



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΑΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΟ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (HILIC) ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ**

**ΔΑΝΕΖΗΣ Π. ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΑΘΗΝΑ
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012**

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΠΕΝΑΚΕΙΟ ΦΥΤΟΠΑΘΟΛΟΓΙΚΟ ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ
ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ
ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ
ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (HILIC) ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΜΕ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ
ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

ΔΑΝΕΖΗΣ Π. ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2012

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΩΝ (HILIC) ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗΣ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ

ΔΑΝΕΖΗΣ Π. ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ

A.M. 291303

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. ΜΙΧΑΗΛ ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ, Καθηγητής ΕΚΠΑ

2. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ ΛΙΑΠΗΣ, Ερευνητής Α', Μ. Φ. Ι.

3. ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ, Αναπληρωτής Καθηγητής ΕΚΠΑ

Στην Κατερίνα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μία από τις πρόσφατες τάσεις στην Αναλυτική Χημεία είναι η ανάπτυξη οικονομικών, γρήγορων και εύκολων μεθόδων με πεδίο που να περιλαμβάνει αναλύτες διαφορετικών κατηγοριών και διαφόρων φυσικοχημικών ιδιοτήτων.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ανάπτυξη μιας πολυπολεμιατικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 26 ξενοβιοτικών ουσιών (πολικών και υδρόφιλων) με την τεχνική υγροχρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (**Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC**) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (**LC-MS/MS**) με πηγή ιόντων ESI. Οι αναλύτες αυτοί ήταν οι φυτορρυθμιστικές ουσίες: chlormequat, daminozide, diquat, maleic hydrazide, mepiquat, το εντομοκτόνο: cyromazine, το ptu (μεταβολίτης του μυκητοκτόνου propineb), τα αντιβιοτικά: chlorotetracycline, doxycycline, oxytetracycline (τετρακυκλίνες), sulfamerazine, sulfadimidine, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfadimethoxine (σουλφοναμίδια), ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, flumequine, marbofloxacin, oxolinic acid (κινολόνες), καθώς και οι μυκοτοξίνες: αφλατοξίνη B1, B2, η φουμονισίνη B1 και η ωχρατοξίνη A. Επίσης έγινε ανάπτυξη μιας ειδικής μεθόδου για το μεμονωμένο προσδιορισμό του μυκητοκτόνου fosetyl-aluminium με ESI-.

Η πορεία παραλαβής των αναλυτών από τη μήτρα επιτυγχάνεται με μια γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική. Η επικύρωση της πολυπολεμιατικής μεθόδου έγινε στα επίπεδα: 10 µg/kg και 100 µg/kg στα εξής υποστρώματα: φρούτα-λαχανικά (μήλα, βερίκοκα, μαρούλια και κρεμμύδια), δημητριακά-όσπρια (αλεύρι και ρεβύθια), ζωικά προϊόντα (γάλα και κρέας) και παιδικές τροφές. Οι μέθοδοι επικυρώθηκαν σύμφωνα με το έγγραφο SANCO/12495/2011 και παρουσιάζουν ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα. Έγινε εκτίμηση της γραμμικότητας, της ακρίβειας, της πιστότητας, ενώ προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και ο συντελεστής επίδρασης μήτρας. Τέλος υπολογίστηκαν η συνδυασμένη και η διευρυμένη αβεβαιότητα των μεθόδων για κάθε ουσία ανά υπόστρωμα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Προσδιορισμός Φυτοπροστατευτικών Ουσιών, Αντιβιοτικών και Μυκοτοξινών σε τρόφιμα με τη χρήση Χρωματογραφικών μεθόδων συζευγμένων με Φασματομετρία Μαζών

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: HILIC, LC-MS/MS, φυτοπροστατευτικά προϊόντα, αντιβιοτικά, μυκοτοξίνες, φυτορρυθμιστικές ουσίες, εντομοκτόνα, μυκητοκτόνα, ζιζανιοκτόνα

ABSTRACT

One of the recent trends in Analytical Chemistry is the development of economic, quick and easy methods used in a field that includes analytes of different classes and different physicochemical properties.

In this project a multi-residue method was developed for the simultaneous determination of 26 xenobiotics (polar and hydrophilic) with hydrophilic interaction liquid chromatography technique (**Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC**) coupled with mass spectrometry technology, triple quadrupole (LC-MS/MS) with ion source ESI. These analytes were the plant growth regulators: chlormequat, daminozide, diquat, maleic hydrazide, mepiquat, the insecticide: cyromazine, the ptu (metabolite of the fungicide propineb), the antibiotics: chlorotetracycline, doxycycline, oxytetracycline (tetracyclines), sulfamerazine, sulfadimidine, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfadimethoxine (sulfonamides), ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, flumequine, marbofloxacin, oxolinic acid (quinolones) and the mycotoxins: aflatoxin B1, B2, fumonisin B1 and ochratoxin A. Additionally, a specific method for the individual determination of the fungicide fosetyl-aluminium was developed with ESI-.

The isolation of the analytes from the matrix is achieved with a fast and effective technique. The validation of the multi-residue method was performed at the levels: 10 µg/kg and 100 µg/kg in the following substrates: fruits-vegetables (apples, apricots, lettuce and onions), cereals and pulses (flour and chickpeas), animal products (milk and meat) and baby food. The methods were validated according to the document SANCO/12495/2011 and show satisfactory accuracy and precision. The linearity, accuracy, precision, along with the limits of detection and the matrix factor were estimated. Finally, there was an estimation for the methods' combined and expanded uncertainty for each substance per substrate.

SUBJECT AREA: Determination of Plant Protection Substances, Antibiotics and Mycotoxins in Food using Chromatographic Methods coupled with Mass Spectrometry technology.

KEYWORDS: HILIC, LC-MS/MS, plant protection products, antibiotics, mycotoxins, plant growth regulators, insecticides, fungicides, herbicides.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων Γεωργικών Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου στα πλαίσια του διαπανεπιστημιακού διατμηματικού προγράμματος μεταπτυχιακών σπουδών «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας», με την έγκριση της Διοίκησης του Ινστιτούτου και της Διεύθυνσης του Εργαστηρίου.

Το θέμα καθορίστηκε από τον Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Μιχαήλ Κουμπάρη, σε συνεργασία με τον ερευνητή του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου κ. Κωνσταντίνου Λιαπή, ο οποίος ανέλαβε και την επίβλεψη της διπλωματικής εργασίας στο Εργαστήριο Υπολειμμάτων του Μπενακείου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες, τόσο στον κ. Κουμπάρη όσο και στον κ. Λιαπή για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγησή τους καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής, καθώς και για τις εύστοχες υποδείξεις τους κατά τη σύνταξή της. Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Οικονόμου για την συμμετοχή του στην τριμελή επιτροπή.

Επιπλέον θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Ερευνητή κ. Γεώργιο Μηλιάδη για τη συμβολή του στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής και για τις χρήσιμες συμβουλές του.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Χρήστο Αναγνωστόπουλο για τις συμβουλές του κατά την εκτέλεση των πειραμάτων καθώς και στην Πένυ Μαλάτου, την Αγγελική Χαραλάμπους, την κα Ντίνα Μπούρου, την Ελευθερία Μπέμπελου και την κα Πιπίνα Απλαδά – Σαρλή για την άψογη συνεργασία και το ενδιαφέρον τους σε όλο το διάστημα εκπόνησης της εργασίας.

Τέλος ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους γονείς μου Παύλο και Ελευθερία και την αδερφή μου Κατερίνα, για την υποστήριξή τους στην προσπάθειά μου αυτή.

Δανέζης Γεώργιος
Αθήνα 2012

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	1
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1
1.1.1 Γενικά.....	1
1.1.2 Στατιστικά στοιχεία φυτοπροστατευτικών προϊόντων.....	2
1.1.3 Νέα φυτοπροστατευτικά προϊόντα.....	3
1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	5
1.2.1 Εισαγωγή.....	5
1.2.2 Μυκητοκτόνα – Βακτηριοκτόνα.....	5
1.2.2.1 Ταξινόμηση με βάση τον τρόπο δράσεως.....	6
1.2.2.2 Ταξινόμηση με βάση τη χημική δομή και το βιοχημικό μηχανισμό δράσης.....	6
1.2.2.2.1 Ανόργανες Ενώσεις.....	7
1.2.2.2.2 Οργανομεταλλικές Ενώσεις.....	7
1.2.2.2.3 Οργανικές Προστατευτικές Ενώσεις πολλαπλής δράσης.....	7
1.2.2.2.4 Οργανικά Μυκητοκτόνα με εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές ή στις φυσιολογικές λειτουργίες – Οργανικά διασυστηματικά.....	8
1.2.2.2.5 Αντιβιοτικά.....	9
1.2.2.2.6 Αντιπαθογονικά Μυκητοκτόνα.....	10
1.2.2.2.7 Βιο-αντιπαθογονικά Μυκητοκτόνα.....	11
1.2.3 Ζιζανιοκτόνα.....	11
1.2.3.1 Ζιζανιοκτόνα με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες.....	12
1.2.3.2 Ζιζανιοκτόνα με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες.....	12
1.2.3.3 Βιο-ζιζανιοκτόνα.....	13
1.2.3.4 Αντιφυτοτοξικές ενώσεις (Safeners)	14
1.2.4 Εντομοκτόνα – Ακαρεοκτόνα – Νηματοδωκτόνα.....	14
1.2.4.1 Ενώσεις με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες.....	15
1.2.4.2 Ενώσεις με εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες.....	15
1.2.4.3 Βιολογικά σκευάσματα με εντομοκτόνο δράση (biological insecticide).....	16
1.2.4.4 Συνεργιστές εντομοκτόνων.....	16

1.2.5 Φυτορυθμιστικές ουσίες.....	16
1.2.5.1 Ορισμός, διάκριση και σημασία των φυτορυθμιστικών ουσιών.....	17
1.2.5.2 Ταξινόμηση των φυτορυθμιστικών ουσιών.....	17
1.2.5.2.1 Επιβραδυντές αύξησης (growth retardants).....	18
1.2.5.2.2 Παρεμποδιστές της αύξησης (growth inhibitors).....	20
1.2.5.2.3 Γαμετοκτόνα (gameticides)	20
1.2.5.2.4 Καταστροφείς των κορυφών των βλαστών.....	20
1.2.5.2.5 Αποφυλλωτικά – Καρποπρωτικά.....	21
1.2.5.2.6 Αποξηραντικά (desiccants).....	21
1.2.5.2.7 Αντιδιαπνευστικά.....	22
1.3 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ.....	22
1.4 ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ.....	23
1.5 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ.....	24
1.5.1 Γενικά.....	24
1.5.2 Επίδραση της μεταποίησης (Processing) στα Υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων.....	26
1.5.3 Ορθή γεωργική πρακτική (GAP)- Ελάχιστο χρονικό διάστημα μεταξύ τελευταίας επέμβασης-συγκομιδής (PHI).....	27
1.6 ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ.....	27
1.6.1 Γενικά.....	27
1.6.2 Αξιολόγηση κινδύνου για το χρήστη των φυτοπροστατευτικών προϊόντων.....	29
1.6.3 Αξιολόγηση κινδύνου για τον καταναλωτή γεωργικών προϊόντων.....	30
1.7 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ – ΑΝΩΤΑΤΑ ΟΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ.....	32
1.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ.....	38
1.9 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ.....	39
1.9.1 Chlormequat chloride.....	40
1.9.2 Daminozide.....	41
1.9.3 Mepiquat chloride.....	43
1.9.4 Maleic hydrazide.....	43
1.9.5 Diquat.....	44
1.9.6 Paraquat.....	45
1.9.7 Propylenethiourea (PTU).....	46

1.9.8 Oxytetracycline – chlorotetracycline.....	47
1.9.9 Kasugamycin.....	48
1.9.10 Fosetyl-aluminium.....	48
1.9.11 Amitrole.....	49
1.9.12 Cyromazine.....	50
1.10 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ...	50
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο ANTIBIOTIKA.....	51
2.1 ΓΕΝΙΚΑ.....	51
2.1.1 Εισαγωγή – Ορισμός.....	51
2.1.2 Ταξινόμηση των αντιβιοτικών.....	52
2.1.3 Η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική και στην κτηνοτροφία.....	53
2.1.4 Μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών.....	55
2.1.5 Μικροβιακή Αντοχή.....	56
2.1.6 Γενετική της ανθεκτικότητας.....	57
2.2 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ (Tetracyclines).....	57
2.2.1 Οι τετρακυκλίνες και η φαρμακολογία τους.....	57
2.2.2 Χημεία των τετρακυκλινών.....	58
2.2.3 Σχέση χημικής δομής – αντιμικροβιακής δράσης.....	59
2.2.4 Τοξικότητα και παρενέργειες.....	59
2.2.5 Χρήση των τετρακυκλινών στην κτηνιατρική και στην κτηνοτροφία.....	59
2.2.5.1 Φαρμακολογία και φαρμακοκινητική των χρησιμοποιούμενων στην κτηνιατρική τετρακυκλινών.....	60
2.2.5.1.1 Χλωροτετρακυκλίνη (Chlorotetracycline).....	60
2.2.5.1.2 Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline).....	61
2.2.5.1.3 Δοξυκυκλίνη (Doxycycline).....	62
2.2.5.2 Οι τετρακυκλίνες στην κτηνοτροφία.....	63
2.3 ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΑ (Sulfonamides).....	64
2.3.1 Εισαγωγή.....	64
2.3.2 Κατάταξη σουλφοναμίδων.....	65
2.3.3 Αντιμικροβιακό φάσμα.....	66
2.3.4 Αντιμετώπιση ασθενειών και χορήγηση σουλφοναμίδων κατ' είδος ζώου.....	67
2.4 ΚΙΝΟΛΟΝΕΣ (Quinolones).....	68
2.4.1 Εισαγωγή.....	68
2.4.2 Δομή-χαρακτηριστικά των κινολονών.....	69

2.4.3 Αντιμικροβιακή δράση.....	70
2.4.4 Ταξινόμηση κινολονών.....	71
2.4.5 Χρήση στην Κτηνιατρική.....	73
2.4.6 Αντοχή στις φθοροκινολόνες.....	73
2.5 ΚΑΤΑΛΟΙΠΑ ANTIBIOTIKΩN ΣΕ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	73
2.6 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ANTIBIOTIKA ΣΤΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΖΩΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥΣ.....	74
2.6.1 Νομοθεσία της Ε.Ε. για τα κατάλοιπα αντιβιοτικών σε τρόφιμα.....	74
2.6.2 Κτηνιατρικά φάρμακα.....	76
2.6.3 Φαρμακούχες ζωοτροφές.....	78
2.6.4 Έλεγχος της παρουσίας καταλοίπων αντιβιοτικών.....	79
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	83
3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ.....	83
3.1.1 Εισαγωγή.....	83
3.1.2 Μέτρα περιορισμού των μυκοτοξινών στα τρόφιμα.....	85
3.2 ΜΥΚΗΤΕΣ.....	85
3.2.1 Γενικά στοιχεία.....	85
3.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση των μυκήτων στα τρόφιμα.....	86
3.3 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ.....	87
3.3.1 Εισαγωγή.....	87
3.3.2 Βιοσύνθεση αφλατοξινών.....	89
3.3.3 Τοξική δράση των αφλατοξινών.....	91
3.4 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ.....	92
3.4.1 Εισαγωγή – Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά ωχρατοξίνης Α.....	92
3.4.2 Βιοσύνθεση της ωχρατοξίνης Α.....	93
3.4.3 Άλλες ωχρατοξίνες.....	93
3.4.4 Τοξική δράση της ωχρατοξίνης Α.....	94
3.4.4.1 Νεφροτοξικότητα.....	94
3.4.4.2 Καρκινογένεση.....	94
3.5 ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ.....	95
3.5.1 Εισαγωγή – Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά φουμονισινών.....	95
3.5.2 Μέθοδοι που επιδρούν στην μείωση-αποικοδόμηση των φουμονισινών.....	96
3.5.2.1 Βιολογικές μέθοδοι.....	96
3.5.2.2 Φυσικές μέθοδοι.....	97

3.5.2.3 Χημικές μέθοδοι.....	97
3.5.3 Τοξική δράση των φουμονισινών.....	98
3.6 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΤΗΣ Ε.Ε. ΚΑΙ ΑΝΩΤΑΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	99
3.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ.....	100
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	101
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	101
4.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ.....	101
4.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ.....	103
4.3.1 Σύστημα διανομής διαλυτών.....	105
4.3.2 Μονάδα εισαγωγής δείγματος.....	105
4.3.3 Χρωματογραφική στήλη.....	106
4.3.4 Συστήματα ανίχνευσης.....	108
4.3.5 Σύστημα καταγραφής.....	110
4.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ.....	111
4.4.1 Χρόνος συγκράτησης.....	111
4.4.2 Αριθμός θεωρητικών πλακών.....	112
4.4.3 Παράγοντας διαχωρισμού και διακριτική ικανότητα.....	114
4.4.4 Συμμετρία κορυφών.....	115
4.4.5 Όγκος συστήματος.....	116
4.5 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ.....	117
4.6 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ.....	118
4.7 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΖΕΥΓΩΝ ΙΟΝΤΩΝ.....	120
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	122
5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	122
5.2 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	123
5.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ.....	124
5.3.1 Συστήματα εισαγωγής δείγματος.....	125
5.3.2 Πηγές ιόντων.....	126
5.3.2.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electron Spray Ionization, ESI).....	129
5.3.2.2 ESI ή APCI.....	136
5.3.2.3 Επίδραση Μήτρας (Matrix Effect).....	136
5.3.3 Αναλυτές μαζών.....	137

