμενη απόκλιση %)
> 50 %	± 20 %
> 20 % ως 50 %	± 25 %
> 10 % ως 20 %	± 30 %
$\leq 10\%$	± 50 %

Εάν η ταυτοποίηση των αναλυτών πραγματοποιείται με σύστημα LC-TOF, τότε η παράμετρος της ακρίβειας μάζας θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη αφού η αξιόπιστη ταυτοποίηση προϋποθέτει ότι το σφάλμα που προκύπτει μεταξύ θεωρητικής και πειραματικής τιμής να είναι μικρότερο των 5ppm ⁵⁵.

7.11. Προσδιορισμός

Η περιεκτικότητα του αναλύτη στο δείγμα, σε mg/kg, υπολογίζεται, από την εξίσωση:

$$C = f \times C_I$$

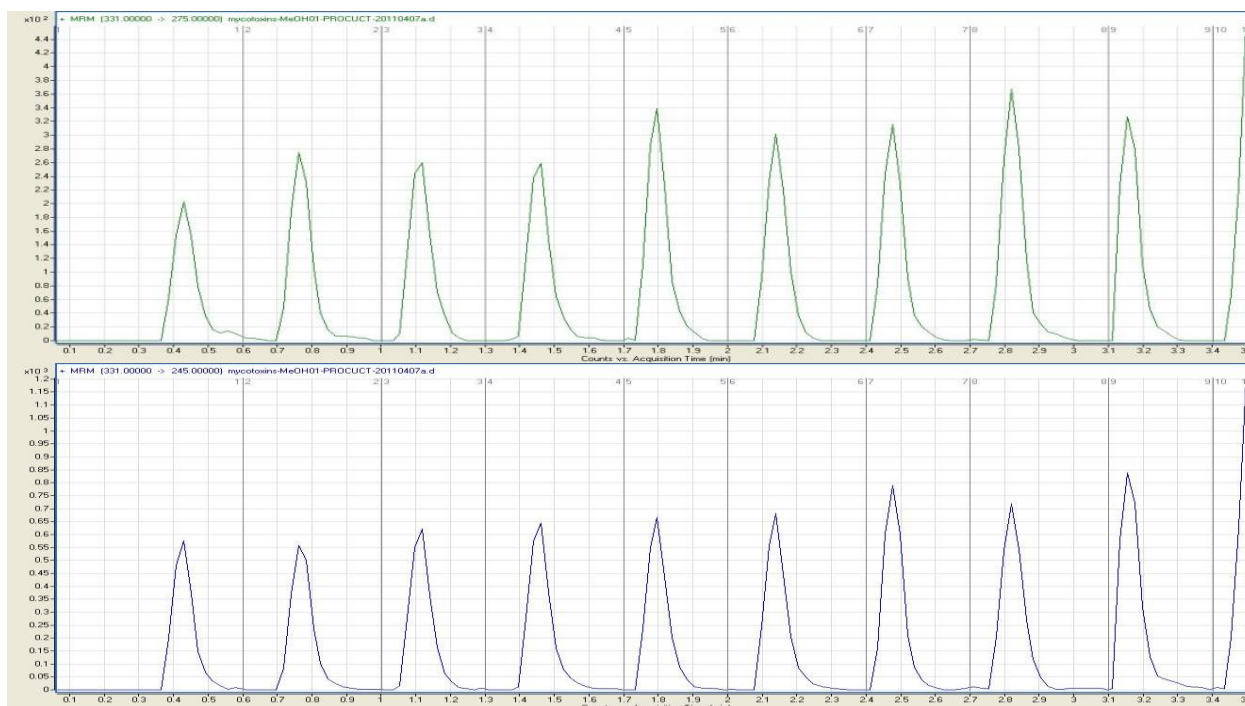
όπου:

- ✓ C_I είναι η συγκέντρωση του αναλύτη στο τελικό προς έγχυση διάλυμα, όπως προκύπτει από τη σύγκριση με πρότυπα διαλύματα αναφοράς και
- ✓ ο συντελεστής $f = 10V_0 / m_s V_I$ (V_I , V_0 ο όγκος των διαλυτών και m_s η μάζα του δείγματος) που στην παρούσα μέθοδο είναι ίσος με:
 - ✓ Για τις ζωοτροφές $f=8$
 - ✓ Για το γάλα $f=2$

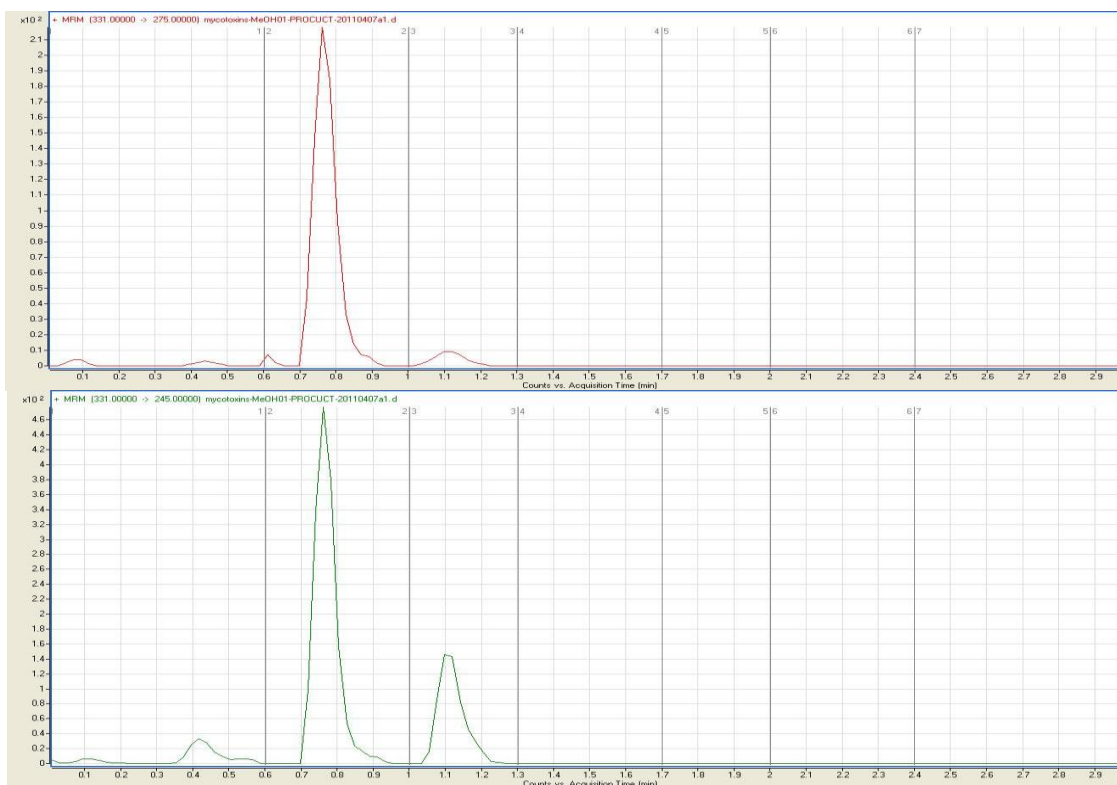
7.12. Αποτελέσματα και συζήτηση

7.12.1. Βελτιστοποίηση παραμέτρων Φασματομέτρου Μαζών

Στην παρούσα ενότητα μελετήθηκε ο σχηματισμός και η θραυσματοποίηση των αναλυτών σε θετικό και αρνητικό ιονισμό. Για το σκοπό αυτό, διαλύματα από κάθε μεμονωμένο αναλύτη συγκέντρωσης 100 μg/L παρασκευάστηκαν και εγχύθηκαν απευθείας στο σύστημα για να βελτιστοποιηθούν οι τιμές της τάσης του τριχοειδούς και της ενέργειας θραυσματοποίησης για κάθε μετάπτωση ξεχωριστά. Στο **Σχήμα 7.1 (a, b)** απεικονίζονται οι καμπύλες βελτιστοποίησης της τάσης τριχοειδούς για τον αναλύτη aflatoxin G2 και της ενέργειας θραυσματοποίησης των θυγατρικών του ιόντων. Το μέγιστο της κορυφής δείχνει τη βέλτιστη τιμή (τάσης τριχοειδούς ή ενέργειας θραυσματοποίησης), στην οποία επιτυγχάνεται η καλύτερη ευαισθησία που εκφράζεται ως η ένταση των ιόντων που οδηγούνται στον ανιχνευτή. Η διαδικασία αυτή επαναλήφθηκε για όλους τους αναλύτες. Αναλυτικότερα, οι μεταπτώσεις (πρόδρομα και θυγατρικά ιόντα), η τάση του τριχοειδούς η ενέργεια θραυσματοποίησης, καθώς και οι υπόλοιπες βασικές χρωματογραφικές παράμετροι παρουσιάζονται στον **Πίνακα III του Παραρτήματος**.



Σχήμα 7.1 (a). Απόκριση του ανιχνευτή σε διαφορετικές τιμές της τάσης τριχοειδούς (20-30-40-50-60-70-80-90-100+120-130V) για τις μεταπτώσεις 331>275 και 331>245 του αναλύτη aflatoxin G2



Σχήμα 7.1(b). Απόκριση του ανιχνευτή σε διαφορετικές τιμές της ενέργειας θραυσματοποίησης (20 – 40 – 60- 90- 120 -150V) για τις μεταπτώσεις 331>275 και 331>245 του αναλύτη aflatoxin G2

7.12.2. Ορθότητα – Πιστότητα

Η εργαστηριακή εκτίμηση της ορθότητας και πιστότητας προσδιορίστηκε εφαρμόζοντας τη μέθοδο σε εμβολιασμένα δείγματα μάρτυρα (ζωοτροφών και γάλακτος) για πέντε επαναλήψεις. Στο πλαίσιο αυτό, ποσότητα $2 \pm 0,02$ gr μάρτυρα εμβολιάστηκε σε δυο επίπεδα γνωστών συγκεντρώσεων των αναλυτών με προσθήκη μικρού όγκου διαλύματος εργασίας. Για την εκτίμηση της ορθότητας ελέγχτηκε η ανάκτηση και της πιστότητας η σχετική τυπική απόκλιση (SDr). Το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού ήταν τα 10 μg/kg και το υψηλότερο το δεκαπλάσιο του. Η Ε.Ε.¹⁶⁷ αναφέρει ως αποδεκτές ανακτήσεις κατά την επικύρωση όσες βρίσκονται εντός της περιοχής 70-120% και αποδεκτές τιμές σχετικής τυπικής απόκλισης (SDr) για ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα, όσες είναι κάτω του 20%. Σε περιπτώσεις όμως που ο στόχος αυτός δεν μπορεί να επιτευχθεί, μπορούν να γίνουν αποδεκτές μικρότερες τιμές ανάκτησης που όμως πρέπει να συνοδεύονται από ικανοποιητικά στοιχεία πιστότητας.