5.3.3.1 Αναλυτής Τετραπόλου (Quadrupole).....	139
5.3.3.2 Συζευγμένη φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)...	141
5.3.3.3 Τριπλό Τετράπολο (Triple Quadrupole).....	142
5.3.3.4 Τεχνικές σάρωσης.....	143
5.3.3.4.1 Φασματομετρία Μαζών Πλήρους Σάρωσης (Full Scan Mass Spectrometry).....	143
5.3.3.4.2 Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring-SIM).....	144
5.3.3.4.3 Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring-SRM) ή πολλαπλών αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring-MRM).....	144
5.3.3.4.4 Σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning).....	146
5.3.3.4.5 Σάρωση μητρικού ιόντος (Precursor Ion Scanning).....	146
5.3.4 Σύστημα ανίχνευσης των ιόντων.....	147
5.3.4.1 Φαρανταϊκό κύπελλο (Faraday cup).....	147
5.3.4.2 Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron multiplier).....	148
5.3.5 Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων.....	148
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο HILIC.....	150
6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ.....	150
6.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ.....	152
6.3 ΣΥΓΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HILIC ΜΕ ΤΗΝ RPLC ΚΑΙ ΤΗΝ NPLC.....	153
6.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΤΗΣ HILIC.....	155
6.5 ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΥΣΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ.....	157
6.6 ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ.....	158
6.7 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	160
6.8 ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ.....	161
6.9 ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ.....	162
6.10 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HILIC...	163
6.11 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΤΗΣ NPLC ΚΑΙ ΤΗΣ HILIC ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ.....	164
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	165
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο ΟΡΓΑΝΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	167
8.1 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ.....	167
8.2 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	170
8.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	170

8.4 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΤΡΙΠΛΟ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟ.....	171
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9ο ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΥΤΟΠΡΑΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	
9.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΗΤΡΑ – ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	172
9.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	173
9.3 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ.....	185
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10ο ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΥΤΟΠΡΑΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	
10.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	196
10.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	196
10.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ (ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ).....	200
10.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ.....	207
10.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	217
10.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ (MATRIX EFFECT, ME).....	221
10.7 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	223
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11ο ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟ FOSETYL-ALUMINIUM.....	
11.1 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΗΤΡΑ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.....	238
11.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ.....	240
11.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ (ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ).....	241
11.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ.....	242
11.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ (MATRIX EFFECT, ME).....	242
11.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	242

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ...	243
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	245
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	262

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1.1 Γενικά

Η ασφάλεια των τροφίμων αποτελεί μείζον θέμα για τη διασφάλιση της δημόσιας υγείας. Σύμφωνα με το σύστημα HACCP (Hazard assessment Critical Control Points, Ανάλυση Κινδύνων-Κρίσιμα Σημεία Ελέγχου), ασφαλές χαρακτηρίζεται το τρόφιμο που μπορεί να καταναλωθεί χωρίς να προκαλέσει την οποιαδήποτε ασθένεια (π.χ. τροφική δηλητηρίαση) ή κάποια άλλη βλάβη στην υγεία του καταναλωτή. Αυτό σημαίνει ότι τα ασφαλή τρόφιμα δεν πρέπει να περιέχουν παθογόνους μικροοργανισμούς, επικίνδυνες χημικές ουσίες ή ξένα σώματα. Οποιοδήποτε τρόφιμο περιέχει ένα από τα παραπάνω σε περιεκτικότητα μεγαλύτερη των επιτρεπτών ορίων χαρακτηρίζεται ως μη ασφαλές και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές βλάβες στην υγεία του καταναλωτή.

Οι κίνδυνοι που εμφανίζονται στα μη ασφαλή τρόφιμα μπορεί να είναι: “βιολογικής προέλευσης”, όπως βακτήρια, ιοί, μύκητες, πρωτόζωα κ.ά., “φυσικής προέλευσης”, που συνήθως προέρχονται από φυσική αλλοίωση των τροφίμων, ή “χημικής προέλευσης”. Στους κινδύνους χημικής προέλευσης περιλαμβάνονται φυτοπροστατευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες φυτών και στην εκτροφή ζώων ή κτηνιατρικά φάρμακα, άλλοτε ακατάλληλα και άλλοτε σε μη επιτρεπτές δόσεις. [1]

Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των φυτών από τους εχθρούς και τις ασθένειες ονομάζονται Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα (Φ.Π., Plant Protection Products). Φυτοπροστατευτικό Προϊόν είναι κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που έχει ως στόχο την παρεμπόδιση ή την καταστροφή ή την απώθηση ενός φυτοπαρασίτου, καθώς και την ρύθμιση της ανάπτυξης και εξέλιξης των φυτών (Φυτορυθμιστικές ουσίες).

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα πρέπει να πληρούν έναν αριθμό επιθυμητών ιδιοτήτων ως προς τη βιολογική δράση, την εφαρμογή τους στα φυτά, την τοξικολογία για το χρήστη, τον καταναλωτή και τους άλλους οργανισμούς μη στόχους, αλλά και την τύχη και συμπεριφορά στο περιβάλλον. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα πρέπει να επιτυγχάνουν αποτελεσματική καταπολέμηση σε μικρές συγκεντρώσεις να μην είναι φυτοτοξικά, να μην επηρεάζουν τους άλλους οργανισμούς του οικοσυστήματος, να μη

ρυπαίνουν το περιβάλλον και να μην αποτελούν κίνδυνο για την υγεία και την ασφάλεια του ανθρώπου. [2,3]

1.1.2 Στατιστικά στοιχεία φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Σύμφωνα με στοιχεία του FAO (1996), η παγκόσμια παραγωγή γεωργικών προϊόντων έχει διπλασιαστεί από το 1960, ενώ η καλλιεργήσιμη έκταση έχει παραμείνει σταθερή από τη δεκαετία του '50. Στη θεαματική αυτή αύξηση της παραγωγής ανά μονάδα επιφάνειας, η συμβολή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, είναι αναμφισβήτητα ιδιαίτερα σημαντική. Μάλιστα υπάρχουν γεωργικά προϊόντα των οποίων η παραγωγή θα ήταν αδύνατη ή ασύμφορη χωρίς τη χρήση χημικών μέσων καταπολέμησης μερικών καταστρεπτικών ασθενειών, για τις οποίες ούτε ανθεκτικές ποικιλίες ούτε βιολογικά μέσα ελέγχου είναι διαθέσιμα ούτε καλλιεργητικά μέτρα μπορεί να είναι αποτελεσματικά να παρθούν στη σύγχρονη γεωργική πράξη. [4,5]

Σύμφωνα με τους υπολογισμούς που έχουν γίνει από ειδικούς, προκύπτει ότι στην περίπτωση μη χρησιμοποίησης φυτοπροστατευτικών προϊόντων, θα καταστρέφονταν τα 2/3 της παγκόσμιας παραγωγής από εχθρούς, ασθένειες, ζιζάνια και το κόστος των φυτικών προϊόντων θα αυξανόταν 60-200%. Όπως είναι προφανές είναι αδύνατο να υπάρξει γεωργική παραγωγή χωρίς τη χρήση προϊόντων φυτοπροστασίας, τουλάχιστον με τη σημερινή μορφή της γεωργίας. [5]

Πιο συγκεκριμένα, σύμφωνα με μελέτη βασισμένη σε μείωση της χρήσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων κατά 75% στην Ε.Ε. (από τον καθηγητή P. Michael Schmitz, Πανεπιστήμιο του Giessen, 2002), υπολογίζεται ότι:

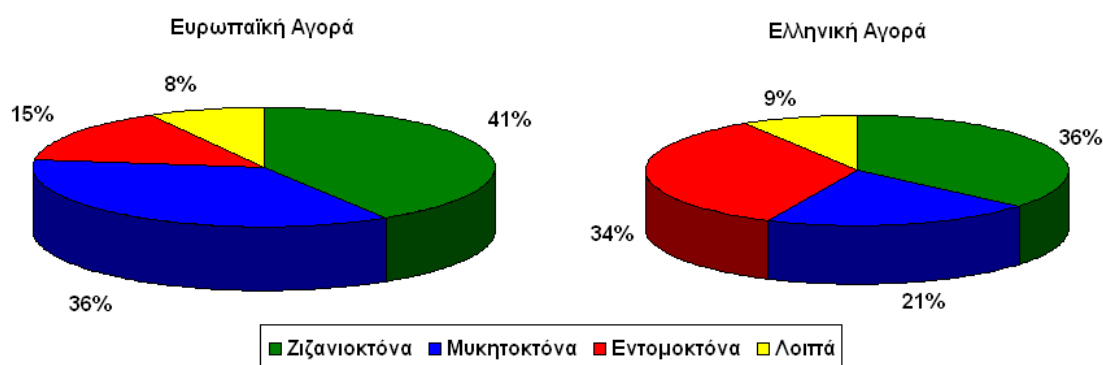
- η παραγωγή σιταριού, κριθαριού, αραβόσιτου, σίκαλης κ.ά. θα μειωθεί κατά 40%,
- η παραγωγή ελαιούχων σπόρων (βαμβακόσπορος κ.ά.) θα μειωθεί κατά 50%,
- η παραγωγή φρούτων και λαχανικών θα μειωθεί πάνω από 30%,
- το εισόδημα των Ευρωπαίων αγροτών και της βιομηχανίας τροφίμων θα μειωθεί κατά 10 δις €. [6]

Η αγορά των φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε χιλιάδες € για το 2003 παρουσιάζεται στον πίνακα 1.1 και τα αντίστοιχα ποσοστά στο σχήμα 1.1.

Πίνακας 1.1 Η αγορά των φυτοπροστατευτικών προϊόντων για την Ευρωπαϊκή και την Ελληνική Αγορά σε χιλιάδες €, για το 2003. [6]

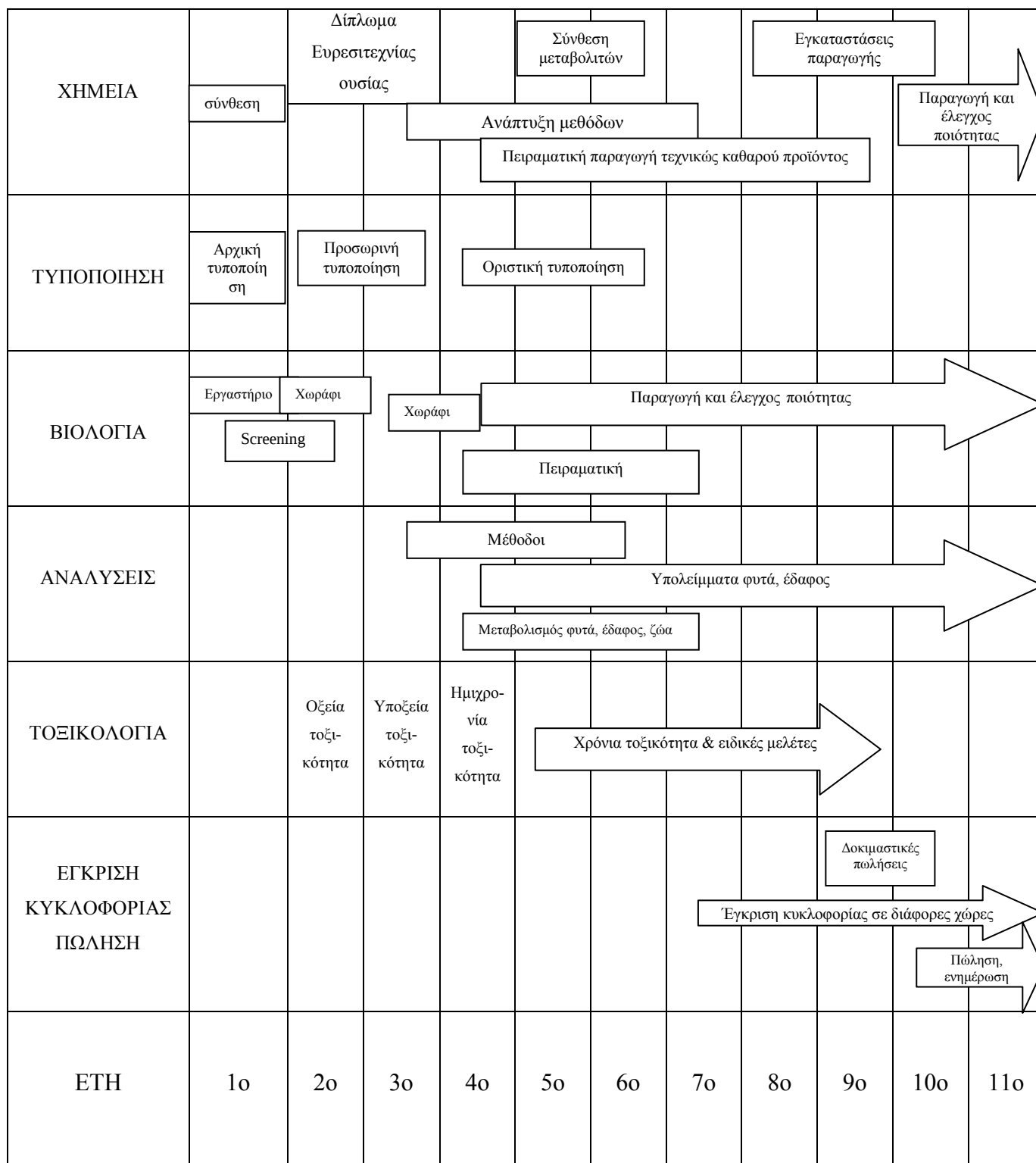
	Ευρωπαϊκή Αγορά	Ελληνική Αγορά
Ζιζανιοκτόνα	2.598.097	65.498
Μυκητοκτόνα	2.060.810	39.148
Εντομοκτόνα	897.802	61.354
Λοιπά	537.887	16.750
Σύνολο	6.094.596	182.750

Σχήμα 1.1 Η αγορά των φυτοπροστατευτικών προϊόντων για την Ευρωπαϊκή και την Ελληνική Αγορά σε ποσοστά, για το 2003. [6]



1.1.3 Νέα φυτοπροστατευτικά προϊόντα

Η διαδικασία για την έρευνα, την ανάπτυξη και την έγκριση ενός νέου φυτοπροστατευτικού προϊόντος διαρκεί περίπου 11 χρόνια και έχει το κόστος της τάξης των 200 εκατομμυρίων € (έρευνα 102 εκατ. €, ανάπτυξη 86 εκατ. € και έγκριση 12 εκατ. €). Για κάθε δραστική ουσία που εγκρίνεται για χρήση και τοποθετείται στην αγορά, υπάρχουν αντίστοιχα πάνω από 139.000 που δεν καταφέρνουν να περάσουν από το στάδιο της ανάπτυξης (σχήμα 1.2). [6]



Σχήμα 1.2. Στάδια ανάπτυξης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων (προσαρμογή από Ciba-Geigy). [7]

1.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

1.2.1 Εισαγωγή

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα ανάλογα με το είδος του φυτοπαρασίτου που επηρεάζουν ή τη δράση τους διακρίνονται σε μυκητοκτόνα (fungicides), βακτηριοκτόνα (bactericides), εντομοκτόνα (insecticides), ακαρεοκτόνα (acaricides), νηματοδοκτόνα (nematicides), ζιζανιοκτόνα (herbicides), τρωκτικοκτόνα (rodenticides), κοχλιολειμακοκτόνα (molluscicides), απολυμαντικά (disinfectants) [καταπολέμηση μικροοργανισμών] ή υποκαπνιστικά (fumigants) [πτητικές ενώσεις που καταπολεμούν έντομα, τρωκτικά και μικροοργανισμούς], απωθητικά (repellents) [εντόμων, ακάρεων ή σπονδυλωτών] κ.α.

Στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα υπάγονται επίσης και οι φυτορυθμιστικές ουσίες (plant growth regulators) ή φυτοορμόνες (plant hormones) που σε μικρές συγκεντρώσεις επηρεάζουν βασικές φυσιολογικές λειτουργίες των φυτών και χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της αύξησης και ανάπτυξής τους. Επιπλέον στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα υπάγονται και τα βιοκτόνα (biopesticides) που έχουν ως δραστικό συστατικό κάποιο μικροοργανισμό (μύκητες, βακτήρια, ιοί), καθώς και παρασιτοειδή και αρπακτικά των ζωικών εχθρών. [2]

Στην παρούσα εργασία, οι ουσίες που μελετήθηκαν ανήκουν στις κατηγορίες των μυκητοκτόνων – βακτηριοκτόνων, των εντομοκτόνων, των ζιζανιοκτόνων και των φυτορυθμιστικών ουσιών.

1.2.2 Μυκητοκτόνα - Βακτηριοκτόνα

Οι ασθένειες των φυτών που προκαλούνται από διάφορους μικροοργανισμούς, όπως μύκητες, βακτήρια, μυκοπλάσματα, ρικέτσιες και ιούς, αποτελούν σημαντικά προβλήματα της φυτικής παραγωγής, ιδιαίτερα στις εντατικές και θερμοκηπιακές καλλιέργειες. Η αντιμετώπιση των φυτοπαθογόνων μικροοργανισμών μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους, όπως με την εφαρμογή καλλιεργητικών τεχνικών, τη χρήση ανθεκτικών ποικιλιών, την εφαρμογή βιολογικών παραγόντων και χημικών ενώσεων. Όμως αν και η τάση στην καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών είναι η μείωση της χρήσης χημικών σκευασμάτων, η αντικατάστασή τους με τις άλλες μεθόδους φυτοπροστασίας δε φαίνεται να μπορεί να επιτευχθεί, τουλάχιστον στην γεωργία που έχει εμπορικούς σκοπούς.

Η χρήση των μυκητοκτόνων σήμερα θεωρείται αναγκαία και είναι η επικρατέστερη μέθοδος για την μεγιστοποίηση της προστασίας των καλλιεργειών και την αύξηση και βελτίωση της παραγωγής.

Προφανώς ο ρόλος των μυκητοκτόνων δεν περιορίζεται μόνο στην προστασία και αύξηση της φυτικής παραγωγής αλλά επεκτείνεται και στην ποιότητα των παραγόμενων τροφίμων λόγω της συμβολής των μυκητοκτόνων στην αντιμετώπιση των μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες, ουσίες εξαιρετικά επικίνδυνες για την υγεία του καταναλωτή. Θεωρείται ότι το 25% των παραγόμενων τροφίμων υποβαθμίζεται ποιοτικά από μυκοτοξίνες, όπως *αφλατοξίνες*, *φουμονισίνες*, *πατουλίνη* και *ωχρατοξίνες*.

Η ταξινόμηση των μυκητοκτόνων στηρίζεται στη χημική τους δομή, στο μηχανισμό δράσεως και στην ικανότητά τους να εισέρχονται και να διακινούνται στο εσωτερικό των φυτών. [4,8,9]

1.2.2.1 Ταξινόμηση με βάση τον τρόπο δράσεως

Τα μυκητοκτόνα, αναλόγως με την ικανότητά τους να προσλαμβάνονται και να διακινούνται στο εσωτερικό των φυτών διακρίνονται σε δύο κατηγορίες: α) τα προστατευτικά και β) τα διασυστηματικά.

Ως προστατευτικά μυκητοκτόνα ορίζονται εκείνα που δεν εισέρχονται κι επομένως δεν κυκλοφορούν (τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό) στο εσωτερικό των φυτικών οργάνων. Η πρόσληψή τους από τα φυτά είναι σχεδόν αμελητέα και ως εκ τούτου προστατεύουν μόνο το μέρος του φυτικού οργάνου επί του οποίου έχουν εναποτεθεί. Χρησιμοποιούνται κατά κανόνα μόνο σε προληπτικές επεμβάσεις πριν από την μόλυνση των φυτών.

Ως διασυστηματικά μυκητοκτόνα ορίζονται τα μυκητοκτόνα τα οποία έχουν την ιδιότητα να προσλαμβάνονται και να κυκλοφορούν μέσα στους φυτικούς ιστούς των οργάνων του φυτού με συμπλαστική ή αποπλαστική κίνηση. Τα διασυστηματικά μυκητοκτόνα λοιπόν διακρίνονται για τη διεισδυτικότητα και την ικανότητα μετακινήσεως τους εντός των φυτικών ιστών. [4,8,9]

1.2.2.2 Ταξινόμηση με βάση τη χημική δομή και το βιοχημικό μηχανισμό δράσης

Τα μυκητοκτόνα που χρησιμοποιούνται στην αντιμετώπιση των ασθενειών των φυτών είναι από απόψεως χημικής δομής ανόργανες ή οργανικές ενώσεις, που

ταξινομούνται σε διάφορες κατηγορίες όπως: ανόργανα, οργανομεταλλικά, οργανικά με μη εξειδικευμένη δράση, οργανικά με εξειδικευμένη δράση, αντιβιοτικά, αντιπαθογονικά και βιο-αντιπαθογονικά. [8,10]

1.2.2.2.1 Ανόργανες Ενώσεις

1.2.2.2.2 Οργανομεταλλικές Ενώσεις

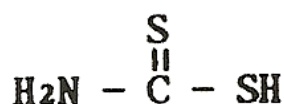
1.2.2.2.3 Οργανικές Προστατευτικές Ενώσεις πολλαπλής δράσης

Τα οργανικά προστατευτικά μυκητοκτόνα είναι χημικές ενώσεις που χαρακτηρίζονται από γενική μάλλον τοξικότητα στο υποκυτταρικό επίπεδο και δεν είναι φυτοτοξικά.

Σημαντικές ομάδες οργανικών προστατευτικών μυκητοκτόνων που παρεμποδίζουν πολλές θέσεις του κυτταρικού μεταβολισμού είναι τα:

1) Διθειοκαρβαμιδικά

Η ομάδα των διθειοκαρβαμιδικών (dithiocarbamates) είναι μία σημαντική για την φυτοπροστασία ομάδα προστατευτικών μυκητοκτόνων, με ευρεία χρήση στη γεωργία εξαιτίας της υψηλής χημικής και βιολογικής τους δραστηριότητας και του χαμηλού κόστους παραγωγής τους. Ωστόσο έχουν αρχίσει να αποσύρονται από μερικές τουλάχιστον χρήσεις σε προηγμένες χώρες. Έχουν ευρύ φάσμα δράσεως με εξαίρεση τα ωίδια. Χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση πολλών φυτοπαθογόνων μυκήτων των οπωροφόρων, των λαχανικών, της αμπέλου, των γεωμήλων και του καπνού. Τα διθειοκαρβαμιδικά είναι παράγωγα του διθειοκαρβαμιδικού οξέος.



Από χημικής δομής μπορούμε να διακρίνουμε τα μυκητοκτόνα αυτά σε τρεις κατηγορίες:

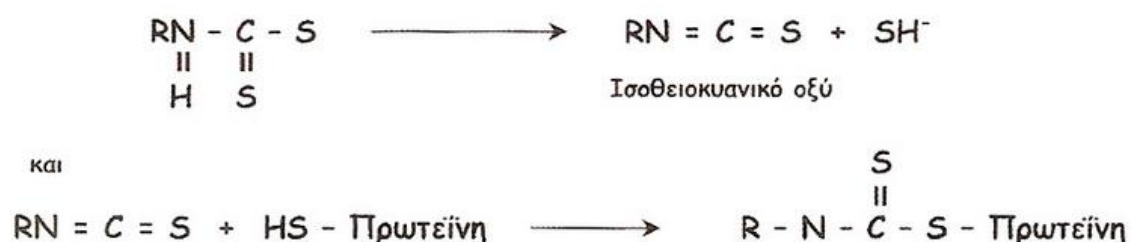
α) τα δισουλφίδια θειουράμης: thiram

β) τα δι-μεθυλο-διθειοκαρβαμιδικά (dimethyldithiocarbamates): ziram

γ) τα μονο-αλκυλο-διθειοκαρβαμιδικά: *propineb*, *maneb*, *mancozeb*.

Παρά τη μεγάλη σημασία των διθειοκαρβαμιδικών, ο μηχανισμός της μυκοτοξικής τους δράσης δεν μπορεί να λεχθεί ότι είναι γνωστός στις λεπτομέρειές του. Πιθανότατα δρουν σε περισσότερες από μία θέσεις στο υποκυτταρικό επίπεδο των μυκήτων. Για τα δισουλφίδια θειουράμης και τα δι-μεθυλο-διθειοκαρβαμιδικά η τοξικότητα φαίνεται να οφείλεται στη δέσμευση ιόντων μετάλλων κυρίως Cu^{+2} που είναι απαραίτητα για ορισμένες ενζυμικές αντιδράσεις.

Στην περίπτωση των μονο-αλκυλο-διθειοκαρβαμιδικών η απαίτηση ύπαρξης βαρέως μετάλλου για την είσοδο του μυκητοκτόνου στο κύτταρο δεν έχει τεκμηριωθεί απόλυτα. Το πιθανότερο είναι ότι οι ενώσεις αυτές μετατρέπονται σε παράγωγα ισοθειοκυανικού οξέος που αντιδρούν με σουλφυδρυλικές ομάδες πρωτεϊνών σχηματίζοντας σύμπλοκες ενώσεις ισοθειοκυανικού οξέος-πρωτεΐνες κατά την αντίδραση:



Δέσμευση τέτοιων σουλφυδρυλικών ομάδων από το ισοθειοκυανικό οξύ έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της δράσης πολλών ενζύμων του κυττάρου του παθογόνου. [2,4,8,10,11]

- 2) Φθαλιμίδια και συγγενή σουλφίδια
- 3) Κινόνες
- 4) Άλλα οργανικά προστατευτικά

1.2.2.2.4 Οργανικά Μυκητοκτόνα με εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές ή στις φυσιολογικές λειτουργίες – Οργανικά διασυστηματικά

Τα οργανικά μυκητοκτόνα με εξειδικευμένη δράση είναι συνήθως διασυστηματικά, δηλαδή είναι χημικές ενώσεις που εμφανίζουν εκλεκτική τοξικότητα και εξειδικευμένη μάλλον δράση σε υποκυτταρικό επίπεδο. Επίσης τα οργανικά μυκητοκτόνα με εξειδικευμένη δράση έχουν προστατευτική και θεραπευτική δράση. [10]

1.2.2.2.5 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι αντιμικροβιακές ενώσεις που παράγονται από μικροοργανισμούς και είναι τοξικές, σε χαμηλή συγκέντρωση σε άλλους μικροοργανισμούς. Επίσης πολλά αντιβιοτικά δρουν στην βιοσύνθεση των πρωτεϊνών. Η χημική δομή των περισσότερων αντιβιοτικών είναι πολύπλοκη. [2,8]

Παρ' ότι πολλά αντιβιοτικά έχουν επιτύχει καταπολέμηση ασθενειών των φυτών σε πειραματική κλίμακα στη γεωργική πράξη, λίγα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται, λόγω της τιμής τους (υψηλό κόστος παρασκευής) που είναι στις περισσότερες περιπτώσεις υψηλότερη από την τιμή των συνθετικών φυτοφαρμάκων, αλλά κυρίως λόγω της απροθυμίας εφαρμογής στη γεωργία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην ιατρική (εξαιτίας του κινδύνου ανάπτυξης ανθεκτικών στελεχών παθογόνων για τον άνθρωπο). Επίσης, λόγω της αποτελεσματικότητας των αντιβιοτικών απέναντι σε βακτηριολογικές και μυκητολογικές ασθένειες των φυτών, υπάρχει ένα ενδιαφέρον πεδίο έρευνας, στο οποίο όμως οι επιχειρήσεις διστάζουν να εισέλθουν εξαιτίας της σχετικής ευαισθησίας της αγοράς. Άλλοι περιορισμοί στη χρήση των αντιβιοτικών είναι η δυσκολία στην ταυτοποίησή τους, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για μίγμα ενώσεων, και η εμφάνιση ανθεκτικών στελεχών λόγω του εξειδικευμένου βιοχημικού μηχανισμού δράσης τους. [4,5,12,13]

Κατά κανόνα τα αντιβιοτικά είναι διασυστηματικά φάρμακα. Ανάλογα με την αποτελεσματικότητά τους στην καταπολέμηση βακτηρίων ή μυκήτων, διακρίνονται σε αντιβακτηριακά (antibacterial) και αντιμυκητικά (antifungal).

1) Αντιβακτηριακά

Τα αντιβακτηριακά είναι αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση φυτοπαθογόνων βακτηρίων (προκαρυωτικοί οργανισμοί). Τα πιο σημαντικά από αυτά είναι: η στρεπτομυκίνη (streptomycin), οι τετρακυκλίνες : *οξυτετρακυκλίνη* (oxytetracycline) ή *τερραμυκίνη* (terramicin) και *χλωροτετρακυκλίνη* (chlorotetracycline) και η νοβοβιοσίνη (novobiocin).

2) Αντιμυκητικά

Πολλά από τα αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν κυτταρικές λειτουργίες σε ευκαρυωτικούς οργανισμούς είναι τοξικά για τους μύκητες, αλλά η χρήση αντιβιοτικών για την καταπολέμηση φυτοπαθογόνων μυκήτων είναι πολύ μικρή. Τα πιο σημαντικά

από αυτά είναι: η *κασουγκαμυκίνη* (*kasugamycin*), η βλαστισιδίνη (*blasticidin*), οι πολυοξίνες, το κυκλοεξιμίδιο και τα πολυένια.

Τα αντιμυκητικά δρουν ως παρεμποδιστές της πρωτεϊνικής σύνθεσης στα ευκαρυωτικά (80S) ριβοσώματα (η *κασουγκαμυκίνη* και στα προκαρυωτικά ριβοσώματα), παρεμποδίζοντας έτσι την μετάφραση, η οποία γίνεται στα ριβοσώματα και είναι εργασία απολύτως απαραίτητη για όλων των ειδών τους οργανισμούς. Συνεπώς παρεμποδίζουν την πρωτεϊνική σύνθεση στα φυτά.. Από άποψη εκλεκτικής τοξικότητας τα αντιμυκητικά αντιβιοτικά υστερούν σε σχέση με τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά. Αυτό συμβαίνει επειδή τα ριβοσώματα των βακτηρίων είναι μικρότερα (70S) και έτσι τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά παρεμποδίζουν την πρωτεϊνική σύνθεση των βακτηρίων, χωρίς όμως να επηρεάζουν τη μετάφραση στα ευκαρυωτικά ριβοσώματα (στα κύτταρα των φυτών) που είναι μεγαλύτερα (80S). Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι τα αντιβακτηριακά αντιβιοτικά (π.χ. στρεπτομυκίνη) ως παρεμποδιστές μπορεί να έχουν κάποια επίδραση στους ευκαρυωτικούς οργανισμούς, αφού παρεμποδίζουν την πρωτεϊνική σύνθεση των μιτοχονδρίων και των χλωροπλάστων που επιτελείται σε ριβοσώματα 70S, όμοια με τα ριβοσώματα των βακτηρίων. [2,8]

1.2.2.2.6 Αντιπαθογονικά Μυκητοκτόνα

Τα αντιπαθογονικά είναι ενώσεις που παρεμποδίζουν την ανάπτυξη και εξέλιξη μιας ασθένειας χωρίς να είναι άμεσα τοξικές στο παθογόνο ή σε άλλους οργανισμούς. Η δράση των ενώσεων αυτών οφείλεται είτε α) στην παρεμπόδιση λειτουργιών του παθογόνου που δεν είναι απαραίτητες για την επιβίωση και την ανάπτυξή του, είναι όμως απαραίτητες για την παθογένεση και την πρόκληση της ασθένειας, είτε β) στην αύξηση της αντοχής του φυτού στο παθογόνο υποβοηθώντας τους μηχανισμούς άμυνάς του.

Χαρακτηριστικοί εκπρόσωποι της κατηγορίας αυτής είναι:

- τα 2-αμινοπυριδινικά (παρεμποδίζουν το σχηματισμό της πλάκας συγκρατήσεως),
- οι παρεμποδιστές βιοσύνθεσης της μελανίνης (οι οποία είναι απαραίτητη για τη σκλήρυνση της πλάκας συγκρατήσεως – προσκολλησεως),
- οι παρεμποδιστές της εφυμενιδάσης (η οποία είναι ένα λυτικό ένζυμο που εκκρίνεται από τα παθογόνα και διασπάει το προστατευτικό σώμα της επιφάνειας των υπέργειων οργάνων των φυτών),

- το fosetyl-Al, το οποίο φαίνεται ότι εκτός από την απευθείας τοξική του δράση στο παθογόνο, επάγει και μηχανισμούς άμυνας του φυτού, όπως την παραγωγή πολυφαινολών.
- το probenazole το οποίο πιστεύεται ότι επάγει μηχανισμούς αναγνώρισεως μεταξύ ξενιστή (φυτού) και παθογόνου που οδηγούν στην παραγωγή μυκητοκτόνων ενώσεων από το φυτό. [2,8]

1.2.2.2.7 Βιο-αντιπαθογονικά Μυκητοκτόνα

Με τον όρο βιο-αντιπαθογονικά αναφερόμαστε στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν ως δραστικό παράγοντα ανταγωνιστικούς ή παρασιτικούς μικροοργανισμούς (βακτήρια, μύκητες) των φυτοπαθογόνων τα οποία χρησιμοποιούνται στην καταπολέμηση των ασθενειών των φυτών. Η καταπολέμηση των παθογόνων μικροοργανισμών με μικροοργανισμούς που τους παρασιτούν ή τους ανταγωνίζονται, ή με ιούς, γίνεται σήμερα με επιτυχία σε λίγες μόνο περιπτώσεις. Παρ' όλα αυτά όμως τελευταία ερευνητικά δεδομένα σε συνδυασμό με την αυξανόμενη εφαρμογή των μεθόδων της μοριακής βιολογίας και της γενετικής μηχανικής στη φυτοπροστασία, επιτρέπουν κάποια αισιοδοξία. Αυτό που επιδιώκεται είναι η προώθηση των βιολογικών παραγόντων που βοηθούν στον περιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών, σε συνδυασμό με τη χρήση μικρότερων ποσοτήτων χημικών μέσων. Αυτό θα συντελέσει στη διατήρηση της αποτελεσματικότητας και των μυκητοκτόνων και των παραγόντων βιολογικής καταπολέμησης για μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα. [2,9,10]

1.2.3 Ζιζανιοκτόνα

Με τον όρο «ζιζάνιο» (weed) εννοούμε κάθε φυτό που δεν καλλιεργείται και αναπτύσσεται όπου και όταν δεν είναι επιθυμητό. Τα ζιζάνια ανταγωνίζονται τα καλλιεργούμενα φυτά για νερό, φως, χώρο και θρεπτικά στοιχεία, υποβαθμίζοντας την ποιότητα των γεωργικών προϊόντων και την ποσοτική απόδοση της καλλιέργειας.

Η αντιμετώπιση των ζιζανίων μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες μεθόδους, όπως με την εφαρμογή καλλιεργητικών τεχνικών, την εφαρμογή βιολογικών μέσων (βιοζιζανιοκτόνα) και χημικών ενώσεων. Όμως αν και η τάση στη φυτοπροστασία είναι η μείωση της χρήσης χημικών σκευασμάτων, η αντικατάστασή τους με άλλες εναλλακτικές μεθόδους φυτοπροστασίας (δημιουργία ποικιλιών καλλιεργούμενων

φυτών ανθεκτικών στα ζιζάνια) δεν φαίνεται να μπορεί να επιτευχθεί τουλάχιστον στην επιχειρηματική γεωργία. Η αντιμετώπιση των ζιζανίων σήμερα στηρίζεται στη χρήση κυρίως συνθετικών χημικών ουσιών (ζιζανιοκτόνων), οι οποίες αυτούσιες ή σε μίγματα μπορούν να επιβραδύνουν ή να παρεμποδίσουν την ανάπτυξη των ζιζανίων.