Αναλύτες	Επίπεδο (mg/kg)	Ζωοτροφές		Γάλα	
		R (%)	SDr (%)	R (%)	SDr (%)
Aflatoxin B1	0,01	93,8	16,2	52,89	5,16
Aflatoxin B1	0,1	72,0	11,3	63,8	8,9
Aflatoxin B2	0,01	120,9	14,3	62,20	11,90
Aflatoxin B2	0,1	70,1	4,1	72,1	1,58
Aflatoxin G1	0,01	111,9	16,4	56,37	2,46
Aflatoxin G1	0,1	70,3	13,2	68,2	8,9
Aflatoxin G2	0,01	70,1	9,4	57,26	0,79
Aflatoxin G2	0,1	73,2	10,3	71,3	2,8
Diacetoxyscirpenol (DAS)	0,01	119,4	13,9	64,40	9,77
Diacetoxyscirpenol (DAS)	0,1	107,2	11,5	74,3	10,9
Ochratoxin A (OTA)	0,01	81,2	5,3	91,82	19,80
Ochratoxin A (OTA)	0,1	70,9	3,8	98,50	12,80
Toxin HT-2	0,01	106,8	6,8	118,90	14,30
Toxin HT-2	0,1	76,2	12,1	109,20	18,10
Toxin T-2	0,01	98,1	6,8	94,57	12,84
Toxin T-2	0,1	119,1	15,3	115,80	13,00
Zearalenone (ZON)	0,01	106,6	3,9	72,56	6,40
Zearalenone (ZON)	0,1	73,3	8,0	79,6	5,6

Πίνακας 7.1. Μέσες εκατοστιαίες ανακτήσεις R (%) για N=5 και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (SDr) των αναλυτών για τα 2 επίπεδα εμβολιασμού και για τα 2 υποστρώματα

Όπως παρατηρούμε από τον **Πίνακα 7.1**, οι μέσες ανακτήσεις των αναλυτών στις ζωοτροφές κυμαίνονται από 70.1 – 120.9% με SDr μικρότερες από 16.4% στο χαμηλότερο επίπεδο και 70.1 – 119.1 % με SDr μικρότερες από 15.3 % για το υψηλότερο. Για το γάλα οι μέσες ανακτήσεις κυμαίνονται από 52.9 – 118.9% με SDr μικρότερες από 19.8% στο χαμηλότερο επίπεδο και 63.8 – 115.8 % με SDr μικρότερες από 18.1 % για το υψηλότερο.

7.12.3. Γραμμικότητα

Για την κατασκευή του διαγράμματος γραμμικότητας έγινε σειρά εγχύσεων προτύπων σε υπόστρωμα ζωοτροφών και γάλακτος σε επτά συγκεντρώσεις (1.75–2.5–5–10–20–40–80 µg/L). Τα πρότυπα παρασκευάστηκαν σε δύο διαφορετικά υποστρώματα (ζωοτροφές και γάλα) για να συνυπολογιστεί η επίδραση του υποστρώματος στη μελέτη της γραμμικότητας. Ο συντελεστής συσχέτισης (r) και το τετράγωνο αυτού (r^2), η τεταγμένη επί της αρχής (a) η τυπική απόκλιση της (S_a), η κλίση της ευθείας παλινδρόμησης (b) η τυπική απόκλιση της (S_b) και η αβεβαιότητα (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις εξετάστηκαν και παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.2**.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι όλοι οι αναλύτες παρουσιάζουν πολύ καλή γραμμικότητα με συντελεστές συσχέτισης πάνω από 0,981. Μοναδική εξαίρεση αποτελεί ο αναλύτης aflatoxin B1 στις ζωοτροφές που παρουσιάζει ικανοποιητική γραμμικότητα με συντελεστή συσχέτισης 0.966.

Ουσίες	Υπόστρωμα	r	r ²	b	Sb	a	Sa	Su
Aflatoxin B1	Ζωοτροφή	0.966	0.934	425386	50629	22906	1768	0.008
Aflatoxin B2	Ζωοτροφή	0.994	0.988	1294107	62681	8544	2189	0.003
Aflatoxin G1	Ζωοτροφή	0.994	0.989	2740570	129415	1786	4519	0.003
Aflatoxin G2	Ζωοτροφή	0.999	0.997	415256	9821	2861	343	0.002
Diacetoxyscirpenol (DAS)	Ζωοτροφή	0.996	0.992	189044	7800	1405	272	0.003
Ochratoxin A (OTA)	Ζωοτροφή	0.993	0.987	1276387	66309	1075	2315	0.004
Toxin HT-2	Ζωοτροφή	0.966	0.933	121721762	5668084	-2596475	810202	0.029
Toxin T-2	Ζωοτροφή	0.972	0.945	540824103	22639456	-8546039	3236108	0.026
zearalenone (ZON)	Ζωοτροφή	0.983	0.966	89707491	2945474	-1183865	421029	0.020
Aflatoxin B1	Γάλα	0.998	0.996	7627593	229090	-15261	7999	0.002
Aflatoxin B2	Γάλα	0.998	0.995	14535195	446366	-27740	15586	0.002
Aflatoxin G1	Γάλα	0.994	0.987	27072207	1370225	-49791	47844	0.004
Aflatoxin G2	Γάλα	0.996	0.992	2780739	114942	-3822	4013	0.003
Diacetoxyscirpenol (DAS)	Γάλα	0.981	0.962	583087	52089	66	1819	0.006
Ochratoxin A (OTA)	Γάλα	0.997	0.994	7643618	266181	-15119	9294	0.002
Toxin HT-2	Γάλα	0.997	0.995	228791	7252	-469	253	0.002
Toxin T-2	Γάλα	0.989	0.978	3570422	236941	-10172	8273	0.005
zearalenone (ZON)	Γάλα	0.999	0.999	557586	8755	-820	306	0.001

Πίνακας 7.2. Βασικές παράμετροι γραμμών παλινδρόμησης για τους αναλύτες σε υπόστρωμα ζωοτροφής και γάλα. (συντελεστής συσχέτισης (r), και το τετράγωνο αυτού (r²), τεταγμένη επί της αρχής (a) η τυπική απόκλιση της (S_a), κλίση της γραμμής (b) η τυπική απόκλιση της (S_b) και η αβεβαιότητα (S_u) που προκύπτει από την χρήση της γραμμής παλινδρόμησης στις μετρήσεις

7.12.4. Υπολογισμός του ορίου ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται το ελάχιστο επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να προσδιοριστεί αξιόπιστα, δηλαδή με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα. Για το σκοπό αυτό ελέγχθηκε ο λόγος σήμα/θόρυβος (S/N), για τον οποίο πρέπει να ισχύει $S/N \geq 10^{55}$. Με βάση αυτές τις απαιτήσεις το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου βρέθηκε να είναι το χαμηλότερο επίπεδο εμβολιασμού δηλαδή 10 µg/kg για όλους τους αναλύτες

7.13. Ανάλυση δειγμάτων

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των επιπέδων των μυκοτοξινών σε δείγματα ζωοτροφών και γάλακτος. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε από το εργαστήριο διατροφής αγροτικών ζώων του τμήματος Ζωικής παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

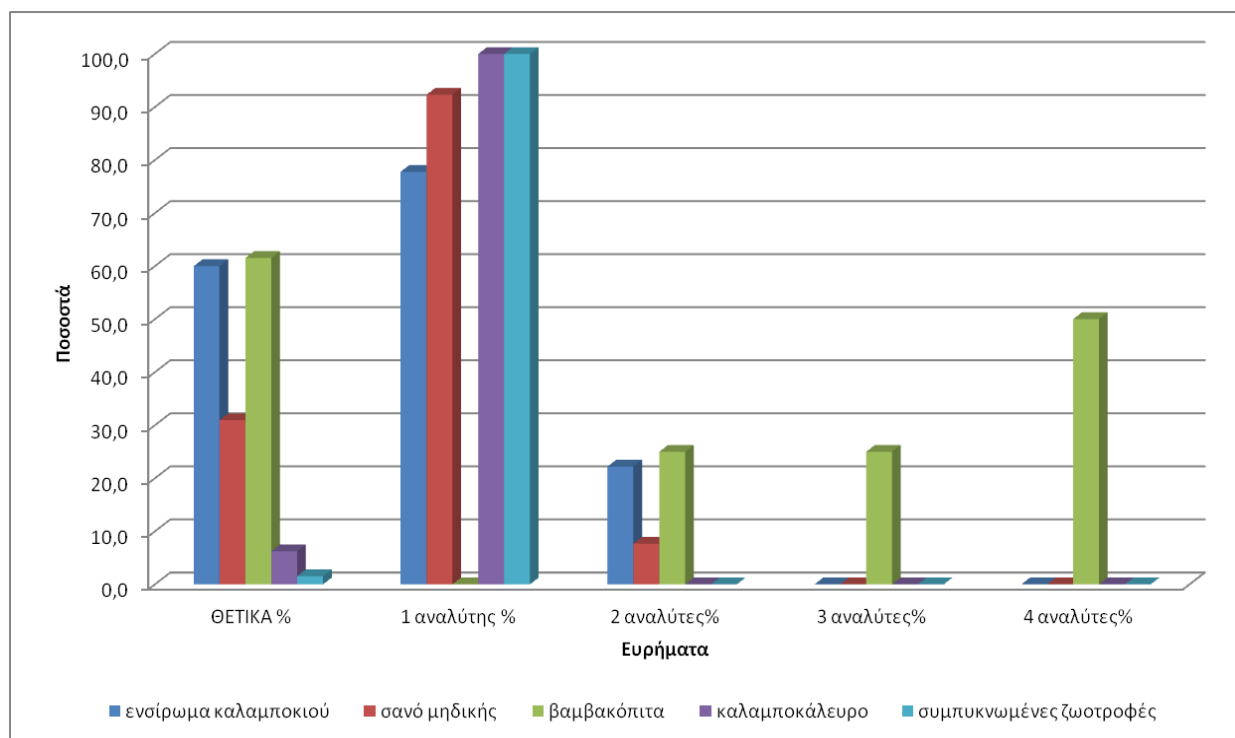
Συνολικά συλλέχθηκαν εκατόν τέσσερα δείγματα ζωοτροφών (δεκαπέντε ενσίρωμα καλαμποκιού, σαρανταδύο σανού μηδικής, δεκατρείς βαμβακόπιτας, δεκαέξι καλαμποκάλευρου και εξηνταπέντε συμπυκνωμένων ζωοτροφών) και ογδονταπέντε δείγματα γάλακτος (εικοσιένα αγελαδινού, σαραντατέσσερα πρόβειου και είκοσι αιγών). Τα μόρια που ανιχνεύτηκαν (και τα επίπεδα συγκεντρώσεών τους) στα θετικά για μυκοτοξίνες δείγματα παρουσιάζονται στον **Πίνακα 7.3**.

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση Αναλυτών (mg/kg)				
	αφλατοξίνη B1	αφλατοξίνη B2	αφλατοξίνη G ₂	ωχρατοξίνη A	Τοξίνη T-2
ενσίρωμα καλαμποκιού	–	450	219	–	–
	–	–	6	17	–
	–	–	12	–	–
	–	–	138	–	–
	–	–	891	–	–
	–	–	5	–	–
	–	–	13	–	–
	–	–	13	–	–
	–	–	17	–	–
βαμβακόπιτα	167	49	–	23	76
	52	–	9	11	9
	18	–	4	10	562
	83	–	8	19	546
	34	–	6	–	12
	47	–	10	–	8
	–	–	4	–	13
	94	–	–	3	–
σανό μηδικής	–	–	–	23	–
	–	–	–	1697	–
	–	–	4	–	–
	–	–	9	–	–
	–	–	–	22	–
	–	–	28	–	–
	–	–	–	94	–
	–	–	–	12	–
	–	–	87	–	–

Υπόστρωμα	Συγκέντρωση Αναλυτών (mg/kg)				
	αφλατοξίνη B1	αφλατοξίνη B2	αφλατοξίνη G ₂	ωχρατοξίνη A	Τοξίνη T-2
	–	–	8	–	–
	–	–	13	–	–
	–	–	39	74	–
	–	–	–	14	–
καλαμποκάλευρο	–	–	15	–	–
συμπυκνωμένες ζωοτροφές	–	–	11	–	–

Πίνακας 7.3. Σύνοψη ευρημάτων από τα αναλυθείσα δείγματα ζωοτροφών καταναμημένα ανά υπόστρωμα και αναλύτη.

Οι μυκοτοξίνες που ανιχνεύτηκαν ήταν οι αφλατοξίνες B1, B2 G2, η ωχρατοξίνη A και η T-2 τοξίνη. Όπως απεικονίζεται και από το **Σχήμα 7.3**, Το 60% των δειγμάτων ενσιρώματος καλαμποκιού βρέθηκε θετικό στην παρουσία μυκοτοξινών, ομοίως και τα δείγματα βαμβακόπιτας με ποσοστό 61,5%.