Σημαντικές προσπάθειες γίνονται τα τελευταία χρόνια για τη δημιουργία ποικιλιών των καλλιεργούμενων φυτών ανθεκτικών σε ζιζανιοκτόνα για την ασφαλέστερη αξιοποίηση αποτελεσματικών ζιζανιοκτόνων. Προς την κατεύθυνση αυτή έχουν συμβάλει οι εξελίξεις της γενετικής μηχανικής και σήμερα είναι σχετικά εύκολο να δημιουργήσουμε ανθεκτικά φυτά με τροποποιημένη τη θέση δράσης του ζιζανιοκτόνου, ή με εισαγωγή γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα αποδόμησης των ζιζανιοκτόνων. [2,10,14,15,16]

Ταξινόμηση με βάση το βιοχημικό μηχανισμό δράσης

1.2.3.1 Ζιζανιοκτόνα με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες

- 1) Ανόργανα ζιζανιοκτόνα (π.χ. ένυδρος θειϊκός χαλκός $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
- 2) Οργανικά ζιζανιοκτόνα πολλαπλής δράσης (π.χ. βρωμιούχο μεθύλιο)
- 3) Οργανικές ενώσεις του αρσενικού (π.χ. dimethylarsinic acid)
- 4) Άλλα οργανικά ζιζανιοκτόνα (π.χ. cyanamide)

1.2.3.2 Ζιζανιοκτόνα με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες

- 1) Παρεμπόδιση της φωτοσύνθεσης και των σχετικών με τη φωτοσύνθεση λειτουργιών
 - α) Παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος II (PS II)
 - β) Παρεμποδιστές της μεταφοράς ηλεκτρονίων από το PS II στο PS I
 - γ) Παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος I (PS I)Στους παρεμποδιστές του φωτοσυστήματος I (PS I) ανήκουν τα ζιζανιοκτόνα της ομάδας των διπυριδιλίων. Χαρακτηριστικές ενώσεις της ομάδας των διπυριδιλίων είναι το *paraquat* και το *diquat*. [2,10,16]
 - δ) Παρεμποδιστές της φωτοσυνθετικής φωσφορυλίωσης
 - ε) Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης χλωροφύλλης (π.χ. ethoxyfen)
 - στ) Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης καροτενοειδών

Στην κατηγορία αυτή υπάγονται οι ενώσεις aclonifen, amitrole (αμινοτριαζόλη) και clomazone.

ζ) Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της πλαστοκινόνης (π.χ. pyrazoxyfen)

2) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης αμινοξέων

α) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του πυροσταφυλικού (π.χ. benzosulfuron, imazamox, florasulam, pyriftalid, propoxycarbazone)

β) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης αρωματικών αμινοξέων (π.χ. glyphosate)

γ) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του γλουταμινικού (π.χ. gluphosinate)

δ) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης αμινοξέων της ομάδας του ασπαρτικού (π.χ. cinmethylin)

3) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων

α) Παρεμποδιστές της καρβοξυλάσης του ακέτυλο-CoA (π.χ. clodinafop)

β) Παρεμποδιστές της επιμήκυνσης των λιπαρών οξέων (π.χ. thiobencarb)

4) Παρεμπόδιση της διαίρεσης των κυττάρων

α) Παρεμποδιστές του πολυμερισμού της τουμπουλίνης (π.χ. nitranilin, probyzamide, butamifos, chlorthal)

β) Παρεμποδιστές του κέντρου οργάνωσης των μικροσωληνίσκων της μιτωτικής ατράκτου (π.χ. barban)

γ) Άλλοι παρεμποδιστές της κυτταρικής διαίρεσης (π.χ. acetochlor, propachlor)

5) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος

α) Βενζονιτρίλια (π.χ. chlorthiamid)

β) Άλλα (π.χ. isoxaben)

6) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης βιταμινών (π.χ. asulam)

7) Δράση στο φυτοορμονικό σύστημα

α) Ζιζανιοκτόνα με δράση αυξίνης (π.χ. 2,4-D, MCPA, dinoben)

β) Ζιζανιοκτόνα που παρεμποδίζουν τη δράση της αυξίνης (π.χ. chlofenprop)

8) Ζιζανιοκτόνα με άγνωστο μηχανισμό δράσης (π.χ. fosamine)

9) Φυσικές ενώσεις ή ανάλογα φυσικών ενώσεων με ζιζανιοκτόνο δράση (π.χ. bilanaphos) [2,10,16,17]

1.2.3.3 Βιο-ζιζανιοκτόνα

Η αντιμετώπιση των ζιζανίων με τη χρήση άλλων οργανισμών, όπως εντόμων και άλλων ζωικών παρασίτων, φυτοφάγων ψαριών, παθογόνων και ανταγωνιστικών φυτών ονομάζεται βιολογική καταπολέμηση των ζιζανίων. Στην βιολογική καταπολέμηση των ζιζανίων διακρίνουμε δύο προσεγγίσεις: α) του κλασσικού βιολογικού ελέγχου και β) των βιο-ζιζανιοκτόνων. [2,10,16]

1.2.3.4 Αντιφυτοτοξικές ενώσεις (Safeners)

1.2.4 Εντομοκτόνα – Ακαρεοκτόνα – Νηματοδωκτόνα

Η γεωργική παραγωγή υφίσταται σοβαρές ζημιές από τη δραστηριότητα μεγάλου αριθμού επιβλαβών φυτοφάγων εντόμων, ακάρεων και νηματωδών σκωλήκων, τα οποία είτε μειώνουν σημαντικά, είτε καταστρέφουν ολοσχερώς τη γεωργική παραγωγή.

Η αντιμετώπιση των ζωικών εχθρών των καλλιεργειών γίνεται κύρια με τη χρήση χημικών ουσιών και σε μικρότερη κλίμακα με την εφαρμογή βιολογικών μεθόδων ή μηχανικών μέσων (συλλογή, παγίδες) ή φυσικών μέσων (θερμότητα) ή καλλιεργητικές τεχνικές (αμειψισπορά, χρήση ανθεκτικών ποικιλιών). Σε πολλές δε περιπτώσεις η εφαρμογή χημικών μέσων, αποτελεί ίσως τη μοναδική μέθοδο αντιμετώπισης πολλών επιβλαβών εντόμων και άλλων ζωικών εχθρών στη γεωργία, ιδιαίτερα όταν οι συνθήκες ευνοούν την ανάπτυξη μεγάλων πληθυσμών. Η συμβολή των χημικών ενώσεων ήταν και εξακολουθεί να είναι πολύ σημαντική για τη μείωση των οικονομικών ζημιών από την προσβολή των φυτών και των παραγωγικών ζώων από τους εντομολογικούς εχθρούς, αλλά και για την προστασία της υγείας του ανθρώπου από εντομομεταδιδόμενες ασθένειες.

Εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματωδόκτονα είναι φυσικές ή συνθετικές χημικές ουσίες οι οποίες μπορούν να θανατώσουν ή να παρεμποδίσουν ή να επηρεάσουν τη συμπεριφορά και την εξέλιξη των ζωικών εχθρών των καλλιεργειών προς όφελος του παραγωγού. [2,7,18]

Ταξινόμηση με βάση το βιοχημικό μηχανισμό δράσης και τη βιοχημική δομή

Τα εντομοκτόνα, ακαρεοκτόνα, νηματωδόκτονα θα διακριθούν κατ' αρχήν σε εκείνα που δεν έχουν εξειδικευμένη δράση και που επηρεάζουν πολλές φυσιολογικές

λειτουργίες και σε εκείνα που χαρακτηρίζονται από εξειδικευμένη δράση στο υποκυτταρικό επίπεδο και επηρεάζουν εξειδικευμένα κάποια μεταβολική ή φυσιολογική λειτουργία των εχθρών των φυτών. Στη συνέχεια οι ενώσεις της πρώτης κατηγορίας περιγράφονται με βάση τη χημική τους δομή, ενώ της δεύτερης κατηγορίας με βάση τη λειτουργία που επηρεάζουν και τη χημική τους δομή. [2]

1.2.4.1 Ενώσεις με πολλαπλή δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν ανόργανες και οργανικές ενώσεις που δεν έχουν κάποιο εξειδικευμένο μηχανισμό δράσης στο υποκυτταρικό επίπεδο ή σε συγκεκριμένες φυσιολογικές και μεταβολικές λειτουργίες των εντόμων, ακάρεων ή νηματωδών.

- 1) Ανόργανες ενώσεις
- 2) Οργανικές ενώσεις πολλαπλής δράσης [18]

1.2.4.2 Ενώσεις με εξειδικευμένη δράση στις κυτταρικές και φυσιολογικές λειτουργίες

Η κατηγοριοποίηση που θα ακολουθήσει έγινε με βάση τη μεταβολική διεργασία ή τις φυσιολογικές λειτουργίες που επηρεάζουν, καθώς και με βάση τη χημική ομάδα που ανήκουν.

- 1) Ενώσεις που παρεμποδίζουν το νευρικό σύστημα
- 2) Παρεμπόδιση συστημάτων παραγωγής ενέργειας
- 3) Παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των λιπιδίων
- 4) Παρεμπόδιση της ανάπτυξης και εξέλιξης (Ρυθμιστές ανάπτυξης των εντόμων)
 - α) Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης της χιτίνης
 - i) Συνθετικές οργανικές ενώσεις με δράση στη βιοσύνθεση της χιτίνης. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται τα βενζολικά παράγωγα της ουρίας και οι ενώσεις της ομάδας των αζινών.
 - Βενζοϋλουρίες ή Ακυλουρίες (π.χ. diflubenzuron, lufenuron)
 - Αζίνες (π.χ. buprofezin, cyromazine)
 - ii) Οργανικές ενώσεις φυσικής προέλευσης με δράση στη βιοσύνθεση της χιτίνης: νικκομυκίνες.

- β) Ενώσεις που επηρεάζουν τη λειτουργία του ενδοκρινικού συστήματος (π.χ. fenoxycarb)
- 5) Παρεμπόδιση της λειτουργίας του μυϊκού συστήματος (π.χ. flubendiamide)
- 6) Δράση στη συμπεριφορά των εντόμων κι άλλων ζωικών εχθρών
- 7) Συνθετικές ενώσεις με άγνωστο μηχανισμό δράσης (π.χ. benzoaximate, pyridalyl)
- 8) Φυσικές ενώσεις με άγνωστο μηχανισμό δράσης (π.χ. πολυακτίνες) [2,7,18]

1.2.4.3 Βιολογικά σκευάσματα με εντομοκτόνο δράση (biological insecticide)

Τα αρθρόποδα, όπως και όλοι οι οργανισμοί, μπορούν να προσβληθούν από ασθένειες που οφείλονται σε παθογόνα. Οι προσπάθειες για τη χρήση παθογόνων για την καταπολέμηση των εντόμων έχουν εντατικοποιηθεί τις τελευταίες δεκαετίες, με στόχο την ανάπτυξη μιας περισσότερο περιβαλλοντικής καταπολέμησης των φυτοπαρασίτων στη γεωργία. [2,19]

1.2.4.4 Συνεργιστές εντομοκτόνων

1.2.5 Φυτορυθμιστικές ουσίες

Στα φυτά υπάρχουν ουσίες που παράγονται και κυκλοφορούν μέσα σε αυτά, ρυθμίζοντας κατάλληλα τις διάφορες λειτουργίες και αντιδράσεις τους στα διάφορα ερεθίσματα του περιβάλλοντος και καθορίζουν τη μορφολογία του φυτού ή των φυτικών οργάνων. Οι ουσίες αυτές ονομάστηκαν αρχικά φυτομόνες (phytohormones ή plant hormones). Σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία για τις ουσίες αυτές επικρατεί ο όρος plant growth regulators που αποδίδεται ως «Φυτορυθμιστικές ουσίες».

Είναι πάρα πολλές οι φυσιολογικές λειτουργίες και διεργασίες που αποδεδειγμένα ελέγχονται μέσω των φυτορυθμιστικών ουσιών στα φυτά. Θα μπορούσαν να αναφερθούν ενδεικτικά, η ρύθμιση της δραστηριότητας των ενζύμων, η υποκίνηση ή παρεμπόδιση της σύνθεσης του DNA, η υποκίνηση αλλαγών στις ιδιότητες των κυτταρικών μεμβρανών καθώς κι ο έλεγχος της κυτταρικής διαίρεσης. Η απομόνωση των φυτορυθμιστικών ουσιών από τα φυτά και η σύνθεση στο εργαστήριο των ίδιων ουσιών ή χημικών αναλόγων τους, έδωσε τη δυνατότητα στους επιστήμονες να επεμβαίνουν και να τροποποιούν την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτών σε όλα τα στάδια του βιολογικού τους κύκλου, από την βλάστηση του σπόρου μέχρι τη συντήρηση των καρπών στην αποθήκη και από την υποκίνηση της άνθισης μέχρι την

ωρίμανση της παραγωγής. Τα τελευταία χρόνια οι φυτορυθμιστικές ουσίες χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο για την αύξηση της παραγωγής και την βελτίωση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων, ιδιαίτερα στους τομείς της λαχανοκομίας, δένδροκομίας και ανθοκομίας. Συμβάλλουν επίσης στις προσπάθειες για μείωση του κόστους παραγωγής, στην αντικατάσταση των εργατικών χεριών, στην παραγωγή προϊόντων εκτός εποχής και στην ολική ή μερική υποκατάσταση δύσκολων καλλιεργητικών εργασιών και φροντίδων. [2,20]

1.2.5.1 Ορισμός, διάκριση και σημασία των φυτορυθμιστικών ουσιών

Σήμερα ορίζεται σαν φυτορυθμιστική ουσία, μια οργανική ουσία που δεν είναι θρεπτικό συστατικό, δεν παρέχει δηλαδή στο φυτό ενέργεια ή απαραίτητα μεταλλικά στοιχεία και που σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις ($<1 \text{ mM}$) προάγει, παρεμποδίζει ή τροποποιεί ποιοτικά την αύξηση και την ανάπτυξη του φυτού (Moore, 1979).

Οι φυτορυθμιστικές ουσίες διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τις φυσικές και τις συνθετικές.

Φυσικές φυτορυθμιστικές ουσίες είναι εκείνες που παράγονται σε ορισμένα μέρη του φυτού και μπορούν από εκεί να μετακινούνται και σε άλλα μέρη προκαλώντας ειδικές βιοχημικές, φυσιολογικές ή μορφολογικές αντιδράσεις. Δρουν τόσο στους ιστούς στους οποίους παράγονται όσο και σε απόσταση από αυτούς. Στη διεθνή βιβλιογραφία αναφέρονται ακόμη σαν φυτορμόνες εξαιτίας της ομοιότητας, όσον αφορά τη δράση τους στα φυτά, με τις ορμόνες του ανθρώπου και των ζώων. Οι φυσικές φυτορυθμιστικές ουσίες είναι φυτικά προϊόντα που παράγονται από τα φυτά και μπορούν με κατάλληλες μεθόδους να εξαχθούν και να προσδιοριστούν.

Συνθετικές φυτορυθμιστικές ουσίες είναι οι ουσίες που παράγονται τεχνικά και μπορεί να μοιάζουν χημικά με τις φυσικές. Δρουν κατά τον ίδιο τρόπο με τις φυσικές δηλαδή σαν χημικοί αγγελιοφόροι μέσα στο φυτό όταν εφαρμοστούν με τον κατάλληλο τρόπο και στον κατάλληλο χρόνο. [20]

1.2.5.2 Ταξινόμηση των φυτορυθμιστικών ουσιών

Με τα σημερινά δεδομένα οι φυτορυθμιστικές ουσίες μπορούν να ταξινομηθούν σε μεγάλες ομάδες με βάση τη φυσιολογική τους δράση ή την χημική τους δομή.

Πίνακας 1.2 Ταξινόμηση των βασικών φυτορρυθμιστικών ουσιών. [20]

Κατηγορία φυτορρυθμιστικών ουσιών	Φυσικές	Συνθετικές
Αυξίνες	IAA	IBA, NAA
Γιββερελλίνες	Gibberellic acid (GA ₃)	Gibberellin A ₄ , A ₇
Κυτοκινίνες	zeatin	kinetin
Αμπισισικό οξύ	Absisic acid (ABA)	-
Αιθυλένιο	Αιθυλένιο (C ₂ H ₄)	ethephon
Φυτόχρωμα	φυτόχρωμα	-
Μπρασινοστεροειδή	brassinolide	-
Πολυαμίνες	Putrescine, spermidine	-
Μορφακτίνες	-	chlorflurenol, flurenol
Επιβραδυντές αύξησης	-	<i>chlormequat chloride, daminozide, mepiquat chloride</i>
Παραμποδιστές της κυτταρικής διαίρεσης	-	Chlopropham, propham, <i>maleic hydrazide</i>
Γαμετοκτόνα	-	2,3-dichloro-isobutylic acid
Καταστροφείς των κορυφών των βλαστών	-	dikegulak sodium, <i>maleic hydrazide</i>
Αποφυλλωτικά	-	merphos, thidiazuron
Αποξηραντικά	-	<i>diquat, paraquat</i>
Αντίδοτα ζιζανιοκτόνων	-	naphthalic anhydride
Αντιδιαπνευστικά	CO ₂	silicone, <i>chlormequat chloride</i>

1.2.5.2.1 Επιβραδυντές αύξησης (growth retardants)

Οι επιβραδυντές αύξησης (growth retardants) είναι μια μεγάλη ομάδα συνθετικών φυτορρυθμιστικών ουσιών. Χαρακτηριστικές ενώσεις αυτής της ομάδας είναι: το *chlormequat chloride*, το *daminozide*, και το *mepiquat chloride* που ανήκουν στην ομάδα των τεταρτοταγών ενώσεων του καρβαμιδικού αμμωνίου (quaternary ammonium). Όταν εφαρμοστούν στα φυτά, επιβραδύνουν το ρυθμό της επιμήκυνσης των βλαστών, μειώνουν το τελικό τους μήκος λόγω μείωσης του μήκους των

μεσογονάτιων διαστημάτων, επιτείνουν την ένταση του πράσινου χρώματος των φύλλων και έμμεσα επηρεάζουν την άνθηση λόγω περιορισμού της βλαστικής ανάπτυξης, χωρίς όμως να προκαλούν μορφολογικές παραμορφώσεις στα φυτά (Cathey, 1964). Εκτός αυτών αναφέρεται ότι είναι δυνατόν να ισχυροποιήσουν τα στελέχη και το ριζικό σύστημα των φυτών.

Γενικά, ό όρος «επιβραδυντής αύξησης» χρησιμοποιείται για όλες τις χημικές ουσίες που επιβραδύνουν την κυτταρική διαίρεση και επιμήκυνση στους ιστούς των βλαστών των φυτών, ρυθμίζοντας έτσι φυσιολογικά το ύψος των φυτών, χωρίς να έχουν άλλη επίδραση στη μορφολογία τους.

Όσον αφορά τη σχέση που υπάρχει μεταξύ της δραστηρότητας ενός επιβραδυντή αύξησης και της χημικής σύστασής του, υπάρχουν ενδείξεις ότι όσο λιγότερες χημικές ρίζες και χαμηλότερο μοριακό βάρος έχει μια ένωση που έχει επιβραδυντικές της αύξησης ιδιότητες τόσο πιο μεγάλη είναι η δραστηρότητά της. [2,20,21]

Αποτελέσματα της δράσης των επιβραδυντών αύξησης στα φυτά

1. Επιβράδυνση της κυτταρικής διαίρεσης και της επιμήκυνσης των κυττάρων.
2. Επιβράδυνση της επιμήκυνσης των βλαστών.
3. Παρεμπόδιση ή καθυστέρηση της ανάπτυξης των ριζών.
4. Επιτάχυνση του σχηματισμού ανθικών καταβολών και καθυστέρηση της βλαστικής ανάπτυξης.
5. Επηρεασμός στον χρόνο άνθησης και στο φύλο ανθέων
6. Αντοχή των φυτών στις διάφορες καταπονήσεις (ξηρασία, ψύχος, υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων στο έδαφος).

Πρέπει όμως να επισημανθεί ότι η αποτελεσματικότητα των επιβραδυντών αύξησης εξαρτάται από το σωστό ή όχι τρόπο εφαρμογής τους γιατί με την μη ορθολογική χρήση τους προκαλείται ανεπιθύμητος νανισμός στα φυτά ενώ όταν η εφαρμογή γίνεται από το έδαφος, πριν τα φυτά προφθάσουν να αναπτύξουν το ριζικό τους σύστημα, μπορεί να προκληθεί μεγάλη μείωση της ανάπτυξης των ριζών με δυσμενείς συνέπειες για ολόκληρο το φυτό. [20]

Τρόπος δράσης των επιβραδυντών αύξησης

Η δράση των επιβραδυντών αύξησης εκδηλώνεται κυρίως όταν οι ουσίες αυτές εφαρμόζονται σε ολόκληρα φυτά. Είναι γενικά αποδεκτό ότι, οι επιβραδυντές αύξησης ανταγωνίζονται τη δράση των γιββερελλινών (φυσικές φυτορρυθμιστικές ουσίες που επάγουν την επιμήκυνση και αύξηση των κυττάρων). Ο ανταγωνισμός αυτός στηρίζεται κυρίως στην παρεμπόδιση της βιοσύνθεσης των γιββερελλινών σε κάποιο στάδιο της όλης διαδικασίας και όχι στην παρεμπόδιση της ίδιας της δράσης τους σαν φυτορρυθμιστικές ουσίες.

1.2.5.2.2 Παρεμποδιστές της αύξησης (growth inhibitors)

Στην ομάδα αυτή ανήκουν φυτορρυθμιστικές ουσίες που παρεμποδίζουν την κυτταρική διαίρεση στις μεριστωματικές ζώνες του φυτού, εμποδίζοντας έτσι την αύξηση και την ανάπτυξή του. (π.χ. maleic hydrazide). Χρησιμοποιούνται σε περιπτώσεις όπου η αφαίρεση των πλευρικών βλαστών είναι εργασία δαπανηρή αλλά και απαραίτητη. [2,20]

1.2.5.2.3 Γαμετοκτόνα (gameticides)

Τα γαμετοκτόνα είναι φυτορρυθμιστικές ουσίες που παρεμποδίζουν την βλάστησης ή την παραγωγή της γύρης, γι' αυτό θα μπορούσαν να ονομαστούν φονείς ή καταστροφείς της γύρης (π.χ. maleic hydrazide). Οι φυτορρυθμιστικές αυτές ουσίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την αρρενοστείρωση φυτών και έχουν σημαντικό ρόλο στη βελτίωση των δημητριακών και στην παραγωγή σπόρων υβριδίων. Επίσης χρησιμοποιούνται και σε περιπτώσεις που η παραγωγή καρπών από τα φυτά είναι ανεπιθύμητη, όπως για παράδειγμα σε δενδροστοιχίες πεζοδρομίων, νησίδων, πλατειών, πάρκων και γενικότερα αστικού και περιαστικού πρασίνου.

1.2.5.2.4 Καταστροφείς των κορυφών των βλαστών

Οι φυτορρυθμιστικές αυτές ουσίες (π.χ. maleic hydrazide) λέγονται και ουσίες χημικού κλαδεύματος και επιτυγχάνουν τον σκοπό τους:

- A) Μειώνοντας εκλεκτικά τη δραστηριότητα του κορυφαίου μεριστώματος ή σκοτώνοντάς το.
- B) Παρεμποδίζοντας προσωρινά την επικράτηση του ακραίου οφθαλμού επιτρέποντας έτσι την έκπτυξη των πλάγιων οφθαλμών.

1.2.5.2.5 Αποφυλλωτικά – Καρποπτώτικά

Η αποκόλληση φυτικών οργάνων από ένα φυτό, όπως φύλλων, καρπών, ανθέων κ.λ.π., είναι μία φυσιολογική διαδικασία μεγάλης σημασίας για τον έλεγχο και τον συντονισμό της αύξησης. Η διαδικασία αυτή μπορεί να επιταχυνθεί ή να καθυστερήσει με την χρησιμοποίηση ορισμένων σύνθετων φυτορρυθμιστικών ουσιών (π.χ. daminozide)

1.2.5.2.6 Αποξηραντικά (desiccants)

Στην κατηγορία των αποξηραντικών υπάγονται ενώσεις που επιταχύνουν την αποξήρανση φυτικών τμημάτων. Ενώσεις που χρησιμοποιούνται ή χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν ως αποξηραντικά είναι διάφορες ανόργανες και οργανικές ενώσεις. Σε πολλές περιπτώσεις στη γεωργική πράξη είναι επιθυμητή η αποξήρανση μιας καλλιέργειας (desiccation) λίγο πριν την συγκομιδή, ώστε να διευκολυνθεί η διαδικασία μηχανικής συλλογής των προϊόντων ή για να αποφευχθεί η πρόσμιξη με φυτικούς ιστούς που μπορεί να χρωματιστούν και να μειώσουν την εμπορική αξία του προϊόντος. Τέτοιες καλλιέργειες είναι κυρίως εκείνες στις οποίες το συγκομιζόμενο προϊόν είναι ο σπόρος τους, όπως τα ψυχανθή, τα μπιζέλια, οι φακές, η σόγια, ο ηλίανθος και η πατάτα στην οποία το συγκομιζόμενο προϊόν είναι οι κόνδυλοι.

Με την εφαρμογή των αποξηραντικών οι φυτικοί ιστοί αφυδατώνονται, πολλές φορές τόσο γρήγορα, που δεν σχηματίζεται ζώνη αποκόλλησης και παραμένουν στους βλαστούς των φυτών. Το πλεονέκτημα των αποξηραντικών έναντι των αποφυλλωτικών είναι ότι εφαρμόζονται αργότερα με αποτέλεσμα να αξιοποιείται περισσότερος χρόνος από τη φυλλική επιφάνεια για φωτοσύνθεση και κατά συνέπεια για τη βελτίωση της ποιότητας των γεωργικών προϊόντων και την αύξηση της απόδοσης της καλλιέργειας.

Εκτός από την ευκολία συγκομιδής που επιτυγχάνεται με την αποξήρανση, επιτυγχάνεται και η ωρίμανση της παραγωγής. Αποξήρανση του φυλλώματος γίνεται και στο βαμβάκι με σκοπό, όπως και στην αποφύλλωση, την απομάκρυνση των φύλλων και την ευκολότερη μηχανική συλλογή των καψών καθώς και στις πατάτες, το ρύζι και το σοργό.

Για την αποξήρανση των καλλιεργειών χρησιμοποιούνται συνθετικές φυτορρυθμιστικές ουσίες που ονομάζονται αποξηραντικά (desiccants). Πολλά αποξηραντικά είναι γνωστά ζιζανιοκτόνα επαφής, όπως το paraquat και το diquat. [2,20]

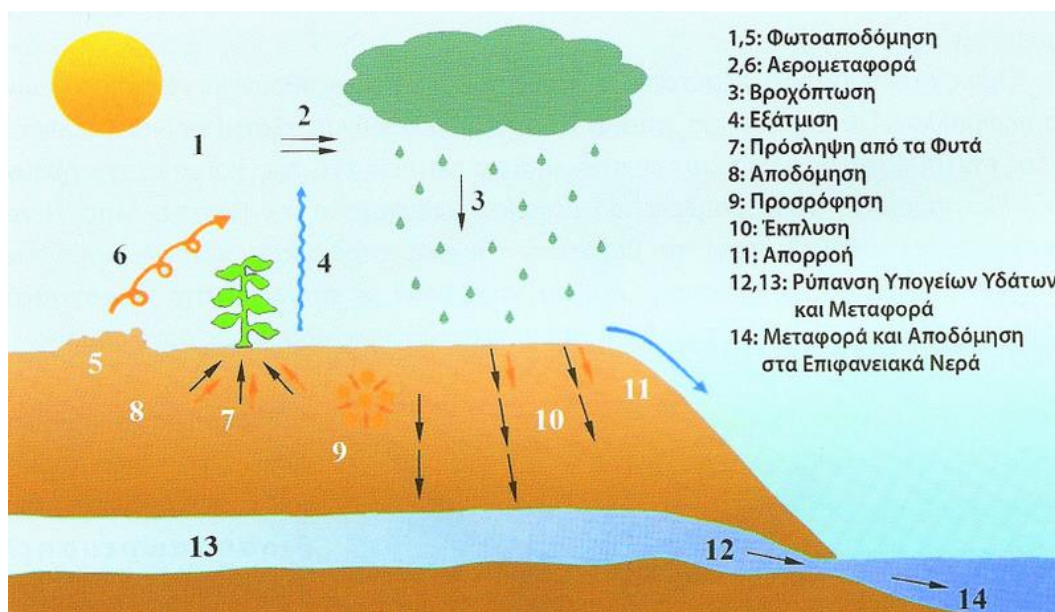
1.2.5.2.7 Αντιδιαπνευστικά

Στη σύγχρονη γεωργία σαν αντιδιαπνευστικό ορίζεται κάθε ουσία που όταν εφαρμόζεται σε ένα φυτό μπορεί να περιορίσει τη διαπνοή και κατά συνέπεια την απώλεια νερού από αυτό. Τα αντιδιαπνευστικά μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες: α) τα μεταβολικά αντιδιαπνευστικά που ρυθμίζουν το άνοιγμα των καταφρακτικών κυττάρων των στοματίων, (π.χ. chlormequat chloride, daminozide) β) εκείνα που λειτουργούν με το σχηματισμό μεμβράνης στις φυλλικές επιφάνειες, που δεν επιτρέπει την διόδο του νερού, αλλά επιτρέπει τη διαίρεση του CO₂ (π.χ. cetyl alcohol, κήρος παραφίνης, silicone) και γ) σε εκείνα που αντανakλούν την ηλιακή ακτινοβολία μειώνοντας έτσι τη θερμότητα των φυτικών ιστών (π.χ. καολινίτης). Η χρήση των αντιδιαπνευστικών πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή κυρίως στα ετήσια φυτά, λόγω του ό,τι μπορεί να προκαλέσουν σημαντικές επιπτώσεις στη φωτοσύνθεση και κατά συνέπεια μείωση της παραγωγής. [2,20]

1.3 ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ

Αμέσως μετά την εφαρμογή τους τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα κατανέμονται στο περιβάλλον. Κατ' αρχήν τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα απελευθερώνονται στην ατμόσφαιρα. Μέσω αυτής μεταφέρονται στα φυτά, στο έδαφος και μέσω του αέρα σε γειτονικούς χώρους. Μάλιστα το 80% των προϊόντων που χρησιμοποιούνται στους ψεκασμούς δεν αξιοποιείται, είτε γιατί δε φτάνει ποτέ στα φυτά, είτε γιατί πριν προσκολληθεί και δράσει εκπλένεται από τα νερά της βροχής ή διασπάται από το φως.

Από τη στιγμή της εναπόθεσής τους, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα αρχίζουν κάτω από την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών, να υφίστανται ποιοτικές και ποσοτικές μεταβολές. Η αποικοδόμηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό συνήθως λιγότερο, αλλά και μερικές φορές περισσότερο, τοξικών για τους οργανισμούς ουσιών. Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα μεταφέρονται από το έδαφος στα φυτά μέσω του ριζικού συστήματος, ενώ με το νερό μεταφέρονται στα υπόγεια ύδατα, τις λίμνες και τις θάλασσες. Τέλος μέσω της τροφικής αλυσίδας, καταλήγουν στον άνθρωπο. Παραστατική απεικόνιση της τύχης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο περιβάλλον δίνεται στο σχήμα 1.6. [5,22,23,24]



Σχήμα 1.6. Διαγραμματική απεικόνιση της τύχης και της συμπεριφοράς των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στο περιβάλλον. [3]

Μεγαλύτερο πρόβλημα δημιουργείται από τις κατηγορίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων που μένουν σταθερά στο περιβάλλον (π.χ. χλωριωμένοι υδρογονάνθρακες, οι οποίοι έχουν στα μόριά τους αρωματικούς δακτυλίους) και συσσωρεύονται στους οργανισμούς εμφανίζοντας χρόνια τοξικότητα. Οι προκαλούμενες βλάβες είναι σοβαρές και είναι δυνατόν να μεταφερθούν και στους απογόνους. [25]

1.4 ΧΗΜΙΚΗ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΣΙΑ

Η συνεχώς εντεινόμενη απαίτηση για τη χρήση προϊόντων φυτοπροστασίας φιλικών προς το περιβάλλον και ακίνδυνων για το χρήστη και τον καταναλωτή, έχει οδηγήσει στη στροφή προς τη βιολογική φυτοπροστασία όσο και όπου είναι αυτή δυνατή. Στη βιολογική φυτοπροστασία εντάσσονται ανθεκτικές ποικιλίες φυτών σε ασθένειες και έντομα, βιολογικά παρασκευάσματα, ουσίες που διεγείρουν τους μηχανισμούς άμυνας των φυτών και βιοτεχνολογικές μέθοδοι. Οι μέθοδοι αυτοί σε συνδυασμό με καλλιεργητικές τεχνικές αποτελούν βασικό συστατικό των προγραμμάτων Ολοκληρωμένης Αντιμετώπισης των Εχθρών των καλλιεργούμενων φυτών (Integrated Pest Management, IPM) (ή αλλιώς Ολοκληρωμένη Φυτοπροστασία (Integrated Crop Protection, ICP) και της Ολοκληρωμένης Διαχείρισης των

Καλλιεργειών (Integrated Crop Management, ICM) που συνιστούν τις σύγχρονες τάσεις στη φυτοπροστασία και στη γεωργία γενικότερα. [5,19,26,27]

Η Ολοκληρωμένη Φυτοπροστασία (ICP) (αντιμετώπιση ή καταπολέμηση) είναι η ορθολογική εφαρμογή συνδυασμένων βιολογικών, βιοτεχνικών, χημικών, καλλιεργητικών ή φυτοβελτιωτικών μεθόδων και μέτρων, όπου η χρήση χημικώς συντιθέμενων φυτοπροστατευτικών προϊόντων περιορίζεται στο απολύτως απαραίτητο προκειμένου να διατηρηθεί ο πληθυσμός των επιβλαβών οργανισμών (έντομα, ακάρεα, ζιζάνια, μύκητες, βακτήρια, ιοί) σε επίπεδα τέτοια, ώστε να μην προκαλούνται οικονομικώς μη αποδεκτές ζημιές.. Η ολοκληρωμένη φυτοπροστασία δίνει έμφαση στην ανάπτυξη μιας υγιούς καλλιέργειας με την ελάχιστη δυνατή διαταραχή των αγροτικών οικοσυστημάτων και προάγει τους φυσικούς μηχανισμούς ελέγχου των επιβλαβών οργανισμών. (Σχήμα 1.7) [16,28,29]

1.5 ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΑ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

1.5.1 Γενικά

Τα υπολείμματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι ένας τομέας με μεγάλο ενδιαφέρον, που αφορά τη γεωργία, τη δημόσια υγεία, το διεθνές εμπόριο, τη βιομηχανία αγροχημικών και την ενόργανη χημική ανάλυση. Σύμφωνα με στοιχεία του Ευρωβαρόμετρου σχετικά με το πώς αντιλαμβάνονται οι Ευρωπαίοι τους διατροφικούς κινδύνους, οι Έλληνες καταναλωτές είναι ιδιαιτέρως ανήσυχοι (συγκριτικά με τους Ευρωπαίους) για τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε φρούτα, λαχανικά και δημητριακά (91% έναντι 72% του κοινοτικού μέσου όρου). Μάλιστα κατατάσσουν αυτόν τον κίνδυνο ως τον πρώτο και σημαντικότερο σε σχέση με όλους τους υπόλοιπους διατροφικούς κινδύνους, όπως κατά σειρά προέκυψαν στην έρευνα: υπολείμματα αντιβιοτικών και ορμονών στα κρέατα (87% έναντι 70% του κοινοτικού μέσου όρου), γενετικά τροποποιημένοι οργανισμοί (81% έναντι 66%), πρόσθετα-συντηρητικά (81% έναντι 66%), περιβαλλοντικοί ρύποι (π.χ. διοξίνες, υδράργυρος) (81% έναντι 69%) κ. ά. [5,30]

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθμ. 1107/2009 ως υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων ορίζονται μία ή περισσότερες ουσίες, παρούσες μέσα ή πάνω σε φυτά ή φυτικά προϊόντα, βρώσιμα ζωικά προϊόντα, πόσιμο νερό ή αλλού στο περιβάλλον, προερχόμενες από τη χρήση φυτοπροστατευτικού προϊόντος,

συμπεριλαμβανομένων των μεταβολιτών τους και των προϊόντων διάσπασης ή αντίδρασής τους. [31]

Η μελέτη των υπολειμμάτων αφορά πρωτίστως τα νωπά εδώδιμα γεωργικά προϊόντα (φρούτα, λαχανικά) για το λόγο ότι καταναλίσκονται σε μεγάλο ποσοστό όπως συγκομίζονται. Άλλες κατηγορίες γεωργικών προϊόντων που αποτελούν αντικείμενο μελέτης ως προς τα υπολείμματα των φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι τα βιομηχανικά φυτά (π.χ. ζαχαρότευτλα, βαμβάκι) και οι ζωοτροφές. [5]