Σχήμα 7.3. Ποσοστά θετικών ευρημάτων στα δείγματα ζωοτροφών, ποσοστά δειγμάτων με 1, 2, 3 ή 4 αναλύτες ταξινομημένα ανά κατηγορία υποστρώματος

Τα δείγματα σανού μηδικής βρέθηκαν θετικά σε ποσοστό 31%, καλαμποκάλευρου 6,3% και των συμπυκνωμένων ζωοτροφών 1,5%. Στην πλειοψηφία των αναλυθέντων δειγμάτων ανιχνεύτηκε η παρουσία μιας ουσίας (**Σχήμα 7.3**). Εξαιρέση αποτελούν τα δείγματα βαμβακόπιτας στα οποία ανιχνεύτηκαν περισσότερες από δυο ουσίες με την πλειονότητα των δειγμάτων να είναι θετικά για τέσσερις.

Οι συγκεντρώσεις της AFB₁ υπερβαίνουν τα ανώτατα επιτρεπτά όρια¹⁶⁸ (5μg/kg) της Ε.Ε. με μέσο όρο συγκεντρώσεων στην βαμβακόπιτα 70.71 μg/kg. Η παρουσία AFB₁ σε ζωοτροφές αποτελεί πρόβλημα και σε άλλες χώρες όπως η Τουρκία (6.81 μg/kg), Νότιο Βιετναμ (10.88 μg/kg), Βόρεια Ασία (35 μg/kg), Νοτιο-Ανατολική Ασία (38 μg/kg), Νότια Ασία (52 μg/kg), Ωκεανία (52 μg/kg), και Ινδία (412 μg/kg)¹⁶⁹.

Δεν έχει ακόμα θεσπιστεί νομοθετικό όριο για την παρουσία της AFG₂ στις ζωοτροφές. Η παρουσία αφλατοξινών έχει μελετηθεί από τους Cavallarini et al. (2010)¹⁷⁰ σε καλαμποκάλευρο κατά τους οποίους η παρουσία των AFG₂ και AFB₂ ήταν πιο έντονη σε σχέση με τις AFB₁ και AFG₁.

Ομοίως, δεν έχει θεσπιστεί ακόμα νομοθετικό όριο για την T-2 τοξίνη στις ζωοτροφές, λόγω των περιορισμένων ευρημάτων της σε ζωοτροφές¹⁷¹. Οι συγκεντρώσεις της T-2 τοξίνης στην βαμβακόπιτα κυμαίνονταν από 8 έως 562 μg/kg. Η παρουσία της τοξίνης αυτής έχει πιστοποιηθεί σε δείγματα ζωοτροφών της Τουρκίας (2.24-132.2 μg/kg)¹⁶⁹, Ουγγαρίας¹⁷² (50-980 μg/kg), Βόρειας (137μg/kg), Κεντρικής (190 μg/kg) και Νότιας Ευρώπης (30 μg/kg)³⁵.

Οι συγκεντρώσεις της ΟΤΑ δεν υπερέβησαν τα ανώτατα επιτρεπτά όρια (250μg/kg)¹⁷¹ της Ε.Ε. με μέσο όρο συγκεντρώσεων στη βαμβακόπιτα και το καλαμποκάλευρο 70.71 και 17 μg/kg αντιστίχως. Αντίστοιχα ευρήματα έχουν παρατηρηθεί σε ζωοτροφές από σόγια (2.61 - 5.12 μg/kg) και ηλιόλευρα (2,24-3,82 μg/kg) στη Σερβία¹⁷³ και σε καλαμποκάλευρο (17 μg/kg)¹⁷⁴.

Η επιλογή των δειγμάτων γάλακτος εστιάστηκε στα αποτελέσματα των αναλύσεων των δειγμάτων ζωοτροφών. Τα επιλεγθέντα δείγματα γάλακτος (τριαντατρία από τα ογδονταπέντε που αρχικά συλλέχτηκαν) προέρχονται από τα ζώα που διατρέφονταν με τις συγκεκριμένες ζωοτροφές στις οποίες ανιχνεύτηκε η παρουσία μυκοτοξινών. Στα δείγματα γάλακτος, πέραν των εννέα αναλυτών, προσδιορίστηκαν (χρησιμοποιώντας την ίδια μέθοδο) και οι αναλύτες Aflatoxin M₁ (AFM₁) και Ochratoxin α (ΟΤα). Ο αναλύτης AFM₁ είναι ο κύριος ηπατικός μεταβολίτης της AFB₁ ενώ η ΟΤα ο κύριος μεταβολίτης της ΟΤΑ. Οι μεταβολίτες αυτοί αποβάλλονται από τον οργανισμό των ζώων μέσω των ούρων, κοπράνων και γάλακτος, με αποτέλεσμα η ένταξή τους στη μέθοδο του γάλακτος να κριθεί

αναγκαία. Από τις αναλύσεις προέκυψε ότι κανένα από τα δείγματα γάλακτος δεν βρέθηκε θετικό στην παρουσία υπολειμμάτων μυκοτοξινών ή μεταβολιτών τους.



Σχήμα 7.4. LC-TOF/MS χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος αφλατοξίνης B1 συγκέντρωσης 0,02mg/L σε διαλύτη (a) και δείγματος ζωοτροφής στην οποία ταυτοποιήται ουσία αφλατοξίνη B1 (b) Στα σχήματα (c) και (d) απεικονίζονται τα φάσματα των κορυφών της ουσίας αφλατοξίνης B1 στο πρότυπο (a) και στο δείγμα (b) αντίστοιχα.

7.14. Συμπεράσματα

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ξеноβιοτικών, η ανίχνευση των οποίων πραγματοποιείται με την υιοθέτηση ποικίλων τεχνικών που περιλαμβάνουν πολλαπλά στάδια επεξεργασίας δείγματος ή/και εξειδικευμένες διαδικασίες που αφορούν την ξεχωριστή απομόνωση ενός μόνο αναλύτη ή μιας κατηγορίας τους. Στη διατριβή αυτή αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια νέα, απλή, σύντομη, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ποικίλων κατηγοριών των μυκοτοξινών. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν δύο σύγχρονες-πρωτοπόρες στον τομέα της ενόργανης ανάλυσης διαφορετικές τεχνικές φασματομετρίας μαζών, η τεχνική του τριπλού τετραπόλου και του χρόνου πτήσης ιόντων. Η πρώτη εφαρμόστηκε αφενός για την ταυτοποίηση αφετέρου για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών, ενώ η δεύτερη αποκλειστικά για ταυτοποίηση. Η μέθοδος επικυρώθηκε με επιτυχία -σύμφωνα με τα ευρωπαϊκά πρότυπα- σε 2 διαφορετικά υποστρώματα (ζωοτροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και γάλα). Από τα συνολικά εξηνταέξι δειγμάτων ζωοτροφών και τριαντατριών δειγμάτων γάλακτος που αναλύθηκαν με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε έγινε δυνατή η ανίχνευση της παρουσίας υπολειμμάτων ποικίλων μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες που ανιχνεύτηκαν ήταν οι αφλατοξίνες B1, B2 G2, η ωχρατοξίνη A και η T-2 τοξίνη. Σε αρκετές περιπτώσεις ανιχνεύτηκε η παρουσία πάνω από μίας ουσίας ανά δείγμα σε συγκεντρώσεις άνω των Ανωτάτων Επιτρεπτών Ορίων όπως αυτά θεσπίζονται από την Ε.Ε.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Πίνακας Ι. Χημικές ομάδες, μεταπτώσεις, τάση του τριχοειδούς, ενέργεια θραυσματοποίησης, χρόνοι κατακράτησης και τα χρονικά παράθυρα των υπό μελέτη ξενοβιοτικών ουσιών σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS)

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
acephate	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	184	143	10	20	184	125	16	25	1.0	1+2+3
acetamiprid	Νεονικοτινοειδή	[M+H] ⁺	223	126	36	27	223	90	51	21	3.8	3+4+5
aldicarb	Καρβαμιδικό	[M+NH ₄] ⁺	208	89	10	20	208	116	10	20	5.3	5+6+7
aldicarb sulfone	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	240	148	40	15	240	86	25	25	1.4	1+2+3
aldicarb sulfoxide	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	207	89	42	18	207	132	40	15	1.2	1+2+3
ametryn	Τριαζίνη	[M+H] ⁺	228.1	186.2	36	25	228.1	96.1	36	35	9.4	9+10+11
atrazine	Τριαζίνη	[M+H] ⁺	216.1	174	21	25	216.1	103.9	21	27	8.2	8+9+10
azimsulfuron	Σουλφονυλουρία	[M+H] ⁺	425.1	182.1	31	23	425.1	156.1	31	43	7.4	7+8+9
azinphos methyl	Στρομπιλουρίνη	[M+H] ⁺	318	132.2	16	23	318	160.2	16	13	9.4	9+10+11
azoxystrobin	Στρομπιλουρίνη	[M+H] ⁺	404.1	371.9	36	19	404.1	343.9	36	29	9.8	9+10+11
benalaxyl	Ακυλαλανίνη	[M+H] ⁺	326.2	148.2	26	27	326.2	208.2	26	21	12.0	11+12+13
bensulfuron methyl	Σουλφονυλουρία	[M+H] ⁺	411.1	148.9	51	27	411.1	119	51	51	9.5	9+10+11
boscalid	Πυριδινοκαρβοξαμίδιο	[M+H] ⁺	343	307	71	27	343	140	76	27	10.2	10+11+12
bromuconazole	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	378	159	46	30	378	70	46	15	10.5	10+11+1

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
												2
buprofezin	-	[M+H] ⁺	306	116	40	21	306	201	40	17	14.2	14+15+1 6
cadusafos	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	271	215	35	15	271	159	45	25	10.0	10+11+1 2
carbaryl	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	202	145	40	15	202	127	40	50	7.6	7+8+9
carbofuran	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	222	123	25	40	222	165	25	25	6.8	6+7+8
carbofuran 3-Hydroxy	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	238	163	25	15	238	181	21	15	3.8	3+4+5
carbosulfan	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	381	118	45	30	381	118	45	30	16.8	16+17+1 8
chlorotoluron	Ουρία	[M+H] ⁺	213.1	72	36	33	213.1	140	36	33	8.1	8+9+10
clofentezine	Τετραζίνη	[M+H] ⁺	303	138	56	15.5	303	102	56	47	13.2	13+14+1 5
cyanazine	Τριαζίνη	[M+H] ⁺	241.1	214.1	41	23	241.1	104.1	41	41	6.5	6+7+8
cymoxanil	Ακεταμίδιο	[M+H] ⁺	199	128	46	13	199	111	41	25	4.4	4+5+6
demeton-s-methyl*	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	230,8	89	30	10,5	248	61	6	47	5.84	6+7+8
demeton-s-methyl sulfone	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	263	121	75	25	263	169	65	25	1.4	1+2+3
demeton-s-methyl sulfoxide	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	247	169	21	14	247	109	20	35	1.7	1+2+3
diazinon	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	305.1	169.1	21	29	305.1	96.6	21	41	12.1	12+13+1 4
dichlorvos	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	221	109	85	25	221	127	85	-	6.7	6+7+8