Στις ζωοτροφές (χορτοδοτικά φυτά, κριθάρι, καλαμπόκι, κτηνοτροφικά τεύτλα ή υποπροϊόντα μεταποίησης γεωργικών προϊόντων) τα υπολείμματα μελετώνται ώστε να εκτιμηθεί η πιθανή λήψη από τα παραγωγικά ζώα με τη διατροφή και με βάση τις μελέτες διατροφής να καθοριστούν ανώτατα όρια για τα προϊόντα ζωικής προέλευσης (κρέας, γάλα, αυγά, εδώδιμα εντόσθια κ.α.). [5]

Η υπολειμματική δράση ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος εκφράζει το χρονικό διάστημα μετά την εφαρμογή του κατά το οποίο συνεχίζεται η φυτοπροστατευτική του δράση. Η υπολειμματική δράση ενός προϊόντος φυτοπροστασίας εξαρτάται από τη δυσκολία αποικοδόμησής του, τον τρόπο εφαρμογής του, το είδος του σκευάσματος, τις επικρατούσες εδαφοκλιματικές συνθήκες (θερμοκρασία, υγρασία, μικροβιακό φορτίο του εδάφους κ.λ.π.) και παράγοντες που καθορίζουν κι επηρεάζουν τη σταθερότητά του. [7]

Ως σταθερότητα ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος ορίζεται η ικανότητα να αποικοδομείται αργά ή γρήγορα και να χάνει τη βιοδραστικότητά του. Εκφράζεται με το χρόνο ημιμεταβολής ή ημιζωής, δηλαδή το χρονικό διάστημα μετά την εφαρμογή του, κατά το οποίο η δράση του μειώνεται κατά 50%. [7,32]

Η μεγάλη υπολειμματική δράση ενός προϊόντος φυτοπροστασίας αυξάνει την αποτελεσματικότητά του, επιτρέπει τη μείωση του αριθμού των επεμβάσεων για την καταπολέμηση της ασθένειας ή των εντόμων καθώς επίσης και την εφαρμογή προληπτικών εφαρμογών, πριν δηλαδή την εμφάνιση της ασθένειας ή της προσβολής. Σε μερικές όμως περιπτώσεις, η μεγάλη υπολειμματική δράση μπορεί να καταστήσει ένα προϊόν φυτοπροστασίας επικίνδυνο για τη δημόσια υγεία και το περιβάλλον. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα με μεγάλο χρόνο ημιζωής είναι αυτά που δεν αποδομούνται στο περιβάλλον και συνήθως εισερχόμενα στις τροφικές αλυσίδες υφίστανται βιομεγέθυνση, δηλαδή η συγκέντρωσή τους αυξάνει καθώς προχωράμε προς τους τελευταίους κρίκους των τροφικών αλυσίδων. [7]

1.5.2 Επίδραση της μεταποίησης (Processing) στα Υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Σε πολλές περιπτώσεις τα νωπά γεωργικά προϊόντα υφίστανται κάποια ή κάποιες επεξεργασίες προτού καταλήξουν στο τραπέζι μας. Τέτοιες είναι το πλύσιμο, η αποφλοιώση, ο βρασμός, η αποξήρανση, η παραγωγή χυμού κ. ά. Επομένως προκειμένου να σχηματιστεί κάποια εικόνα για την τύχη των υπολειμμάτων κατά την μεταποίηση και την πραγματική έκθεση των καταναλωτών, απαιτείται να διεξάγονται οι μελέτες μεταποίησης (processing studies). Οι μελέτες αυτές αποσκοπούν στο:

- να προσδιοριστεί εάν και σε ποιο βαθμό τα υπολείμματα κάποιας ουσίας συμπτκνώνονται ή αραιώνονται στο μεταποιημένο προϊόν,
- να καταστεί δυνατή μία ρεαλιστικότερη εκτίμηση της διατροφικής λήψης υπολειμμάτων,
- να επιτραπεί ο καθορισμός ανώτατων ορίων υπολειμμάτων σε μεταποιημένα προϊόντα, όπως για παράδειγμα στις βιομηχανικά παραγόμενες παιδικές τροφές,
- να αποσαφηνιστεί η φύση των υπολειμμάτων (ποσοστό συμμετοχής του μητρικού μορίου και των μεταβολιτών) στο τελικό υπόλειμμα, όταν συνοδεύονται και από άλλες μελέτες μεταβολισμού.

Ο δυνητικός αριθμός των συνδυασμών φυτοπροστατευτικών προϊόντων – μεταποιητικών διαδικασιών είναι πολύ μεγάλος. Σε γενικές γραμμές το πλείστο των μεταποιητικών διαδικασιών (βιομηχανική η οικιακή κατεργασία) συντελεί στη μείωση των υπολειμμάτων. Το πλύσιμο των φρούτων και των λαχανικών είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό μέσο για την απομάκρυνση των υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων που αφήνουν επιφανειακά υπολείμματα και δεν είναι διασυστηματικά. Αντίθετα, στις διασυστηματικές ουσίες το πλύσιμο έχει μηδενική έως ελάχιστη συμβολή στην απομάκρυνση των υπολειμμάτων. [33,34]

Η θερμική επεξεργασία των γεωργικών προϊόντων προκαλεί σημαντική μείωση των υπολειμμάτων πολλών φυτοπροστατευτικών ουσιών, ιδιαίτερα αυτών που υδρολύονται σχετικά εύκολα. Η διάρκεια βρασμού, η θερμοκρασία και το σύστημα βρασμού (κλειστό ή ανοιχτό) επηρεάζουν τα αποτελέσματα. Με την αύξηση της θερμοκρασίας αυξάνεται και ο ρυθμός αποικοδόμησης και εξάτμισης των φυτοπροστατευτικών ουσιών. Ακόμη είναι δυνατόν με υδρόλυση και θερμική αποδόμηση να παραχθούν από τα μητρικά μόρια των φυτοπροστατευτικών προϊόντων νέες ουσίες, οι μεταβολίτες. Αυτοί μπορεί να είναι είτε λιγότερο τοξικοί από το

μητρικό μόριο, είτε περισσότερο τοξικοί. Για παράδειγμα το propineb που μεταβολίζεται σε PTU με θερμική υδρόλυση, είναι λιγότερο επικίνδυνη ουσία από το PTU (που ευθύνεται για πρόκληση καρκίνου του θυροειδούς). [35,36]

1.5.3 Ορθή γεωργική πρακτική (GAP)- Ελάχιστο χρονικό διάστημα μεταξύ τελευταίας επέμβασης-συγκομιδής (PHI)

Για την ελαχιστοποίηση των υπολειμμάτων στα γεωργικά προϊόντα είναι αναγκαίο να μη γίνεται υπέρβαση των ορίων (δοσολογία, συχνότητα ψεκασμών) και κυρίως να τηρείται η χρονική απόσταση μεταξύ της τελευταίας εφαρμογής και της συγκομιδής (Pre-Harvest Interval, PHI). Η εφαρμογή των κανόνων αυτών συνιστούν την «Ορθή Γεωργική Πρακτική» (Good Agricultural Practice, GAP) για την εφαρμογή των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. [7,37]

Παλαιότερα το PHI θεωρείτο τοξικολογικός δείκτης (καθοριζόταν μακρύτερο PHI για τις τοξικές ενώσεις και συντομότερο για τις λιγότερο τοξικές). Σήμερα καθορίζεται από τη βιολογία των εχθρών και ασθενειών και τα καλλιεργητικά συστήματα (καλλιέργεια σε θερμοκήπιο ή στο ύπαιθρο). [5]

1.6 ΤΟΞΙΚΟΛΟΓΙΚΑ ΔΕΔΟΜΕΝΑ

1.6.1 Γενικά

Τα περισσότερα φυτοπροστατευτικά προϊόντα παρουσιάζουν υψηλή βιολογική δραστικότητα έναντι πολλών οργανισμών μη στόχων, όπως των ζώων και του ανθρώπου. Η είσοδος των προϊόντων φυτοπροστασίας στον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί να γίνει:

- από το δέρμα (με επαφή)
- από το αναπνευστικό σύστημα,
- από το στόμα (με την τροφή).

Η τοξική ενέργεια μπορεί να εκδηλωθεί μετά από μία, λίγες ή επανειλημμένη έκθεση ενός ανθρώπου στο φυτοπροστατευτικό προϊόν και χαρακτηρίζεται σαν οξεία, υποξεία και χρόνια τοξικότητα, αντίστοιχα. Η οξεία και υποξεία τοξικότητα χαρακτηρίζονται από σαφή εκδήλωση τοξικολογικών συμπτωμάτων ή θανάτου σε σύντομο χρονικό διάστημα. Η χρόνια τοξικότητα εκδηλώνεται με βλάβες ή αλλοιώσεις οργάνων του οργανισμού και δεν οδηγεί άμεσα στο θάνατο. [7]

Τα τοξικά φαινόμενα μπορεί να εκδηλωθούν με τις ακόλουθες μορφές:

- αντιδράσεις υπεραισθησίας (αλλεργίες),
- ελάττωση της αντίστασης του οργανισμού,
- διαταραχή του μεταβολισμού των ξένων ουσιών στον οργανισμό,
- δυσλειτουργία ζωτικών οργάνων,
- μεταλλαξιγένεση, καρκινογένεση ή τερατογένεση. [7]

Οι διαβαθμίσεις της τοξικότητας των διαφόρων φυτοπροστατευτικών προϊόντων μελετώνται σε πειραματόζωα και αφορούν κυρίως την από το στόμα χορήγηση της τοξικής ουσίας και σπανιότερα μέσω του δέρματος και της αναπνευστικής οδού. Η οξεία τοξικότητα ενός προϊόντος φυτοπροστασίας εκφράζεται με το δείκτη LD₅₀ (Lethal Dose, Θανατηφόρος Δόση) σε mg δραστικής ουσίας ανά kg ζώντος βάρους του πειραματόζωου και δηλώνει την κατώτερη δόση που απαιτείται για να προκληθεί στο 50% των πειραματόζωων που εφαρμόστηκε. [4,7,38]

Η εκδήλωση ενός τοξικού αποτελέσματος επηρεάζεται, εκτός από τη δόση και από άλλους παράγοντες όπως:

- Το χρόνο έκθεσης.
- Οι φυσικοχημικές ιδιότητες και η μοριακή δομή της δραστικής ουσίας.
- Το μηχανισμό δράσης της δραστικής ουσίας σε υποκυτταρικό επίπεδο.
- Το διαλύτη και τις βοηθητικές ουσίες του σκευάσματος .
- Τη φυσιολογική κατάσταση του οργανισμού του οργανισμού (φύλο, ηλικία, διατροφή, ιδιοσυγκρασία κλπ.)
- Την ικανότητα μεταβολισμού και απέκκρισης της δραστικής ουσίας από τον οργανισμό.

Εδώ πρέπει να επισημανθεί ότι η λήψη ακόμη κι ελαχίστων ποσοτήτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων μπορεί να προκαλέσει προβλήματα ιδιαίτερα στα παιδιά που αποτελούν ένα πολύ ευαίσθητο μέρος του πληθυσμού. Επειδή βρίσκονται ακόμη στη φάση ανάπτυξης, το ενζυματικό, μεταβολικό και ανοσοποιητικό σύστημά τους, δεν μπορούν να τα προστατεύσουν όσο αυτά ενός ενήλικα. Επίσης τα παιδιά είναι πιο εκτεθειμένα στα φυτοπροστατευτικά προϊόντα επειδή έχουν διαφορετικό διαιτολόγιο από αυτό του ενήλικα.

Σύμφωνα με την έκθεση του Συμβουλίου Υγείας της Ολλανδίας για την ευαισθησία των παιδιών ως προς τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ο τρόπος που οι ουσίες διοχετεύονται στο σώμα εξαρτάται από την ηλικία. Για παράδειγμα, ουσίες που είναι ευδιάλυτες στο νερό εισέρχονται σε μεγαλύτερο ποσοστό στα μωρά από ότι στους

ενήλικες, επειδή το ποσοστό του νερού στο σώμα ενός παιδιού είναι μεγαλύτερο από ότι σε αυτό ενός ενήλικα. Από έρευνες που έγιναν σε πειραματόζωα φαίνεται ότι μερικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα επηρεάζουν την ανάπτυξη ζωτικών οργάνων. Νεαρά πειραματόζωα παρουσίασαν πιθανή βλάβη στον εγκέφαλο, στα γεννητικά όργανα και στο ανοσοποιητικό σύστημα, ενώ δεν επηρεάστηκαν ζώα μεγαλύτερης ηλικίας. [39,40]

Με την οδηγία 94/79/E.K. καθορίζονται οι μελέτες που απαιτούνται προκειμένου να αξιολογηθούν οι τοξικολογικές ιδιότητες των δρώντων συστατικών προϊόντων φυτοπροστασίας και των εμπορικών σκευασμάτων. Οι μελέτες αυτές αφορούν:

- απορρόφηση από τους ιστούς,
- κατανομή στα όργανα.
- απέκκριση,
- μεταβολισμό,
- οξεία τοξικότητα,
- υποχρόνια και χρόνια τοξικότητα,
- καρκινογένεση,
- γονιδιοτοξικότητα (μεταλλαξιγόνο δράση),
- αναπαραγωγική τοξικότητα και
- τοξικότητα κατά την ανάπτυξη. [5]

Με βάση ορισμένα από τα παραπάνω δεδομένα καθορίζεται η «Αποδεκτή Ημερήσια Λήψη» (Acceptable Daily Intake, ADI) για τον άνθρωπο, κριτήριο της χρόνιας τοξικότητας κάποιας ουσίας. Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 396/2005 ως Αποδεκτή Ημερήσια Λήψη ορίζεται η κατ' εκτίμηση ποσότητα της ουσίας στην τροφή, εκφραζόμενη βάσει του σωματικού βάρους, η οποία μπορεί να προσλαμβάνεται ημερησίως σε όλη τη διάρκεια της ζωής, χωρίς αξιόλογο κίνδυνο για οποιονδήποτε καταναλωτή βάσει όλων των γνωστών κατά τη στιγμή της αξιολόγησης στοιχείων, λαμβανομένων υπόψη των ομάδων του πληθυσμού που είναι ευάλωτες (π.χ. παιδιά και έμβρυα). Η ADI εκφράζεται σε mg ουσίας ανά kg βάρους σώματος ανθρώπου [41]

1.6.2 Αξιολόγηση κινδύνου για το χρήστη των φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Οι περισσότερες από τις μελέτες που υπάρχουν στο τοξικολογικό μέρος ενός φακέλου ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος και της δραστηκής του ουσίας,

αποσκοπούν στον καθορισμό των αποδεκτών επιπέδων έκθεσης του χρήστη στην εν λόγω ουσία (AOEL/Acceptable Operator Exposure Level) καθώς και στο βαθμό απορρόφησής του από τον οργανισμό. Οι τοξικολογικές πληροφορίες που προκύπτουν από τις μελέτες υποχρόνιας τοξικότητας της δραστικής ουσίας επιτρέπουν τον καθορισμό της δόσης που δεν προκαλεί τοξικολογικά ανιχνεύσιμες επιδράσεις στο πλέον ευαίσθητο πειραματόζωο (NOAEL/Non Observed Adverse Effect Level).

Η τιμή βαθμού επικινδυνότητας (AOEL) καθορίζεται από την ανωτέρω τιμή της NOEL αφού διαιρεθεί με έναν συντελεστή ασφάλειας (ΣΑ), ο οποίος κυμαίνεται από 100-500 ανάλογα με τη βαρύτητα των επιδράσεων (δηλαδή $AOEL = NOEL / \Sigma A$). Ο προσδιορισμός των επιπέδων κινδύνου R γίνεται από το λόγο των αποδεκτών επιπέδων έκθεσης, δηλαδή του βαθμού επικινδυνότητας μιας ουσίας προς τα επίπεδα έκθεσης κατά την εφαρμογή ή γενικότερα κατά το χειρισμό της εν λόγω ουσίας.

$$R = \text{Βαθμός επικινδυνότητας (AOEL)} / \text{Επίπεδα έκθεσης του χρήστη}$$

Ο λόγος αυτός δεν θα πρέπει να είναι μικρότερος της μονάδας προκειμένου η χρήση του φυτοπροστατευτικού προϊόντος να μην επιφυλάσσει απαράδεκτα υψηλούς κινδύνους για τον άνθρωπο. Τα επίπεδα έκθεσης στο προϊόν φυτοπροστασίας μπορούν να προσδιοριστούν με βάση τα διαθέσιμα μαθηματικά μοντέλα αλλά και από μετρήσεις κατά την εφαρμογή του φυτοπροστατευτικού προϊόντος. [5]

1.6.3 Αξιολόγηση κινδύνου για τον καταναλωτή γεωργικών προϊόντων

Οι τοξικολογικές πληροφορίες που προκύπτουν από πειράματα επανειλημμένης χορήγησης μακράς διάρκειας ή από μελέτες επιδράσεων στην αναπαραγωγή σε πειραματόζωα επιτρέπουν τον καθορισμό της δόσης που δεν προκαλεί τοξικολογικά ανιχνεύσιμες επιδράσεις στο πλέον ευαίσθητο πειραματόζωο (NOAEL). Προκειμένου να γίνει εφαρμογή αυτής της δόσης στον άνθρωπο, εφαρμόζεται ένας συντελεστής ασφάλειας (ΣΑ) ανάλογα με τις τοξικολογικές ιδιότητες της ουσίας που αναφέρθηκαν παραπάνω, ο οποίος κυμαίνεται από 100-500. Έτσι καθορίζεται, από την τιμή της NOAEL/ΣΑ, η ADI (δηλαδή $ADI = NOAEL / \Sigma A$). Η τιμή της ADI για κάθε δραστική ουσία δεν θα πρέπει να ξεπερνιέται από κατανάλωση τροφίμων (ημερησίως) που μπορεί να περιέχουν την εν λόγω ουσία (γεωργικά προϊόντα, κτηνοτροφικά προϊόντα, νερό κλπ.) ως υπόλειμμα. Οι συνεχείς εξελίξεις στην τοξικολογία και οι αυξανόμενες απαιτήσεις για την ασφάλεια του καταναλωτή επιβάλλουν συνεχή αναθεώρηση της ADI. Η πραγματική έκθεση εκφράζεται με την έννοια της «Εκτιμώμενης Ημερήσιας