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
diethofencarb	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	268.1	226.1	31	15	268.1	180.1	31	23	9.6	9+10+11
difenoconazole	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	406.1	250.9	41	37	406.1	337	41	23	13.2	13+14+15
dimethoate	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	230	125	11	29	230	199	11	13	2.9	3+4+5
dimethomorph	Κυνναμικό οξύ	[M+H] ⁺	388	301	60	17	388	165	60	28	9.9	9+10+11
disulfoton	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	275	89	9	5					10.1	10+11+12
disulfoton-sulfone	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	307	153	65	15	307	261	65	15	7	7+8+9
disulfoton-sulfoxide	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	291	185	45	25	291	213	45	15	6.7	6+7+8
epoxiconazole	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	330.1	121	36	27	330.1	101.2	36	63	11.3	11+12+13
ethofumesate	Βενζοφουράνιο	[M+NH ₄] ⁺	304	121.1	36	27	304.1	161.2	36	31	9.8	9+10+11
ethoprophos	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	243	173	45	25	243	131	65	35	10.9	10+11+12+13
etoxazole	-	[M+H] ⁺	360	141	66	37	360	113	66	50	15.1	15+16+17
famoxadone	Στρομπιλουρίνη	[M+NH ₄] ⁺	392.2	238	16	23	392.2	330.9	16	15	12.9	12+13+14
fenamidone	Στρομπιλουρίνη	[M+H] ⁺	312	92	41	33	312	236	41	19	9.9	9+10+11
fenbuconazole	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	337	125	41	37	337	70	41	33	11.7	11+12+13
fenhexamide	Υδρόξυ ανιλίνη	[M+H] ⁺	302	97	35	25	302	55	35	35	11.1	11+12+13
fenoxycarb	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	302	116	21	12	302	88	21	20	11.9	11+12+13

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
fenpropimorph	Μορφολίνη	[M+H] ⁺	304	147.1	46	39	304.3	116.9	46	71	12.7	12+13+14
fenpyroximate	Πυραζόλη	[M+H] ⁺	422	366	15	20	422	135	16	41	15.5	15+16+17
fensulfothion	φαινυλο-οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	309	281	85	25	309	253	35	35	7.2	7+8+9
fensulfothion sulfone	μεταβολίτης	[M+H] ⁺	325	269	75	35	325	297	75	25	7.4	8+9+10
fensulfothion-oxon	μεταβολίτης	[M+H] ⁺	293	265	65	35	293	237	75	35	4.8	5+6+7
fensulfothion-oxon sulfone	μεταβολίτης	[M+H] ⁺	309	253	65	25	309	175	75	45	5.2	5+6+7
fenthion	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	279	169	21	23	279	247	41	10	13.0	12+13+14
fentin ^b	Οργανοκασσιτερούχο	[M+H] ⁺	347	193	115	45	347	116	115	45	10.2	
fipronil ^a	Φαινυλοπυραζόλη	[M-H] ⁻	435	330	31	17	435	250	31	36	9.3	
fipronil-desulfinyl ^a	μεταβολίτης	[M-H] ⁻	386,9	350,7	45	35					9.1	
flutriafol	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	302.1	122.9	41	39	302.1	109	41	43	8.6	8+9+10
fosthiazate	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	284	228	61	15	284	104	61	27	7.8	7+8+9
furathiocarb	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	383	195	51	23.5	383	252	51	19	13.9	13+14+15
haloxyfop ^c	Αρυλοξυ φαινοξυ προπιονικό οξύ	[M-H] ⁻	360	288	65	25	362	290	65	25	8.3	
haloxyfop ethoxyethylester	Αρυλοξυ φαινοξυ προπιονικός εστέρας	[M+H] ⁺	434	316	75	35	434	288	75	35	12.5	

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
c												
haloxyfop methoxyethylester	Αρυλοξυ φαινοξυ προπιονικός εστέρας	[M+H] ⁺	376	316	65	35	376	288	75	45	11.8	
hexaconazole	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	314	70	30	20	314	159	26	30	12.7	12+13+1 4
hexythiazox	Καρβοξαμίδιο	[M+H] ⁺	353	228	60	20	353	168	60	30	14.8	14+15+1 6
imidacloprid	Νεονικοτινοειδή	[M+H] ⁺	256	209	45	20	256	175	45	25	3.3	3+4+5
indoxacarb	Οξαδιαζίνη	[M+H] ⁺	528	218	40	38	528	293	40	14, 5	13.6	13+14+1 5
iprovalicarb	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	321	119	51	23	321	203	51	20	10.7	10+11+1 2
kresoxim methyl	Στρομπιλουρίνη	[M+H] ⁺	314.1	115.9	16	21	314.1	206.1	16	13	11.8	11+12+1 3
linuron	Ουρία	[M+H] ⁺	249	159.9	66	23	249	181.9	66	21	9.9	9+10+11
metalaxyl M	Ακυλαλανίνη	[M+H] ⁺	280.1	220	46	19	280.1	159.9	46	31	8.4	8+9+10
metconazole	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	320.1	69.4	48	23,,5	320.1	125	48	45	12.6	12+13+1 4
methamidophos	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	142	94	30	20	142	125	50	15	0.9	1+2+3
methiocarb	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	243	169	15	25	226	121	60	25	10.0	9+10+11
methiocarb sulfone	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	275	122	25	25	258	122	25	45	4.7	4+5+6
methiocarb sulfoxide	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	242	185	25	15	242	168	25	30	3.7	3+4+5
methomyl	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	163	88	8	8	163	106	15	10	1.8	1+2+3

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
methoxyfenozide	Διακύλ-υδραζίνη	[M+H] ⁺	369	149	36	23	369	133	41	31	10.7	10+11+1 2
metoxuron	Ουρία	[M+H] ⁺	229	156.1	26	31	229	72.1	26	35	5.6	5+6+7
monocrotophos	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	224	127	40	20	224	98	46	17	2.4	2+3+4
monolinuron	Ουρία	[M+H] ⁺	215.1	125.9	61	25	215.1	148	61	19	7.7	7+8+9
myclobutanil	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	289	125	36	41	289	70	36	33	10.7	10+11+1 2
nicosulfuron	Σουλφονουρία	[M+H] ⁺	411.1	182.1	61	25	411.1	213	61	23	6.8	6+7+8
omethoate	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	214	109	50	35	214	125	50	30	0.9	1+2
oxamyl	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	237	72	36	15	237	90	36	15	1.4	1+2+3
phosalone	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	367.9	182	41	25.5	367.9	110.9	41	24	12.9	12+13+1 4
phosmet	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	317.9	133.1	31	49	317.9	160.1	31	19	9.4	9+10+11
pirimicarb	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	239.1	72.1	16	31	239.1	181.9	16	21	7.6	7+8+9
pirimiphos methyl	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	306.1	164.1	26	29	306.1	108.1	26	39	12.6	12+13+1 4
primisulfuron methyl	Σουλφονουρία	[M+H] ⁺	376	308	16	17	376	266	31	23	12.7	12+13+1 4
procloraz	Ιμιδάζόλη	[M+H] ⁺	373	303	40	20	373	97	30	30	13.8	13+14+1 5
profenofos	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	373	303	40	20	373	97	30	30	13.8	13+14+1 5
propamocarb	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	189	102	16	23	189	144	16	17	1.2	1+2+3
propargite	-	[M+H] ⁺	368	231	30	10	368	175	1	21	15.2	15+16+1 7

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
pymethroline	Πυριδίνη	[M+H] ⁺	218	105	56	27	218	79	51	47	1.8	1+2+3
pyraclostrobin	Στρομπιλουρίνη	[M+H] ⁺	388	163	11	29	388	194	6	19	12.7	12+13+14
pyridaben	-	[M+H] ⁺	365	309	26	12.5	365	148	64	33.5	16.2	16+17+18
pyrifenoxy	Πυριδίνη	[M+H] ⁺	295	93.1	16	31	295	263.1	16	25	11.3	11+12+13
pyrimethanil	Ανιλνοπυριμιδίνη	[M+H] ⁺	200	107	30	30	200	82	30	30	9.4	9+10+11
pyriproxyfen	-	[M+H] ⁺	322	96	15	21	322	185	11	29	14.6	14+15+16
quinoxifen	Κινολίνη	[M+H] ⁺	308	197	50	40	308	162	25	50	14.7	14+15+16
simazine	Τριαζίνη	[M+H] ⁺	202.1	124.2	26	25	202.1	132.2	26	27	6.7	6+7+8
spinosad (A)	Σπινοσίνη	[M+H] ⁺	733	142	65	20	746	132	65	23	13.7	13+14+15
spiroxamine	Μορφολίνη	[M+H] ⁺	298	144	41	27	298	100	41	35	10.7	10+11+12
tebuconazole	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	308	70	30	20	308	125	30	35	12.1	12+13+14
tebufenozid	Διακύλ-υδραζίνη	[M+H] ⁺	353	133	40	20	353	297	40	16	11.9	11+12+13
tebufenpyrad	Πυραζόλη	[M+H] ⁺	334	145	25	30	334	117	51	47	14.0	13+14+15
terbufos	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	289	103,3	31	15	289	57	31	15	10.9	11+12+13+14
terbufos-sulfone	μεταβολίτης	[M+H] ⁺	321	171	65	15	321	265	65	15	7.7	8+9+10

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
terbufos-sulfoxide	μεταβολίτης	[M+H] ⁺	305	187	45	15	305	131	35	35	7.7	8+9+10
terbutylazine	Τριαζίνη	[M+H] ⁺	230.1	174.1	44	23	230.1	103.9	44	43.5	9.8	9+10+11
tetraconazole	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	372	159	40	40	372	70	36	45	11.5	11+12+13
thiacloprid	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	253	126	81	29	253	186	76	19	5.2	5+6+7
thiamethoxam	Νεονικοτινοειδή	[M+H] ⁺	292	211	51	17	292	181	56	31	2.2	2+3+4
thiodicarb	Καρβαμιδικό	[M+H] ⁺	355	108	30	25	355	88	30	25	8.1	8+9+10
thiophanate methyl	Βενζιμιδαζόλη	[M+H] ⁺	343	151	40	25	343	192	40	21	6.9	6+7+8
tolyfluanid	Σουλφάμίδιο	[M+NH ₄] ⁺	364	237.9	6	19	364	137.1	6	37	12.2	12+13+14
triadimefon	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	294	197	28	21	294	225	28	21	10.5	10+11+12
triadimenol	Τριαζόλη	[M+H] ⁺	296	70	11	11	296	227	11	9	10.9	10+11+12
triazophos	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	314	119.1	36	47	314	162.1	36	25	10.9	10+11+12
trifloxystrobin	Στρομπιλουρίνη	[M+H] ⁺	409	186	11	23	409	206	6	21	13.4	13+14+15
vamidothion	Οργανοφωσφορικό	[M+H] ⁺	288	146	10	30	288	118	10	40	3.9	3+4+5
1-naphthylacetic acid	φυτορμόνες	[M-H] ⁻	185	141	48	8	185	142	48	8	6.78	
2.4-D	φυτορμόνες	[M-H] ⁻	218.6	161	48	11.5	218.6	125	48	26.5	7.20	
2iP [N6-(3-methylbut-2-	φυτορμόνες	[M+H] ⁺	204	136	48	8	204	149	48	8	3.78	

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
enyl)adenine]												
2-naphtnoxyacetic acid	φυτορμόνες	[M-H]-	201	143	48	13	201	115	48	38.5	7.73	
4-Chlorophenoxyacetic acid	φυτορμόνες	[M-H]-	185	127	65	15	187	129	45	15	6.78	
6-benzyladenine	φυτορμόνες	[M-H]-	224	133	48	15	224	117	64	38	4.90	
chlormequat	φυτορμόνες	[M+H]+	122	58	36	37	124	58	36	37	0.66	
forchlorfenuron	φυτορμόνες	[M+H]+	248	129	65	15	248	155	65	15	8.16	
forchlorfenuron	φυτορμόνες	[M-H]-	246	127	65	15	246	91	65	30	8.16	
gibberellic acid	φυτορμόνες	[M-H]-	345	239	65	15	345	143	75	35	2.65	
IBA	φυτορμόνες	[M-H]-	201	158	72	13	201	116	72	16	4.36	
mefluidide	φυτορμόνες	[M-H]-	309	176	76	24	309	133	76	28	7.15	
mefluidide	φυτορμόνες	[M+H]+	311	121	80	36.5	311	178	80	14	7.15	
mepiquat	φυτορμόνες	[M+H]+	114	58	53	20	114	98	53	21	0.66	
prohexadione	φυτορμόνες	[M-H]-	211	123	60	13.5	211	167	60	8.5	5.37	
Thidiazuron	φυτορμόνες	[M+H]+	221	102	48	8	221	128	48	8	7.26	
thidiazuron	φυτορμόνες	[M-H]-	219	71	48	8	219	100	48	8	7.26	
Aflatoxin B1	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	313	285	130	45	313	241	130	20	6,25	
Aflatoxin B2	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	315	287	140	20	315	259	140	20	5,91	
Aflatoxin G1	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	329	243	130	20	329	283	130	20	5,57	
Aflatoxin G2	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	331	245	140	20	331	275	140	20	4,7	
Diacetoxyscirpenol (DAS)	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	384	307	180	5	384	289	180	5	5,9	

Αναλύτες	Χημική ομάδα	Ιον προσθήκης	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Τάση τριχοειδούς (V)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
Ochratoxin A (OTA)	Μυτοτοξίνες	[M-H]-	402	358	120	25	402	167	120	25	7,75	
Ochratoxin A (OTA)	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	404	239	60	19	404	241	60	20	7,75	
Toxin HT-2	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	447	345	180	25	447	285	180	25	6,9	
Toxin T-2	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	484,4	305	110	5	484,4	245	110	5	7,3	
zearalenone (ZON)	Μυτοτοξίνες	[M+H]+	319	187	100	20	319	185	100	20	7,88	

Πίνακας II. Χημικές ομάδες, μεταπτώσεις, ενέργεια θραυσματοποίησης, χρόνοι κατακράτησης και τα χρονικά παράθυρα των υπό μελέτη ξενοβιοτικών ουσιών σε σύστημα αέριας χρωματογραφίας φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου (GC-MS/MS)

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
aclonifen	Διφαινυλ αιθέρας	212	182	10	264	182	25	24,76	22+23+24
acrinathrin	Πυρεθρίνη	181	152	15	208	181	15	35,1	30+31+32
aldrin	Οργανοχλωριωμένο (Κυκλοδιένιο)	263	192	25	293	257	10	15,7	15+16+17
BHC α	Οργανοχλωριωμένο	219	183	15	219	145	15	10,29	10+11+12
BHC β	Οργανοχλωριωμένο	219	183	15	219	145	15	11,13	10+11+12
bifethrin	Πυρεθρίνη	181	166	10	181	115	40	31	26+27+28
bitertanol A	Τριαζόλη	170	141	15	141	115	15	28,67	28+29+30
bitertanol B	Τριαζόλη	170	141	15	141	115	15	28,78	28+29+30
bromopropylate	-	341	183	15	341	185	15	30,9	26+27+28
chlordan a	Οργανοχλωριωμένο	373	266	15	373	301	15	19,24	18+19+20

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
	(Κυκλοδιένιο)								
chlorpropham	Καρβαμιδικό	213	127	15	127	65	15	9,46	9+10+11
cyfluthrin	Πυρεθρίνη	206	151	16	226	206	12	29,23+29,33+29,4+29,4 4	28+29+30+31
cypermethrin	Πυρεθρίνη	181	152	20	181	127	20	29,6+29,7+29,77+29,82	29+30+31+32
DDD pp	Οργανοχλωριωμένο	235	165	15	235	200	15	24,25	22+23+24
DDE pp	Οργανοχλωριωμένο	246	176	15	318	248	15	21,5	19+20+21
DDT pp	Οργανοχλωριωμένο	235	165	15	235	200	15	27,098	24+25+26
deltamethrin	Πυρεθρίνη	253	93	15	253	172	15	36,5	31+32+33
dicofol op	Οργανοχλωριωμένο	139	75	25	139	111	10	16,557	14+15+16
dicofol pp	Οργανοχλωριωμένο	139	111	15	139	75	15	16,7	16+17+18
dieldrin	Οργανοχλωριωμένο (Κυκλοδιένιο)	279	243	15	344	263	15	20,4	20+21+22
endosulfan a	Οργανοχλωριωμένο	195	125	18	241	206	15	20,043	18+19+20
endosulfan b	Οργανοχλωριωμένο	195	125	20	241	206	15	23,9	22+23+24

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Ενέργεια θραυσματοποίησης	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Ενέργεια θραυσματοποίησης	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
				(eV)			(eV)		
endosulfan sulfate	Οργανοχλωριωμένο	272	237	15	241	206	10	26,643	24+25+26
endrin	Οργανοχλωριωμένο	263	193	15	263	191	15	21,748	18+19+20+21+22+23
esfenvalerate	Πυρεθρίνη	167	125	15	181	152	15	35.38	30+31+32
fenprothrin	Πυρεθρίνη	181	152	15	265	210	15	32.6+32.8	27+28+29
fenvalerate	Πυρεθρίνη	167	125	15	181	152	15	35.66	30+31+32
heptachlor	Οργανοχλωριωμένο (Κυκλοδιένιο)	272	237	15	339	267	15	14	18+19+20
hexachlorobenzene	Οργανοχλωριωμένο	283	248	15	285,8	213,8	15	10,3	10+11+12+18+19+20
lambda cyhalothrin	Πυρεθρίνη	181	141	20	181	152	40	26,957	26+27+28
lindane	Οργανοχλωριωμένο	181	145	15	219	183	15	11,37	11+12+13
methidathion	Οργανοφωσφορικό	240	180	15	240	93	15	7,6	7+8+9
methidathion	Οργανοφωσφορικό	145	85	15	145	58	15	19,12	19+20+21
parathion methyl	Οργανοφωσφορικό	263	109	15	263	79	15	13,33	13+14+15

Αναλύτης	Χημική ομάδα	Μετάπτωση Ποσοτικοποίησης		Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)	Μετάπτωση Ταυτοποίησης		Ενέργεια θραυσματοποίησης (eV)	RT (λεπτά)	Χρονικό παράθυρο
permethrin	Πυρεθρίνη	183	153	15	183	168	15	33.4+33.5	28+29+30
propachlor	Χλωροακεταμίδιο	176	57	15	130	77	15	8,775	8+9+10
propyzamide	Βενζαμίδιο	173	145	15	173	109	15	11,5	11+12+13
quintozene	Οργανοχλωριωμένο	295	237	15	237	119	15	11,2	11+12+13
tau-fluvalinate	Πυρεθρίνη	250	55	15	250	200	15	30,787	30+31+32
tetradifon		227	199	15	356	159	15	27,5	27+28+29
vinclozolin	Δικαρβοξαμίδιο	212	172	15	285	212	15	13,57	13+14+15

Πίνακας III. Χημικές ομάδες, μεταπτώσεις, ενέργεια θραυσματοποίησης, χρόνοι κατακράτησης και τα χρονικά παράθυρα των υπό μελέτη ξενοβιοτικών ουσιών σε σύστημα υγρής χρωματογραφίας φασματομετρίας μαζών χρόνου πτήσης ιόντων (LC-TOF/MS)

Αναλύτης	Συντακτικό τύπος μοριακού ιόντος	Ιόν προσθήκης	Ακριβή μάζα ιόντος	RT (λεπτά)
1-naphthylacetic acid	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	[M-H] ⁻	185,0608	6.78
2iP [N6-(3-methylbut-2-enyl)adenine]	C ₁₀ H ₁₃ N ₅	[M+H] ⁺	204,1244	3.78
2-naphthoxyacetic acid	C ₁₂ H ₁₀ O ₃	[M-H] ⁻	201,0557	7.73
4-Chlorophenoxyacetic acid	C ₈ H ₇ ClO ₃	[M-H] ⁻	185,0011	6.78
6-benzyladenine	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	[M-H] ⁻	224,0942	4.9
forchlorfenuron	C ₁₂ H ₁₀ ClN ₃ O	[M+H] ⁺	248,0585	8.16
gibberellic acid	C ₁₉ H ₂₂ O ₆	[M-H] ⁻	345,1344	2.65
IBA	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	[M-H] ⁻	202,0874	4.36
mefluidide	C ₁₁ H ₁₃ F ₃ N ₂ O ₃ S	[M+H] ⁺	311,0672	7.15
prohexadione	C ₁₀ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	211,0612	5.37
thidiazuron	C ₉ H ₈ N ₄ OS	[M+H] ⁺	221,0492	9.05
2.4-D	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	[M-H] ⁻	218,9621	7.2
chlormequat	C ₅ H ₁₃ ClN	[M+H] ⁺	123,0809	0.66
mepiquat	C ₇ H ₁₆ N	[M+H] ⁺	115,1356	0.66
Aflatoxin B1	C ₁₇ H ₁₃ O ₆	[M+H] ⁺	313,071215	8,6
Aflatoxin B2	C ₁₇ H ₁₅ O ₆	[M+H] ⁺	315,086865	7,9
Aflatoxin G1	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	[M+H] ⁺	329,06613	7,4
Aflatoxin G2	C ₁₇ H ₁₅ O ₇	[M+H] ⁺	331,08178	5,8
Diacetoxyscirpenol (DAS)	C ₁₉ H ₂₇ O ₇	[M+H] ⁺	367,17568	7,5
Ochratoxin A (OTA)	C ₂₀ H ₁₉ ClNO ₆	[M+H] ⁺	404,090092	11,9
Toxin HT-2	C ₂₂ H ₃₃ O ₈	[M+H] ⁺	425,217545	11,8
Toxin T-2	C ₂₄ H ₃₅ O ₉	[M+H] ⁺	467,22811	13,1
Zearalenone (ZON)	C ₁₈ H ₂₄ O ₅	[M+H] ⁺	320,16237	13,2

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1 Γαλανός Ε., Μπαλαμπάνη Α., Σφαλαγκάτου Π., Φισκατλωρης Ε. (1999) "Υγιεινή και ασφάλεια τροφίμων", Τ.Ε.Ε. Β' Τάξη 1ου κύκλου, Τομέας Γεωπονίας, Τροφίμων και περιβάλλοντος. Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων, Παιδαγωγικό Ινστιτούτο. Κεφ. 1, σελ.15.
- 2 Κώδικας Τροφίμων και Ποτών, βρίσκεται στην ιστοσελίδα:http://www.gcs1.gr/index.asp?a_id=99&txt=y&show_sub=1, πρόσβαση στις:02/01/2012.
- 3 ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 178/2002 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 28ης Ιανουαρίου 2002 για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφαλείας των τροφίμων. (Επίσημη εφημερίδα αριθ. L 31 της 1/2/2002.
- 4 ΟΔΗΓΙΑ 2006/141/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 22ας Δεκεμβρίου 2006 σχετικά με τα παρασκευάσματα για βρέφη και τα παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας και την τροποποίηση της οδηγίας 1999/21/ΕΚ.
- 5 ΟΔΗΓΙΑ 2006/125/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 5ης Δεκεμβρίου 2006 για τις μεταποιημένες τροφές με βάση τα δημητριακά και τις παιδικές τροφές για βρέφη και παιδιά μικρής ηλικίας.
- 6 Παπανικολάου Γ. (1982), "Σύγχρονη διατροφή και Διαιτολογία. Διαιτά για όλες τις παθήσεις", Λορεντζο ντετζιορτζιο, Κεφ. 11.
- 7 Ζαμπέλας Αν. (2003), "Η διατροφή στα στάδια της ζωής". Ιατρικές εκδόσεις Πασχαλίδης.
- 8 Dobbing και Sands, (1973) in Παπανικολάου Γ. (1982), «Σύγχρονη διατροφή και Διαιτολογία. Διαιτά για όλες τις παθήσεις». ΛΟΡΕΝΤΖΟ ΝΤΕΤΖΙΟΡΤΖΙΟ, Κεφ. 11, σελ. 217.
- 9 Brook at el (1972), Salans et al (1973) in Παπανικολάου Γ. (1982), «Σύγχρονη διατροφή και Διαιτολογία. Διαιτά για όλες τις παθήσεις». ΛΟΡΕΝΤΖΟ ΝΤΕΤΖΙΟΡΤΖΙΟ, Κεφ. 11, σελ. 217
- 10 Fomon S.J. (1974) "Nutritional requirements in relation to growth", Monatschr Kinderheilkd 122(5):236-9 in Παπανικολάου Γ. (1982), «Σύγχρονη διατροφή και Διαιτολογία. Διαιτά για όλες τις παθήσεις». ΛΟΡΕΝΤΖΟ ΝΤΕΤΖΙΟΡΤΖΙΟ, Κεφ. 11, σελ. 217.
- 11 Davis, N.D., και Diener U.L. (1987) "Mycotoxins" in: L.R. Beuchat (Ed.) "Food and Beverage Mycology", 2nd FA., Van Nostrand Reinhold, New York, pp. 517-570.
- 12 DHSS (1975), in Παπανικολάου Γ. (1982), «Σύγχρονη διατροφή και Διαιτολογία. Διαιτά για όλες τις παθήσεις ». ΛΟΡΕΝΤΖΟ ΝΤΕΤΖΙΟΡΤΖΙΟ, Κεφ. 11, σελ. 235.
- 13 Fox M.K., Pac S., Devaney B., Jankowski L. (2004) "Feeding Infants and Toddlers Study: What foods are infants and toddlers eating?" J Am Diet Assoc. 104(1):22-30.
- 14 Briefel, R., Reidy K., Karwe V., Devaney B. (2004) "Feeding Infants and Toddlers Study: Improvements Needed in Meeting Infant Feeding Recommendations", J Am Diet Assoc. 104:31-37.
- 15 Skinner J. D., Ziegler P., Pac S., Devaney B. (2004) "Meal and Snack Patterns of Infants and Toddlers", J Am Diet Assoc. 104:65-70.
- 16 European Union (2010), "SPECIAL EUROBAROMETER, Food-related risks', Issue