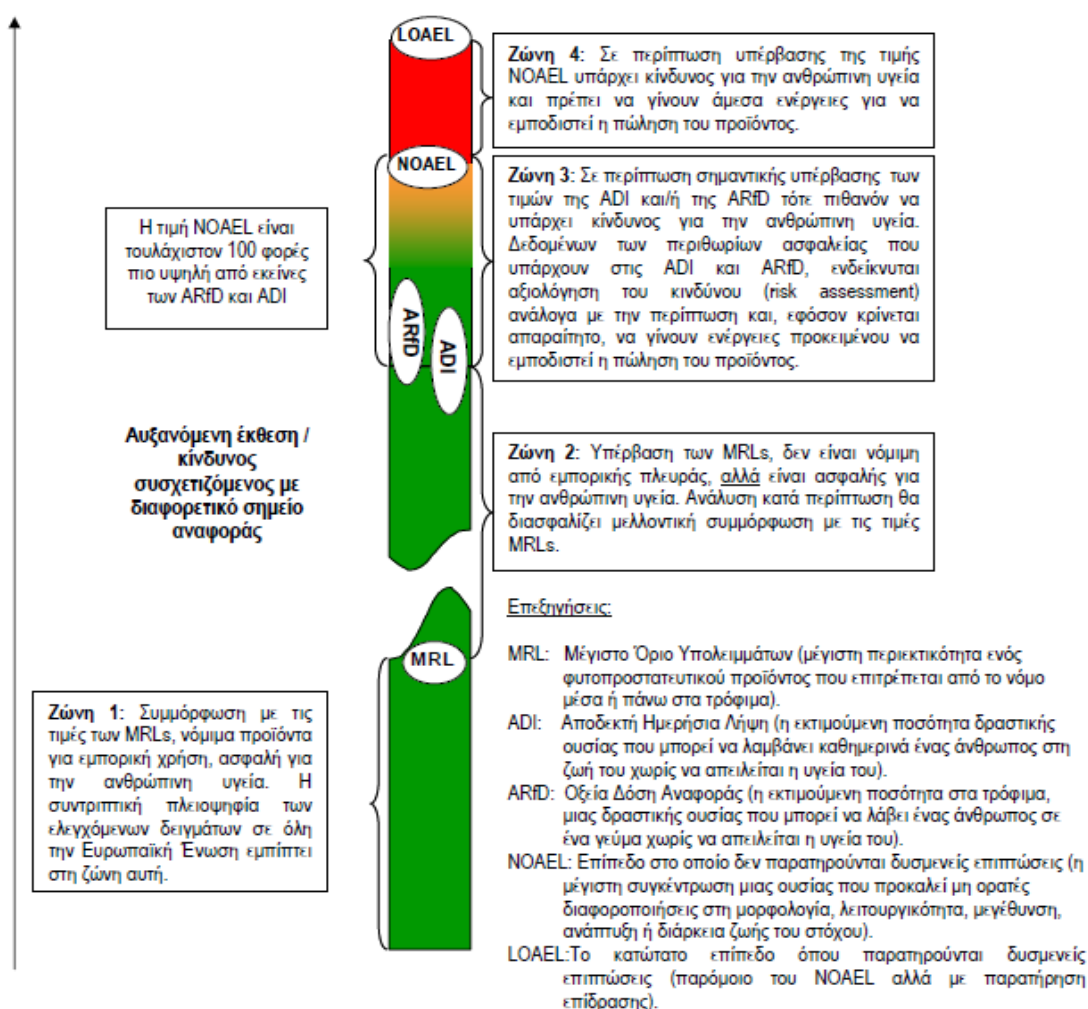
Λήψης» (Estimated Daily Intake, EDI) η οποία αποτελεί δείκτη ασφαλείας και υπολογίζεται με βάση τα «Ανώτατα Όρια Υπολειμμάτων» (MRLs). [5,7,37]

Απαραίτητο στοιχείο για τον προσδιορισμό κινδύνου για τον καταναλωτή είναι να γνωρίζουμε τα επίπεδα υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων στα τρόφιμα καθώς και την ημερήσια κατανάλωση κάθε τροφίμου. Η ημερήσια κατανάλωση είναι χαρακτηριστικό στοιχείο κάθε πληθυσμού και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει να υπάρχει επακριβής προσδιορισμός εθνικού διαιτολογίου βάσει του οποίου θα γίνεται η εκτίμηση του κινδύνου. [5]

Παλαιότερα λαμβανόταν υπόψη και εκτιμούνταν μόνο η χρόνια λήψη και συγκρίνονταν με την Αποδεκτή. Με τους νεότερους προβληματισμούς για την οξεία έκθεση με τη διατροφή, η όλη προσέγγιση αναθεωρείται, κι επιβάλλεται να προβαίνουμε σε εκτίμηση και της βραχυχρόνιας λήψης για προϊόντα φυτοπροστασίας που χαρακτηρίζονται από οξεία τοξικότητα. Έτσι η Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας (WHO) σε συνεργασία με άλλους διεθνείς οργανισμούς και επιτροπές εισήγαγε την έννοια της «Οξείας Δόσης Αναφοράς» (Acute Reference Dose, ARfD). [5]

Σύμφωνα με τον Κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 396/2005 ως «οξεία δόση αναφοράς» ορίζεται η κατ' εκτίμηση ποσότητα της ουσίας στην τροφή, εκφραζόμενη βάσει του σωματικού βάρους, η οποία μπορεί να προσλαμβάνεται σε βραχύ χρονικό διάστημα, συνήθως κατά τη διάρκεια μιας ημέρας, χωρίς αξιόλογο κίνδυνο για τον καταναλωτή βάσει των στοιχείων που προκύπτουν από κατάλληλες μελέτες, λαμβανομένων υπόψη των ομάδων του πληθυσμού που είναι ευάλωτες (π.χ. παιδιά και έμβρυα). Η ARfD εκφράζεται σε mg ουσίας ανά kg βάρους σώματος ανθρώπου. [41]

Για τον καθορισμό της ARfD ακολουθείται η ίδια περίπου διαδικασία που ακολουθείται για τον καθορισμό της ADI. Όμως το NOAEL απορρέει από τοξικολογικά δεδομένα που σχετίζονται με οξεία τοξικότητα. Κατά τον καθορισμό της πρέπει να γίνει σαφής μνεία των υποομάδων του πληθυσμού που αφορά ιδιαίτερα (βρέφη, παιδιά, εφήβους, ενήλικες), ώστε να χρησιμοποιηθούν τα αντίστοιχα στοιχεία διαιτολογίου για την εκτίμηση των πιθανών κινδύνων με τη διατροφή. Επειδή όπως αναφέρθηκε η ARfD αναφέρεται σε πιθανούς κινδύνους από τη λήψη της τοξικής ουσίας μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (ένα γεύμα ή μία ημέρα) θα πρέπει να υπάρχουν στοιχεία από μελέτες με το ύψος των υπολειμμάτων σε μεμονωμένους καρπούς που συνήθως καταναλώνονται σαν μονάδες (π.χ. μήλα, πορτοκάλια, μπανάνες). [5]



Σχήμα 1.3. Βαθμίδες ορίων υπολειμμάτων. [42]

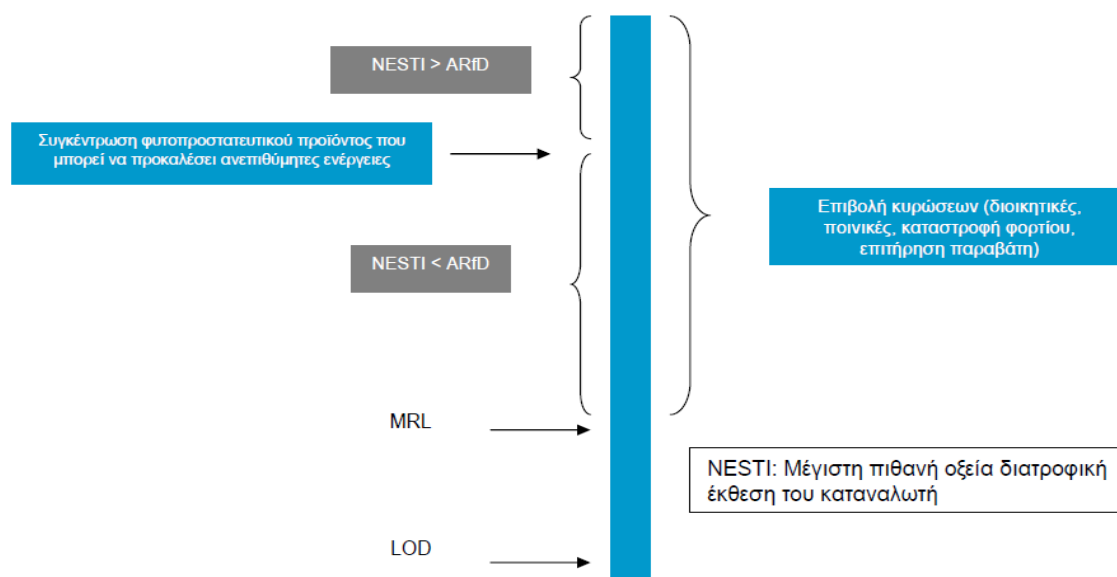
1.7 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ – ΑΝΩΤΑΤΑ ΟΡΙΑ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ

Τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα διέπονται από την πιο αυστηρή νομοθεσία στην Ευρώπη όσον αφορά τον τομέα των χημικών. Η αξιολόγηση και η αδειοδότηση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ρυθμίζεται από τον κανονισμό 546/2011 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Κάθε φυτοπροστατευτικό προϊόν που χρησιμοποιείται στην Ε.Ε. πρέπει να αξιολογείται σύμφωνα με τις φυσικοχημικές ιδιότητές του, την επίδρασή του στο περιβάλλον, τις αρχές οικοτοξικολογίας, καθώς και τους ενδεδειγμένους δείκτες υπολειμμάτων.

Η υφιστάμενη νομοθεσία είναι αναλυτική και διασφαλίζει ότι διεξάγονται οι απαραίτητοι έλεγχοι, τα δεδομένα πληρούν τις υψηλότερες επιστημονικές

προδιαγραφές και ότι λαμβάνονται υπόψη οι τοπικές συνθήκες και ιδιαιτερότητες. Τακτικές επαναξιολογήσεις διασφαλίζουν ότι παλαιότερα προϊόντα συμφωνούν με τις τρέχουσες προδιαγραφές ασφαλείας. Στην Ε.Ε. προτού χορηγηθεί μία έγκριση σε φυτοπροστατευτικό προϊόν πραγματοποιούνται περισσότεροι από 100 συγκεκριμένοι έλεγχοι για την επίδραση του προϊόντος στο περιβάλλον και στην υγεία.

Η Ευρωπαϊκή Κοινότητα για να προστατεύσει τους πολίτες από τις ανεπιθύμητες ενέργειες των φυτοπροστατευτικών προϊόντων θεσπίζει νόμους που ελέγχουν την ορθή χρήση των προϊόντων φυτοπροστασίας. Έτσι έγινε θέσπιση των ανώτατων ορίων καταλοίπων (Maximum Residues Levels, MRLs). Ως MRL ορίζεται το ανώτατο νόμιμο όριο συγκέντρωσης υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων εντός ή επί τροφίμων ή ζωοτροφών, το οποίο βασίζεται στην ορθή γεωργική πρακτική και την χαμηλότερη απαιτούμενη έκθεση του καταναλωτή για την προστασία των ευάλωτων καταναλωτών. Το MRL εκφράζεται σε mg ουσίας ανά kg βάρους φυτικού προϊόντος ή ppm (parts per million = μέρη στο εκατομμύριο) και αναφέρεται πάντα σε συγκεκριμένο ζευγάρι ουσίας και φυτικού προϊόντος. Τέλος ένα προϊόν θεωρείται κατάλληλο για κατανάλωση όταν το αποτέλεσμα της ανάλυσης είναι $\leq$ του MRL (σχήμα 1.9). [31,41,42,43]



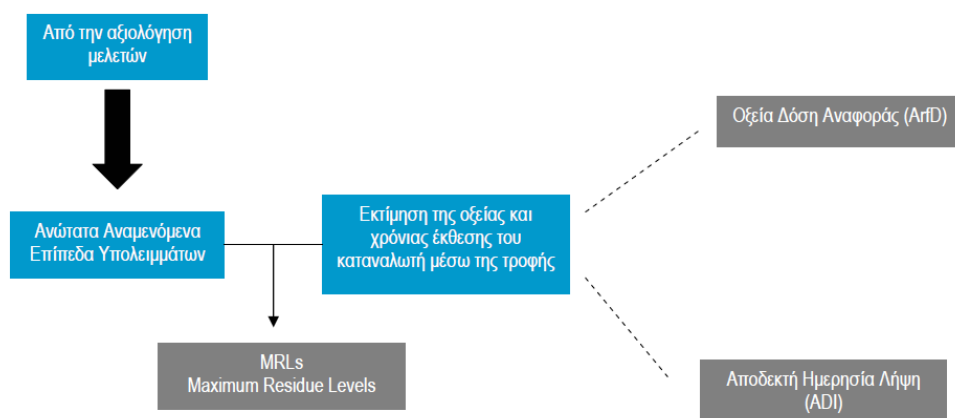
Σχήμα 1.4. Πότε ένα προϊόν θεωρείται κατάλληλο για κατανάλωση. [42]

Ο καθορισμός των MRLs για υπολλείματα φυτοπροστατευτικών ουσιών σε τρόφιμα, γίνεται για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, καθώς και για τη διευκόλυνση του διεθνούς εμπορίου. Αξιοσημείωτο είναι ότι τα MRLs δεν αποτελούν

μέγιστα τοξικολογικά όρια, αλλά καταδεικνύουν την καλή γεωργική πρακτική, αντιπροσωπεύοντας τη μέγιστη ποσότητα υπολειμμάτων και των τοξικών τους μεταβολιτών που είναι αναμενόμενη για ένα προϊόν, αν υπήρχε συμμόρφωση προς την καλή γεωργική πρακτική κατά τη χρήση της φυτοπροστατευτικής ουσίας που αναφέρεται.

Τα MRL στα προϊόντα φυτικής προέλευσης καθορίζονται από πειράματα αγρού με εργαστηριακή ανάλυση μίας ουσίας στην καλλιέργεια, στην οποία εφαρμόστηκε το υπό έλεγχο φυτοπροστατευτικό προϊόν, με βάση την «χειρότερη» Ορθή Γεωργική Πρακτική (worst case scenario), δηλαδή εφαρμόζοντας τη μεγαλύτερη δόση φυτοπροστατευτικού προϊόντος, τους περισσότερους ψεκασμούς και τη συντομότερη, χρονικά, τελευταία επέμβαση πριν τη συγκομιδή. Τα πειράματα και οι αναλύσεις πραγματοποιούνται από ομάδες διαπιστευμένες για αυτό το σκοπό σύμφωνα με τις αρχές της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (Ευρωπαϊκή Οδηγία 93/71).

Το όριο υπολείμματος που προκύπτει από τα πειράματα αγρού, σε συνδυασμό με την ημερήσια διατροφική κατανάλωση του συγκεκριμένου προϊόντος φυτικής προέλευσης, σε ευρωπαϊκό ή εθνικό επίπεδο, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα των στοιχείων για ενήλικες, νήπια και παιδιά (g. φυτικού προϊόντος ανά ημέρα) και με τη βοήθεια συγκεκριμένων μαθηματικών διατροφικών μοντέλων, χρησιμοποιείται για την εκτίμηση του βαθμού έκθεσης των καταναλωτών (σχήμα 1.10). [42,44]



Σχήμα 1.5. Καθορισμός MRLs. [42]

Ο κανονισμός 396/2005 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και της Ευρωπαϊκής Επιτροπής, που τέθηκε σε ισχύ την 01/09/2008 επαναθέτει τα MRLs για 435 ενεργές ουσίες φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε 378 φυτικά προϊόντα, μαζί με τις οδηγίες 149/2008 και 839/2008 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής. Το Παράρτημα I του κανονισμού

396/2005 μαζί με την τροποποίησή του (κανονισμός 178/2006) περιλαμβάνει τα προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης που χρησιμοποιούνται ως φρέσκα, επεξεργασμένα ή/και σύνθετα τρόφιμα ή ζωοτροφές, ενώ τα MRLs των φυτοφαρμάκων στα προϊόντα αυτά ορίζονται στα Παραρτήματα II και III. Ο κανονισμός καλύπτει τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται ή χρησιμοποιούνταν στη γεωργία εντός ή εκτός της ΕΕ. Στις περιπτώσεις που ένα συγκεκριμένο φυτοφάρμακο δε συμπεριλαμβάνεται, ισχύει ένα γενικό εξ' ορισμού MRL της τάξης των 0,01 mg/kg. Το Παράρτημα IV παραθέτει δραστικές ουσίες χαμηλού κινδύνου σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα για τα οποία δεν απαιτείται MRL. Το Παράρτημα VII παραθέτει δραστικούς συνδυασμούς ουσιών/προϊόντων σχετικά με τη διαδικασία καπνισμού μετά τη συγκομιδή. [41,45,46,47]

Τα MRLs των δραστικών ουσιών και τα προϊόντα στα οποία αναφέρονται, ανανεώνονται συνεχώς και μπορούν να βρεθούν στη βάση δεδομένων MRLs της Ευρωπαϊκής Επιτροπής στην ιστοσελίδα http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm. Γενικά, τα MRLs βρίσκονται στην περιοχή 0,01-10 mg/kg, ανάλογα με το συνδυασμό προϊόντος - φυτοπροστατευτικού προϊόντος, με το χαμηλότερο επίπεδο να είναι χαρακτηριστικό των περισσότερων τοξικών ενώσεων. Πιο συγκεκριμένα, για τα λαχανικά, τα φρούτα και τα δημητριακά που προορίζονται για την παραγωγή βρεφικών τροφών, ισχύει ένα MRL της τάξης των 0,01 mg/kg για όλα τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (Οδηγίες 1999/39 και 1999/50 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής). Έχουν οριστεί MRLs και κάτω από 0,01 mg/kg για ορισμένα τοξικά φυτοπροστατευτικά προϊόντα, ενώ απαγορεύεται εντελώς η χρήση ορισμένων εξαιρετικά τοξικών φυτοφαρμάκων (Οδηγίες 2003/13 και 2006/125 της Ευρωπαϊκής Επιτροπής). [Στο Παράρτημα 1 παρατίθενται τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοπροστατευτικών προϊόντων για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα που μελετήθηκαν σε διάφορα τρόφιμα σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία.] [41,48,49,50,51,52]

Η μη ύπαρξη θεσπισμένων ευρωπαϊκών MRLs, προκαλεί πολλές φορές την παρεμπόδιση της κυκλοφορίας των αγαθών είτε μεταξύ των Κρατών Μελών της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) είτε μεταξύ της Ε.Ε. και Τρίτων Χωρών. Προκειμένου να διευκολυνθούν τέτοιου είδους εισαγωγές, συστήνεται να ορίζεται το Υπόλειμμα Εισαγωγής (Import Tolerance) μέσω ειδικής νομικής διαδικασίας που διενεργείται σε ευρωπαϊκό ή εθνικό επίπεδο.