- 354.
- 17 ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΚ) αριθ. 178/2002 ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 28^{ης} Ιανουαρίου 2002 για τον καθορισμό των γενικών αρχών και απαιτήσεων της νομοθεσίας για τα τρόφιμα, για την ίδρυση της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων και τον καθορισμό διαδικασιών σε θέματα ασφαλείας των τροφίμων. (Επίσημη εφημερίδα αριθ. L 31 της 1/2/2002).
 - 18 ISO 22000:2005, Food safety management systems -- Requirements for any organization in the food chain.
 - 19 Bhatnagar D., Payne G.A., Cleveland T.E., Robens J.F. (2004) "Mycotoxins: current issues in USA" in: Barug D., Egmond H.V., Lopez-Garcia R., Osenbruggen T.V., Visconti A. (Eds.), Meeting the Mycotoxin Menace. Wageningen Academic Publishers, ISBN 9076998280, pp. 17–47.
 - 20 Bennet, J.W., Klich, M. (2003) "Mycotoxins", Clin. Microbiol. Rev. 16 (3), 497–516.
 - 21 D'Mello J.P.F., MacDonald A.M.C. (1997), "Mycotoxins", Animal Feed Science and Technology 69:155–166.
 - 22 Culvenor C.C.J., Edgar J.A., Mackay M.F., Gorst- Allman C.P., Marasas W.F.O., Steyn P.S., Vleggaar R. and Wessels P.L. (1989) "Structure elucidation and absolute configuration of phomopsis A, a hexapeptide mycotoxin produced by *Phomopsis leptostromiformis*", Tetrahedron 45:2351-2372.
 - 23 CAST (1989) "Mycotoxins, Economic and health risks",. Council of Agricultural Science and Technology (CAST), Task Force Rep. No. 116, CAST, Ames, IA, pp.92.
 - 24 Jelinek C.F., Pohland A.E. και Wood G.E. (1989) "Worldwide occurrence of mycotoxins in foods and feeds -- an update", J. Assoc. Off. Anal. Chem., 72: 223-230.
 - 25 Kuiper-Goodman T. (1991) "Risk assessment to humans of mycotoxins in animal-derived food products". Vet. Hum. Toxicol. 33(4):325-333.
 - 26 Steyn P.S. (1995) "Mycotoxins, general view, chemistry and structure", Toxicology Letters 82-83:843-851.
 - 27 Diener U.L., Cole R.J., Sanders T.H., Payne G.A., Lee L.S., Klich M.A. (1987), "Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*", Ann. Rev. Phytopathol. 25, 249–270.
 - 28 Kilman S., (1989) "Spreading Poison", Wall street Journal, 23 February p.i.
 - 29 McDonald D., Mehan V.K., Hall S.D. (1989) "Aflatoxin contamination of groundnuts", Proceedings of the International Workshop, 1-9 Oct. 1987, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropic (ICRIST), Patancheru, A.P. 502 324, India, pp.423.
 - 30 Van Egmond H.P. (1989) "Mycotoxins in Dairy Products", Elsevier, New York, pp.272.
 - 31 Marquardt R.R., Frohlich A.A. (1992) "A review of recent advances in understanding ochratoxicosis", J. Anim. Sci. 70 (12): 3968–3988.
 - 32 Chu F.S. (1977) "Recent studies on ochratoxin", CRC Crit. Rev. Toxicol., 2, 499-524.
 - 34 Kiessling, K.H. (1986) "Biochemical mechanism of action of mycotoxins", Pure

- Appl. Chem., 58:327-338.
- 35 Binder E.M. (2007) "Managing the risk of mycotoxins in modern feed production", *Animal Feed Science and Technology* 133: 149–166.
- 36 Fuchs E., Handl J., Binder, E.M. (2004) "LC–MS/LC–UV analysis of type-A and -B trichothecenes after multifunctional MycoSep® clean-up". in Yoshizawa, T. (Ed.), *New Horizon of Mycotoxicology for Assuring Food*.
- 37 Weidenborner M. (2001). "Encyclopedia of Food Mycotoxins". Springer-Verlag, Berlin.
- 38 Rotter B.A., Prelusky D.B., Pestka J.J. (1996) "Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin)", *J. Toxicol. Environ. Health A* 48 (1): 1–34.
- 39 Eriksen G.S., Pettersson H. (2004) "Toxicological evaluation of trichothecenes in animal feed". *Anim. Feed Sci. Technol.* 114 (1–4): 205–239.
- 40 Shier W.T. (1998) "Estrogenic mycotoxins", *Rev. Med. Vet.* 149 (6):599–604.
- 41 King B. (1979) "Outbreak of ergotism in Wollo" Ethiopia. *Lancet.* 1(8131):1411.
- 42 Lacey J. (1991) "Natural occurrence of mycotoxins in growing and conserved forage crops" in J.E. Smith and R.S. Henderson (Eds.), *Mycotoxins and Animal Foods*, CRC Press, Boston, pp. 363-397.
- 43 Bezuidenhout S.C., Gelderblom W.C.A., Gorst-Allman C.P., Horak R.M., Marasas W.F.O., Spiteller G., Vlegaar R. (1988) "Structure elucidation of the fumonisins, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 743–745.
- 44 Colvin B.M., Harrison L.R., (1992) "Fumonisin-induced pulmonary edema and hydrothorax in swine", *Mycopathologia* 117 (1–2): 79–82.
- 45 Bhandari N., Brown C.C., Sharma R.P. (2002) "Fumonisin B1-induced localized activation of cytokine network in mouse liver", *Food Chem. Toxicol.* 40 (10): 1483–1491.
- 46 Dombrink-Kurtzman M.A., (2003) "Fumonisin and beauvericin induce apoptosis in turkey peripheral blood lymphocytes", *Mycopathologia* 156 (4): 357–364.
- 47 Πασπάτης Ε. (1998) "Φυτορυθμιστικές ουσίες (Φυτοορμόνες)", Αθήνα: Agrotypos A.E. σελ. 467.
- 48 Moore (1979) "Biochemistry and physiology of plant hormones", Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin pp.274.
- 49 Μπαλλαγιαννης Π. (1985) "Μαθήματα Γεωργικής Φαρμακολογίας", Εκδόσεις Γ.Π.Α.
- 50 Hassall K.A. (1990) "The Biochemistry & uses of pesticides", Macmillan Press Ltd: Hong Kong.
- 51 Pecsok R.L. (1980) "Σύγχρονες μέθοδοι στη χημική ανάλυση" 2η έκδοση, Πνευματικός, Αθήνα.
- 52 Ευσταθίου Κ.Η., Χατζηϊωάννου Θ.Π. "Ενόργανες Τεχνικές Αναλύσεως", Επ. εκδόσεις Ανατολικής Χημείας.
- 53 Skoog D., Holler J.F., Nieman T.A. (2002) "Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης", Κωσταράκης, p.g. 984.
- 54 European Commission (2007), Document No. SANCO/2007/3131, "Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed", Available at: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Accessed in: 11/1/2008.

- 55 European Commission (2009), Document No. SANCO/10684/2009, "Method Validation And Quality Control Procedures For Pesticide Residues Analysis In Food And Feed", Available at: http://ec.europa.eu/food/plant/protection/resources/qualcontrol_en.pdf. Accessed in: 11/7/2010.
- 56 EURACHEM/CITAC Guide (2000) "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement", 2η έκδοση.
- 57 National Research Council (1993) "Pesticides in the Diets of Infants and Children" p.g 13-17.
- 58 European Communities (2009). "Foods for Infants & Young Children" available in: http://ec.europa.eu/food/food/labellingnutrition/children/index_en.htm. accessed in 14/12/2009.
- 59 ΟΔΗΓΙΑ 91/321/EC and its subsequent revisions. i.e.. 1999/50/EC, European Union Directive 96/5/EC and its subsequent revisions, i.e., 1999/39/EC, European Union Directives 2003/13/EC. 2003/14/EC, 2006/125/EC and 2006/141/ EC
- 60 Kim Dal Ho. (1998) "Determination of organophosphorus pesticides in wheat flour by supercritical fluid extraction and gas chromatography with nitrogen– phosphorus detection" *Journal of Chromatography A*, 824: 63–70.
- 61 Anagnostopoulos C.J., Miliadis G.E. (2009) "Method validation for the determination of pesticide residues in wheat flour by gas chromatography", *Hellenic Plant Protection Journal* 2: 15-22.
- 62 Working Group (1996) "Development and Improvement of Residue-analytical methods", *Analytical Methods for Pesticide Residues in Foodstuffs*. 6th Edition Part I: Multiresidue methods. Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Netherlands.
- 63 Schenck F.J., King V.H. (2002) "Determination of organochlorine and organophosphorus pesticide residues in low moisture, nonfatty products using a solid phase extraction cleanup and gas chromatography", *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 35:1–12.
- 64 Wang J., Cheung W. (2006) "Determination of Pesticides in Soy-Based Infant Formula Using Liquid Chromatography with Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry", *Journal of AOAC International* 89: 214-224.
- 65 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 the Association of Official Analytical Chemists International*. 86: 412-431.
- 66 Lehotay S.J., Mastovska K., Schenck F.J. (2003) Abstracts of Papers, 225th ACS National Meeting.
- 67 Lehotay S.J., Mastovska K. (2004) Abstracts of Papers, 228th ACS National Meeting.
- 68 Walorczyk S. (2007) "Development of a multi-residue screening method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry". *Journal of Chromatography A* 1165: 200–212.
- 69 Payá P., Anastassiades M., Mack D., Sigalova I., Tasdelen B., José Oliva J., Barba A. (2007) "Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) pesticide multiresidue method in combination with

- gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection", *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 389: 1697-1714.
- 70 Anastassiades M, Tasdelen B, Scherbaum E, Stajnbaher D (2007), "Recent Developments in QuEChERS Methodology for Pesticide Multiresidue Analysis", In: Ohkawa H, Miyagawa H, Lee PW (eds), *Pesticide chemistry: Crop protection, public health, environmental safety*. Wiley-VCH, Weinheim.
- 70 Gil Garcia M.D., Martinez Vidal J.L., Martinez Galera M., Lopez Lopez T., Almansa Lopez E., Cuadros Rodriguez L. (2003) "Correction of the Matrix Effect in the Determination of Benzoylphenylurea Insecticides in Vegetables", *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 26: 297-316.
- 71 Hercegova A., Domotorova M., Matisova E. (2007) "Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination", *Journal of Chromatography A* 1153(1-2):54-73.
- 72 Hernandez F., Pozo O.J., Sancho J.V., Bijlsma L., Barreda M., Pitarch E. (2006). "Multiresidue liquid chromatography tandem mass spectrometry determination of 52 non gas chromatography-amenable pesticides and metabolites in different food commodities." *Journal of Chromatography A* 1109(2):242-52.
- 73 Cajka T, Hajslova J, (2004) "Gas chromatography–high-resolution time-of-flight mass spectrometry in pesticide residue analysis: advantages and limitations ", *Journal of Chromatography A*, 1058: 251-261.
- 74 Barcelo D., Fernandez-Alba A. (2005) "Comprehensive analytical chemistry: Chromatographic-mass spectrometric food analysis for trace determination of pesticide residues", Volume XLIII, Wilson & Wilson's, Amsterdam 2005.
- 75 Patel K., Fussell R.J., Goodall D.M., Keely B.J. (2004) "Evaluation of large volume-difficult matrix introduction-gas chromatography-time of flight-mass spectrometry (LV-DMI-GC-TOF-MS) for the determination of pesticides in fruit-based baby foods", *Food Additives & Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* 21: 658.
- 76 Wang J., Cheung W., Grant D. (2005) "Determination of pesticides in apple-based infant foods using liquid chromatography electronspray ionization mass spectrometry", *Journal of Agricultural and food chemistry*, 53: 528.
- 78 QuEChERS Method (including optional alkaline hydrolysis to release covalently bound compounds) - CRL for Single Residue Methods, accessed at: 10/11/2010.
- 79 Foods of plant origin (2007) "Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE – QuEChERS-method". CEN/TC 275, Date: 2007-01, TC 275 WI 00275154, Secretariat: DIN (Document type: European Standard, Document Stage: CEN Enquire).
- 80 Raikwar M.K., Nag S.K. (2003) "Organochlorine pesticide residues in animal feeds" in: *Proceedings of 40th Annual Convention of Chemists*. Indian Chemical Society, pp. 4.
- 81 Prasad K.S.N., Chhabra A. (2001) "Organochlorine pesticide residues in animal feeds and fodders", *Indian J. of Animal Sci.* 71 (12):1178-1180.
- 82 EFSA Journal (2005), "Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Endosulfan as undesirable substances in animal feed" 234: 1-29.
- 83 Pagliuca G., Gazzotti T., Zironi E., Sticca P. (2005) "Residue analysis of organophosphorus pesticides in animal matrices by dual column capillary gas

- chromatography with nitrogen-phosphorus detection" *J. Chromatogr. A* 1071:67.
- 84 Sharma H.R., Kaushik A., Kaushik C.P. (2007) "Pesticide Residues in Bovine Milk from a Predominantly Agricultural State of Haryana, India", *Environ. Monit. and Assessment* 129:349-357.
- 85 Nag S.K., Raikwar M.K. (2008) "Organochloride Pesticide Residues in Bovine Milk". *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 80:5-9.
- 86 Darko G., Acquah S.O. (2008) "Levels of organochloride pesticides residues in dairy products in Kumasi, Ghana", *Chemosphere* 71: 294-298.
- 87 Dikshit T.S.S., Kumar S.N., Raizada R.B., Srivastava M.K., (1989), "Organochlorine insecticide residues in cattle feed", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 43, 691-696.
- 88 Deka S.C., Barman N., Baruah A.A.L.H. (2004) "Monitoring of pesticide residues in feed, fodder and butter in Assam", *Pesticide Research J.* 16 (1): 86-89.
- 89 Imrankham M., Barman K., Atreja P.P. (2003) "Pesticide residues in food chain: threats and solutions". *Indian Dairyman*, 61-66.
- 90 MAFF-UK (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food in UK) 1998 Annual Report of the Working Party on Pesticides Residues: Supplement to the Pesticides Monitor 1999 MAFF Publications, p18.
- 91 Indraningsih M.S., Ladds C.S., P.W. (1993) "Residues of endosulfan in the tissue of lactating goats", *Australian Veterinary Journal* 70(2): 59-62.
- 92 Surendra N.B., Unnikrishnan V., Gayathri V., Chitra P.S., Preeja C.N., Ramamurthi M.K. (2000) "Organochlorine pesticide residues in animal tissues and their excretion through milk". *J. of Food Sci. and Technol.* 35 (6):547-548.
- 93 Nag S.K., Mahanta S.K., Raikwar M.K., Bhadoria B.K. (2007) "Residues in milk and production performance of goats following the intake of a pesticide (endosulfan)", *Small Rumin. Res.* 67:235-242.
- 94 Chauhan R., Singh Z., Dahiya B. (1982) "Organochlorine insecticides as food contaminants" in First International Conference on Food Science and Technology Bangalore, Abstract. No. 9 Section II, pp.5.
- 95 Kathpal T.S., Kumari B., Singh S., Singh J. (2001) "Multi-residue analysis of bovine and human milk in cotton growing belt of Haryana". in: Proceedings of the International conference on pesticides, environment, food security organized by Society of Pesticide Science, New Delhi India pp. 236-238.
- 96 Nag S.K., Raikwar M.K., (2003) "Monitoring of bovine milk for organochlorine pesticide residues in some parts of Bundelkhand region" in: Proceedings of 40th Annual Convention of Chemists. Indian Chemical Society p4.
- 97 FAO/WHO (2006) "Codex maximum limits for pesticides residues", Rome: Codex Alimentarius Commission FAO and WHO.
- 98 Zhong W., Xu D., Chai Z., Mao X. (2003) "2001 Survey of organochlorine in retail milk from Beijing, PR China", *Food Addit. Contam.* 20:254-258.
- 99 Salem N.M., Ahmad R., Estaitieh H. (2009) "Organochlorine pesticide residues in dairy products in Jordan", *Chemosphere* 77: 673-678.
- 100 Bakore P.J., Bhatnagar N. (2001) "Assessment of organochlorine pesticide residue levels in dairy milk and buffalo milk from Jaipur City, Rajasthan, India". *Environ. International* 26: 231-236.
- 101 ΕΣΥΔ, Κατευθυντήρια οδηγία για την επικύρωση μεθόδων προσδιορισμού υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε ευέλκτο πεδίο, ΕΣΥΔ ΚΟ-ΦΥΤΟΠΡΟΣΤ/01/01/6-6-2007.
- 102 Navas Diaz A., Garcia Pareja A., Garcia Sanchez F. (1997) "Liquid and Gas

- Chromatographic Multi-residue Pesticide Determination in Animal Tissues" *Pesticide Science*, 49(1): 56.
- 103 Ali M.S., White J.D., Bakowski R.S., Phillippo E.T. (1993) "Analyte stability study of N-methylcarbamate pesticides in beef and poultry liver tissues by liquid chromatography", *JAOAC* 76(6):1309-16.
- 104 Saito K., Sjødin A., Sandau C.D., Davis M.D., Nakazawa H., Matsuki Y., Patterson D.G. (2004) "Development of a accelerated solvent extraction and gel permeation chromatography analytical method for measuring persistent organohalogen compounds in adipose and organ tissue analysis", *Chemosphere* 57 373.
- 105 Rawn D.F.K., Roscoe V., Trelka R., Hanson C., Krakalovich T., Dabeka R.W. (2006) "N-methyl carbamate pesticide residues in conventional and organic infant foods available on the Canadian retail market, 2001-03", *Food Addit. Contam.* 23(7): 651-9.
- 106 Sannino A., Mambriani P., Bandini M., Bolzoni L. (1995) "Multiresidue method for determination of organophosphorus insecticide residues in fatty processed foods by gel permeation chromatography", *JAOAC* 78 1502.
- 107 Di Muccio A., Pelosi P., Attard Barbini D., Generali T., Ausili A., Vergori F. J. (1997) "Selective extraction of pyrethroid pesticide residues from milk by solid-matrix dispersion", *Journal of Chromatography A*, Vol 765(1):51-60.
- 108 Goulart S.M., deQueiros M.E.L.R., Neves A.A., deQueiros J.H. (2008) "Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection", *Talanta* 75:1320.
- 109 Bogialli S., Curini R., Di Cortia A., Laganó A., Nazzari M., Tonci M. (2004) "Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry.", *J. Chromatogr. A* 1054 351.
- 110 Argauer R.J., Eller K.I., Pfeil R.M., Brown R.T., (1997) "Argauer R.J., Eller K.I., Pfeil R.M., Brown R.T., (1997) *J. Agric. Food Chem.* 45:180.", *J. Agric. Food Chem.* 45:180.
- 111 Hong J., Kim H.-Y., Kim D.-G. , Seo J., Kim K.J. (2004) "Rapid determination of chlorinated pesticides in fish by freezing-lipid filtration, solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry." *J. Chromatogr. A* 1038 27.
- 112 Jones L.R., and Riddick J.A. (1952) "Separation of organic insecticides from plant and animal tissues", *Anal. Chem.*, 24 569.
- 113 Park J.-W., Abd El-Aty A.M., Lee M.-H., Song S.-O., Shim J.-H. "Residue analysis of organophosphorus and organochlorine pesticides in fatty matrices by gas chromatography coupled with electron-capture detection" *Z Naturforsch C.* 61(5-6):341-6.
- 114 Khay S., Abd El-Aty A.M., Choi J.-H., Shin E.-H., Shin H.-C., Kim J.-S., Chang B.-J., Lee C.-H., Shin S.-H., Jeong J.Y., Shim J.-H. (2009) "Simultaneous determination of pyrethroids from pesticide residues in porcine muscle and pasteurized milk using GC", *J. Sep. Sci.* 32 (2009) 244.
- 115 Venant A. , Van Neste E., Borrel S., Mallet J., (1990) "Determination of residues of deltamethrin in milk and butter", *Food Addit. Contam.* 7:117.
- 116 Szerletics M., Turi K., Soos, Vigh E. (2000) "Determination of residues of pyrethroid and organophosphorous ectoparasiticides in foods of animal origin." *Acta Vet. Hung.* 48: 139.

- 117 Klein A.K., Laug E.P., Tighe J.F., Ramsey L.L., Mitchell L.C., και Kunze F.M. (1956) "Biological Assay of Endrin in Leafy Vegetables and Its Confirmation by Paper Chromatography" *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 39: 242.
- 118 Mills P.A., (1959) "Detection and Semiquantitative Estimation of Chlorinated Organic Pesticide Residues in Foods by Paper Chromatography", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 42:734-740.
- 119 McKinley W.P., Mahon J.H. (1959) "Identification of Pesticide Residue in Extracts of Fruits, Vegetables, and Animal Fats. I. Chromatography", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 42:725.
- 120 Steinwandter H. (1982) "Contributions to silica gel application in pesticide residue analysis", *Fresenius J. Anal. Chem.* 312(4):342-345.
- 121 Holden A.V., και Marsden J. K. (1969) "Single-stage clean-up of animal tissue extracts for organochlorine residue analysis", *Journal of Chromatography A*, Vol 44:481-492.
- 122 Gillespie AM., και Walters S M. (1984) "Alumina blending technique for separation of pesticides from lipids.", *Assoc Off Anal.Chem.*, 67: 290.
- 123 Mitchell L.C., Kunze F.M. (1956) "Biological Assay of Endrin in Leafy vegetables", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 39:242.
- 124 Stanley R.L., και LeFavoure H.T. (1965) "Rapid Digestion and Cleanup of Animal Tissue for Pesticides Residue Analysis", *J Assoc. Off Anal. Chem.*, 48:666.
- 124 Walters S.M. (1990) "Clean-up techniques for pesticides in fatty foods", *Analytica Chimica Acta*, 236:77-82.
- 125 LeDoux M. (2011) "Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades", *Journal of Chromatography A*, 1218(8):1021-36.
- 125 Storherr R.W., Watts R. (1965) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 48:1154.
- 126 Doong R.-A., Lee C.-Y. (1999) "Determination of organochlorine pesticide residues in foods using solid-phase extraction clean-up cartridges", *Analyst* 124:1287.
- 127 Schenck F.J., Calderon L., Saudarg D.E. (1996) "Florisil solid-phase extraction cartridges for cleanup of organochlorine pesticide residues in foods", *JAOAC* 79(6):1454-8.
- 128 Rosenbaum L., Hieber T., Morgan J. (2004) "Determination of pesticides in composite dietary samples by gas chromatography/mass spectrometry in the selected ion monitoring mode by using a temperature-programmable large volume injector with pre-separation column", *JAOAC* 84(3):891-900.
- 129 Zhou R., Zhu L., Kong Q. (2008) "Levels and distribution of organochlorine pesticides in shellfish from Qiantang River, China", *J. Hazard. Mater.* 152:1192.
- 130 Stefanelli P., Santilio A., Cataldi L., Dommarco R. (2009) "Multiresidue analysis of organochlorine and pyrethroid pesticides in ground beef meat by gas chromatography-mass spectrometry", *J. Environ. Sci. Health B* 44: 350.
- 131 Attard Barbini D., Vanni F., Girolimetti S., Dommarco R. (2007) "Development of an analytical method for the determination of the residues of four pyrethroids in meat by GC-ECD and confirmation by GC-MS", *Anal. Bioanal. Chem.* 389(6): 1791-8.
- 132 Bielecki R. L. (1964) "The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues", *Analytical Biochemistry* 9(4): 431-442.
- 133 Hoyerová K., Gaudinová A., Malbeck J., Dobrev P. I., Kocábek T., Solcová B., Trávníčková A., Kamínek M. (2006) "Efficiency of different methods of extraction and purification of cytokinins". *Phytochemistry* 67(11): 1151-1159.

- 134 Dobrev P.I., Kamínek M. (2002) "Fast and efficient separation of cytokinins from auxin and abscisic acid and their purification using mixed-mode solid-phase extraction", *Journal of Chromatography A*, 950(1-2):21-29.
- 135 Horgan, R. (1978). "Analytical procedures for cytokinins", Vol. 4. Cambridge: Cambridge University Press.
- 136 Dobrev P. I., Havlíček L., Vágner M., Malbeck J., Kamínek M. (2005) "Purification and determination of plant hormones auxin and abscisic acid using solid-phase extraction and two-dimensional high performance liquid chromatography", *Journal of Chromatography A* 1075(1-2): 159-166.
- 137 Zhou R., Squires T. M., Ambrose S. J., Abrams S. R., Ross A. R. S., Cutler A. J. (2003) "Rapid extraction of abscisic acid and its metabolites for liquid chromatography-tandem mass spectrometry", *Journal of Chromatography A* 1010 (1):75-85.
- 138 Rolčík, J., Řečinská, J., Barták, P., Strnad, M., Prinsen, E. 2005. "Purification of 3-indolylacetic acid by solid-phase extraction", *Journal of Separation Science* 28(12): 1370-1374.
- 139 Müller A., Düchting P., Weiler E. (2002). "A multiplex GC-MS/MS technique for the sensitive and quantitative single-run analysis of acidic phytohormones and related compounds, and its application to *Arabidopsis thaliana*". *Planta* 216(1): 44-56.
- 140 Prinsen E., VanDongen W., Esmans E. L., Van Onckelen H. A. (1997) "HPLC Linked Electrospray Tandem Mass Spectrometry: A Rapid and Reliable Method to Analyse Indole-3-Acetic Acid Metabolism in Bacteria", *Journal of Mass Spectrometry* 32(1): 12-22.
- 141 Ma Z., Ge L., Lee A. S. Y., Yon, J. W. H., Tan S. N., Ong E. S. (2008) "Simultaneous analysis of different classes of phytohormones in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using high-performance liquid chromatography and liquid chromatography-tandem mass spectrometry after solid-phase extraction", *Analytica Chimica Acta* 610(2):274-281.
- 142 Hou S., Zhu J., Ding M., Lv G. (2008) "Simultaneous determination of gibberellic acid, indole-3-acetic acid and abscisic acid in wheat extracts by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry" *Talanta* 76(4): 798-802.
- 143 Izumi Y., Okazawa A., Bamba T., Kobayashi A., Fukusaki E. (2009) "Development of a method for comprehensive and quantitative analysis of plant hormones by highly sensitive nanoflow liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry". *Analytica Chimica Acta* 648(2): 215-225.
- 144 Novák O., Hauserová E., Amakorová P., Dolezal K., Strnad M. (2008) "Cytokinin profiling in plant tissues using ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry", *Phytochemistry* 69(11): 2214-2224.
- 145 Yu Z., Jin F., Hu J., Sun J., Yang M. (2010) "An improved method for analyzing chlormequat and mepiquat in source waters by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta* 678 (1):90-95.
- 146 Henriksen T., Juhler R.K., Brandt G., Kjær J. (2009) "Analysis of the plant growth regulator chlormequat in soil and water by means of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, pressurized liquid extraction, and solid-phase extraction". *Journal of Chromatography A* 1216: 2504-2510.
- 147 Liu H.-T., Li Y.-F., Luan T.-G., Lan, C.-Y., Shu W.-S. (2007) "Simultaneous

- Determination of Phytohormones in Plant Extracts using SPME and HPLC", *Chromatographia* 66(7): 515-520.
- 148 Tseng S.H., Liu C.C., Lin Y.J., Chen H.C., Su S.C., Chou H.K., Chou S.S., Shih Y.C. (2009) "Analysis of 81 Pesticides and Metabolite Residues in Fruits and Vegetables by Diatomaceous Earth Column Extraction and LC/MS/MS Determination", *Journal Of Food And Drug Analysis* 17: 319-332.
- 149 CRL for Single Residue Methods. 2007. Analysis of Acidic Pesticides in Wheat Flour Samples by LC-MS(/MS) using the QuEChERS Method (including optional alkaline hydrolysis to release covalently bound compounds). Available at: http://www.crl-pesticides.eu/library/docs/cf/acidicpesticides_wheat_quechers.pdf, accessed in: 02/ 6 /2009.
- 150 Vahl M., Graven A., Juhler R. K. (1998) "Analysis of Chlormequat residues in grain using liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS)", *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 361(8): 817-820.
- 151 Alder L., και Startin J. R. (2005) "Determination of chlormequat and mepiquat in foods by liquid chromatography/mass spectrometry or liquid chromatography/tandem mass spectrometry : Interlaboratory study", *Journal of AOAC International* 88(6):1762-76.
- 152 Mol H. G. J., vanDam R. C. J., Vreeken R. J., Steijger O. M. (1999). "Determination of daminozide in apples and apple leaves by liquid chromatography-mass spectrometry", *Journal of Chromatography A* 833(1):53-60.
- 153 Sitbon F., Ostin A., Sundberg B., Olsson O., Sandberg G. (1993) "Conjugation of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in Wild-Type and IAA-Overproducing Transgenic Tobacco Plants, and Identification of the Main Conjugates by Fast Atom Bombardment Liquid Chromatography-Mass Spectrometry", *Plant Physiol.* 101(1): 313-320.
- 154 Chamarro J., Östin A., Sandberg G. (2001) "Metabolism of indole-3-acetic acid by orange (*Citrus sinensis*) flavedo tissue during fruit development", *Phytochemistry*, 57(2):179-187.
- 155 McNaught A.D., Wilkinson A. IUPAC Compendium of Chemical Terminology, The Gold Book, Second Edition, Eds.; Blackwell Science Ltd, 1997 available at: <http://old.iupac.org/goldbook/M03759.pdf> accessed in: 11/7/2010.
- 156 Liapis K. S., Kolokouri S. N., Koupparis, M. A., Miliadis, G. E. (2010) "A system suitability test for LC-TOF MS instruments and a validation of a method using high resolution/ high mass accuracy LC-TOF MS systems for pesticides residue analyses" in: *European Pesticide Residue Workshop 2010, Strasbourg* p. 48.
- 157 Anagnostopoulos C.J., Aplada Sarli P., Miliadis G. E., Haroutounian C. A. (2010) "Validation of the QuEChERS method for the determination of 25 priority pesticide residues in cereal-based baby foods by gas chromatography with electron capture and nitrogen phosphorous detection", *Hellenic Plant Protection Journal*, 3(2): 71-80.
- 158 Gelsomino, A. B., Petrovicova, B., Tiburtini, S., Magnani E., Felici M. 1997. Multiresidue analysis of pesticides in fruits and vegetables by gel permeation chromatography followed by gas chromatography with electron-capture and mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography A* 782(1): 105-122.
- 159 Καλτσίκης Π. (1990) "Πίνακες Γεωργικού Πειραματισμού", Σταμούλης 1990 σελ. 16.
- 160 ΟΔΗΓΙΑ 2002/63/EC of 11 July 2002 establishing Community methods of sampling for the official control of pesticide residues in and on products of plant and animal

- origin and repealing Directive 79/700/EEC.
- 161 Driehuis F., Spanjer M.C., Scholten J.M., Te Giffel M.C. (2008) "Occurrence of mycotoxins in maize, grass and wheat silage for dairy cattle in the Netherlands", *Food Addit. Contam. B.* 1:41–50.
 - 162 Betina V. (1993) "Chromatography of Mycotoxins Techniques and Applications", *Journal of Chromatography Library*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 1993; Vol. 54.
 - 163 Sforza F., Dall'Asta C., Marchelli R. (2006) "Recent advances in mycotoxin determination in food and feed by hyphenated chromatographic technique-mass spectrometry), *Mass. Spectrom. Rev.* 25(1):54–76.
 - 164 Songsermsakul P., Razzazi-Fazeli E. (2008) "A Review of Recent Trends in Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of Mycotoxins, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologie*" 31:1641–1686.
 - 165 Rajakylä E., Sakkars P. J. D. (1987) "Determination of mycotoxins in grain by high-performance Liquid chromatography and thermospray liquid Chromatography-mass spectrometry", *Journal of chromatography*, 384: 391-402.
 - 166 Spanjer M.C., Rensen P.M., και Scholten J.M. (2008) "LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs", *Food Additives and Contaminants*, 25(4): 472–489.
 - 167 ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) Νο 401/2006 of 23 February 2006 “laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs”, L70/12-34 . 9/3/2006.
 - 168 ΟΔΗΓΙΑ 2002/32/ΕC για τις ανεπιθύμητες ουσίες σε ζωοτροφές, 2002L0032— EN— 02.03.2010 — 012.001— 1 με 27.
 - 169 Abdurrahman A, Oguzhan Y, Kursad Das Y, Guvenc D, και Hakan Muglali O. (2009) "Occurrence of Aflatoxin B1, T-2 Toxin and Zearalenone in Compound Animal Feed", *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Vol 8(3), 403-407.
 - 170 Cavallarin L., Tabacco E., Antoniazzi S., Borreani G. (2011) "Aflatoxin accumulation in whole crop maize silage as a result of aerobic exposure", *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Volume 91, Issue 13, pages 2419–2425, October 2011
 - 171 COMMISSION RECOMMENDATION of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (Text with EEA relevance) (2006/576/EC) L 229/7 -9.
 - 172 Rafai P., Bata A., Jakab L., Vanyi A. (2000) "Evaluation of mycotoxin-contaminated cereals for their use in animal feeds in Hungary", *Food Additives Contam.*, 17:799-808.
 - 173 Kokić Bojana M., Čabarkapa Ivana S., Lević Jovanka D., Mandić Anamarija I., Matić Jovana J., Ivanov Dušica S. (2009) "Screening of mycotoxins in animal feed from the region of Vojvodina", *Zbornik Matice Srpske za Prirodne Nauke* 117:87-96.
 - 174 Kämpfe K. (1999) "Ergebnisse von Mykotoxinuntersuchungen in Korngetreide und Futtermitteln" in: *Proceedings 111. VDLUFA-Kongress in Halle/Saale. September 13-17 1999, Halle/Saale, Germany*, pp. 313-315.