Οι περιπτώσεις στις οποίες συστήνεται ο καθορισμός Υπολειμματος Εισαγωγής είναι:

- όταν το προς εισαγωγή φυτικό προϊόν δεν καλλιεργείται/ δεν παράγεται στην Ε.Ε.,
- όταν στο προς εισαγωγή φυτικό προϊόν έχει εφαρμοστεί ουσία που δεν χρησιμοποιείται στην Ε.Ε.,
- όταν στο προς εισαγωγή φυτικό προϊόν έχει εφαρμοστεί ουσία που επιτρέπεται στην Ε.Ε., αλλά με διαφορετική Ορθή Γεωργική Πρακτική από την εγκεκριμένη στην Ε.Ε..

Οι ενδιαφερόμενοι φορείς (π.χ. παρασκευάστριες εταιρείες φυτοπροστατευτικών προϊόντων, εξαγωγείς, κλπ) καταβάλουν προσπάθεια για την κάλυψη αυτών των κενών, με στόχο τη διευκόλυνση του εμπορίου, ζητώντας τη θέσπιση Υπολειμμάτων Εισαγωγής, όπου χρειάζεται. Τα Υπολείμματα Εισαγωγής ορίζονται κεντρικά από την Ε.Ε. και ισχύουν μόνο για εισαγωγές από τρίτες χώρες. [42]

Η τιμή MRL για μια συγκεκριμένη φυτοπροστατευτική ουσία σε κάποιο συγκεκριμένο προϊόν διαφέρει σημαντικά στις διάφορες νομοθεσίες. Διεθνείς οργανισμοί (π.χ. WHO, FAO) έχουν αρχίσει μια διαδικασία εναρμόνισης των MRLs ορίζοντας χαμηλότερα MRL για διάφορα τρόφιμα, με στόχο την προώθηση του διεθνούς εμπορίου.

Το 2008 έγινε μία τροποποίηση του κανονισμού 396/2005, όσον αφορά τις εκτελεστικές αρμοδιότητες που ανατίθενται στην επιτροπή με τον κανονισμό 299/2008. Επίσης το 2009 νομοθετείται ο κανονισμός 1107/2009 σχετικά με τη διάθεση των φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά, καταργώντας την οδηγία 91/414. Ακόμη το 2009 δημοσιεύεται η οδηγία 2009/128 που αφορά τον καθορισμό πλαισίου κοινοτικής δράσης με σκοπό την επίτευξη ορθολογικής χρήσης των φυτοπροστατευτικών προϊόντων. Τέλος με την οδηγία 2002/63 καθιερώνονται οι κοινοτικές μέθοδοι δειγματοληψίας για τον επίσημο έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων μέσα και πάνω σε προϊόντα φυτικής και ζωικής προέλευσης. [3,28,31,53,54]

Με τον όρο δειγματοληψία ορίζεται η διαδικασία με την οποία λαμβάνεται μια ή περισσότερες ποσότητες - δείγματα από ένα προϊόν, με σκοπό να υποβληθεί στη συνέχεια σε ανάλυση στο εργαστήριο. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι τα δείγματα που λαμβάνονται να περιέχουν αντιπροσωπευτική ποσότητα της ουσίας ή των ουσιών που

πρόκειται να προσδιορισθούν, ώστε το τελικό αποτέλεσμα και συμπέρασμα της ανάλυσης να εκφράζεται για όλο το αρχικό προϊόν.

Η δειγματοληψία αποτελεί βασική διαδικασία για την εύρεση, με ανάλυση, ενός σωστού αποτελέσματος. Οι δύο βασικές αρχές που ισχύουν κατά τη λήψη ενός δείγματος είναι:

- Το δείγμα να είναι αντιπροσωπευτικό.
- Να παρθεί επαρκής ποσότητα δείγματος, ώστε το αποτέλεσμα να είναι αξιόπιστο.

Δειγματοληψία φρούτων ή λαχανικών μπορεί να απαιτείται να γίνει είτε στον αγρό πριν ή κατά τη συγκομιδή του προϊόντος είτε κατά τη μεταφορά και διακίνησή του στα σημεία εισόδου των προϊόντων στην αγορά ή τέλος, σε ορισμένες περιπτώσεις κατά την πώλησή του, δηλαδή στα επιμέρους καταστήματα.

Γενικά, όταν η δειγματοληψία γίνεται κατά τη συγκομιδή στον αγρό ή κατά τη συσκευασία των νωπών προϊόντων, θα πρέπει να ακολουθείται η συνήθης πρακτική της συγκομιδής ή της συσκευασίας. Ο αριθμός των δειγμάτων, συνιστάται να λαμβάνεται ανάλογα με το είδος και το μέγεθος του φορτίου, ακολουθώντας την Οδηγία 2002/63/EK της Ε.Ε.. Το δείγμα θα πρέπει να συλλεχθεί κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να είναι το πλέον αντιπροσωπευτικό του όλου φορτίου. Στην περίπτωση αυτή πραγματοποιείται η λεγόμενη τυχαιοποιημένη δειγματοληψία. [42,54]

Στον τομέα των Ανώτατων Ορίων Υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων για προϊόντα ζωικής προέλευσης έχουν σημειωθεί σημαντικές εξελίξεις. Ενώ με την παλαιότερη προσέγγιση τα όρια αυτά καθορίζονταν με βάση τις κτηνιατρικές χρήσεις, η νεότερη προσέγγιση είναι:

- να διενεργούνται πειράματα στις καλλιέργειες που προορίζονται για ζωοτροφές και να προσδιορίζονται τα υπολείμματα,
- με βάση τα τυπικά σιτηρέσια των παραγωγικών ζώων (αγελάδες κρεατοπαραγωγής και πάχυνσης, όρνιθες, κλπ) να υπολογίζεται η μέση θεωρητική λήψη του προϊόντος φυτοπροστασίας,
- να διενεργούνται μελέτες διατροφής κατά τις οποίες στο σιτηρέσιο προστίθεται καθημερινά ποσότητα φυτοπροστατευτικού προϊόντος τόση, όση είναι η αναμενόμενη συγκέντρωση στις ζωοτροφές,
- να σφαγιάζονται τα ζώα και να προσδιορίζονται τα υπολείμματα στα εδώδιμα ζωικά προϊόντα,

- οι συγκεντρώσεις αυτές να αξιολογούνται από πλευράς ασφάλειας για τον καταναλωτή οπότε, εάν θεωρούνται ασφαλείς να καθορίζονται σαν αποδεκτά όρια. [5]

1.8 ΕΛΕΓΧΟΣ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΕΛΛΑΔΑ

Οι αρχές των κρατών-μελών της ΕΕ διαχειρίζονται ένα διαρκές πρόγραμμα παρακολούθησης των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή (ΕΕ) προτείνει στα κράτη-μέλη να εξετάζουν και να αναλύουν διαφορετικούς συνδυασμούς προϊόντων/υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων ετησίως στα πλαίσια ενός συντονισμένου προγράμματος παρακολούθησης. Οι στόχοι των προγραμμάτων είναι α) ρυθμιστική παρακολούθηση για την επιβολή ανοχών, β) μελέτη συνολικής διατροφής για την καλύτερη εκτίμηση της πραγματικής έκθεσης του πληθυσμού σε υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα (τα δείγματα τροφίμων είναι αντιπροσωπευτικά της ευρωπαϊκής διατροφής). Αν διαπιστωθεί ότι τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων βρίσκονται σε ανησυχητικό για τους καταναλωτές επίπεδο (υπέρβαση MRL ή χρήση απαγορευμένης ουσίας), το σύστημα ταχείας ειδοποίησης για τα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (Rapid Alert System for Food and Feed, RASFF) διακινεί τις πληροφορίες και λαμβάνονται μέτρα προστασίας του καταναλωτή. [55,56]

Στην Ελλάδα οι επίσημοι έλεγχοι των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων πραγματοποιούνται από τα 11 εργαστήρια του υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, το Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο (εργαστήριο υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων) (Εθνικό Εργαστήριο Αναφοράς, Ε.Ε.Α.) και το Γενικό Χημείο του Κράτους (εργαστήριο υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων) (Ε.Ε.Α.). Οι έλεγχοι πραγματοποιούνται σύμφωνα με τους κοινοτικούς τρόπους δειγματοληψίας και μεθόδους ανάλυσης, οι οποίοι διασφαλίζουν αξιόπιστα αποτελέσματα. Η επιτυχία στην παρουσίαση ορθών αποτελεσμάτων είναι πολύ σημαντική, καθώς οι ποινές στις περιπτώσεις υπέρβασης των επιτρεπόμενων ορίων έχουν τη μορφή υψηλών χρηματικών προστίμων, ποινικών κυρώσεων και μπορούν να φτάσουν μέχρι και την ολική ανάκληση της άδειας μιας επιχείρησης.

Μεγάλη έμφαση δίνεται επίσης στην ποιότητα των παραγόμενων αναλυτικών αποτελεσμάτων. Τα εργαστήρια στα οποία έχει ανατεθεί ο επίσημος έλεγχος των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων πρέπει να είναι διαπιστευμένα κατά το πρότυπο ISO/IEC 17025, να αξιολογούν και να επικυρώνουν τις αναλυτικές μεθόδους τους. Έτσι αποδεικνύεται ότι οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι κατάλληλες για το σκοπό για τον οποίο προορίζονται και αποφεύγονται λάθη που μπορεί να έχουν νομικές συνέπειες.

Τα Κοινοτικά Εργαστήρια Αναφοράς (Community Reference Laboratories, CRLs) συντονίζουν, εκπαιδεύουν προσωπικό, αναπτύσσουν μεθόδους ανάλυσης και οργανώνουν εξετάσεις αξιολόγησης των ικανοτήτων των διαφόρων Εθνικών Εργαστηρίων Αναφοράς (National Reference Laboratories, NRL). [57,58]

Οι επίσημοι έλεγχοι της Ε.Ε. για τα υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων πραγματοποιούνται από 150 εργαστήρια της Ε.Ε. με 70.000 δείγματα / έτος εκ των οποίων το 97,4% βρίσκεται εντός των αποδεκτών ορίων. Σύμφωνα με μετρήσεις για το έτος 2009 στην Ε.Ε, το 50% των δειγμάτων φυτικής προέλευσης περιείχαν υπολείμματα, αλλά μόνο το 2,6% των δειγμάτων βρέθηκαν με υπερβάσεις των ορίων. Στην Ελλάδα αντιστοιχεί το ίδιο ποσοστό δειγμάτων με υπερβάσεις (2,6%). Μάλιστα για το 2009 στην Ε.Ε, το 0,4% των δειγμάτων βιολογικών προϊόντων βρέθηκε με υπερβάσεις των ορίων. [58]

1.9 ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΠΟΥ ΜΕΛΕΤΗΘΗΚΑΝ

Παρακάτω παρουσιάζονται οι ουσίες που μελετήθηκαν. Ο κυριότερος λόγος που επιλέχθηκαν οι συγκεκριμένες ουσίες είναι το κοινό τους χαρακτηριστικό ότι όλες είναι πολικές και υδρόφιλες ενώσεις. Έως την παρούσα χρονική στιγμή δεν έχει δοθεί η πέπουσα σημασία στα υπολείμματα αυτών των ουσιών αν και πειραματικά έχει αποδειχθεί ότι είναι τοξικές. [12]

Μέχρι σήμερα θεωρείται δύσκολο να αναλυθούν αυτές οι ουσίες στα εργαστήρια μέσα στην ρουτίνα τους, επειδή κατατάσσονται στις SRMs (μονο-υπολειμματικές μεθόδους). Οι SRMs γενικά δεν προτιμούνταν μέχρι πρόσφατα για τους εξής λόγους:

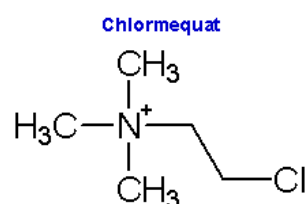
A) Επειδή απαιτούσαν κουραστικά και μη οικεία βήματα προκατεργασίας δείγματος (π.χ. παραγωγήποίηση, διάσπαση).

B) Επειδή απαιτούσαν τεχνικές διαχωρισμού και ανίχνευσης που διαφέρουν από αυτές που συνήθως χρησιμοποιούνται στις MRMs (πολύ-υπολειμματικές μεθόδους) και αρκετές φορές δεν είναι διαθέσιμες στα εργαστήρια. Για παράδειγμα:

- Ειδικές στήλες για διαχωρισμό LC(π.χ. HILIC) και GC.
- Ειδικές κινητές φάσεις για LC.
- Ειδικές ρυθμίσεις στις συνθήκες των οργάνων.

Οι SRMs επομένως είναι ακριβές μέθοδοι από άποψη κόστους και απαιτούν εντατική εργασία σε σχέση με τις MRMs. Καθώς λοιπόν τα εργαστήρια είναι υπερφορτωμένα με πολλές εργασίες, τα περισσότερα προτιμούν να αποφεύγουν τις SRMs οποτεδήποτε είναι αυτό δυνατό, ενώ τις χρησιμοποιούν όταν δεν υπάρχει άλλη επιλογή.

1.9.1 Chlormequat chloride



Το 1960 αναφέρθηκε η δράση του 2-chloroethyl trimethyl ammonium chloride, που έγινε γνωστό και σαν χλωριούχος χλωροχολίνη (chlorocholine chloride, CCC). Σήμερα η ουσία αυτή αναφέρεται με το κοινό όνομα chlormequat chloride, και είναι αποτελεσματική για την επιβράδυνση της αύξησης σε μεγάλο αριθμό φυτών.

Υπάρχουν περιπτώσεις στη γεωργική πράξη που η μείωση του μεγέθους του φυτού είναι επιθυμητή σε ορισμένες περιπτώσεις ανάλογα με τον στόχο κάθε παραγωγού. Στα σιτηρά (σιτάρι, σίκαλη, βρώμη) για παράδειγμα, με τη μείωση του ύψους του καλαμιού (μείωση του μήκους των μεσογονάτιων διαστημάτων), επιτυγχάνεται μεγαλύτερη αντοχή στο πλάγιασμα. Το πλάγιασμα καταστρέφει την οργάνωση της φυλλικής επιφάνειας και προκαλεί μεγαλύτερη αμοιβαία σκίαση των φύλλων, δυσκολεύει την κίνηση του αέρα και την παροχή του CO₂, οπότε μειώνεται η φωτοσύνθεση και τελικά οι σπόροι δεν αναπτύσσονται κανονικά και μειώνεται η απόδοση.

Άρα εξαιτίας του πλαγιάσματος η απώλεια παραγωγής είναι μεγάλη λόγω ανάπτυξης ασθενειών, σάπισμα των σπόρων λόγω κακού αερισμού αλλά και μεγαλύτερο κόστος συγκομιδής ή αδυναμίας συγκομιδής. Για το σκοπό αυτό

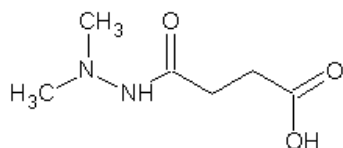
χρησιμοποιείται σε μεγάλη έκταση – ίσως τη μεγαλύτερη σήμερα για φυτορρυθμιστική ουσία – ο επιβραδυντής αύξησης chlormequat chloride. Η ίδια ουσία χρησιμοποιείται για την αύξηση της παραγωγής του σιταριού, αυξάνοντας την καρπόδεση.

Το chlormequat chloride χρησιμοποιείται:

- στα σταφύλια, στην τομάτα, στην ελιά για την αύξηση της καρπόδεσης, στο αμπέλι για τον περιορισμό της βλάστησης και στο βαμβάκι για καλύτερο δέσιμο των καρυδιών,
- για την παρεμπόδιση της πρόωρης καρπόπτωσης και μείωση της ανθόρροιας (π.χ. στην ελιά),
- για βραχύτερα και ισχυρότερα φυτά στην τομάτα,
- για τον περιορισμό της ανάπτυξης στην τομάτα, στο βαμβάκι και του υπέργειου τμήματος στην πατάτα (και αύξηση του αριθμού και του μεγέθους των κονδύλων της)
- στα ανθοκομικά φυτά για τη διαμόρφωση του σχήματός τους και τον περιορισμό του ύψους τους,
- ως μεταβολικό αντιδιαπνευστικό. Τα μεταβολικά αντιδιαπνευστικά προκαλούν το μερικό κλείσιμο των στοματίων των φύλλων χωρίς να επηρεάζουν σημαντικά την ικανότητα των φύλλων να δεσμεύουν το CO₂. Το μερικό αυτό κλείσιμο προκαλεί περιορισμό της υπερβολικής απώλειας νερού. Συνήθως χρησιμοποιείται στην καλλιέργεια της τομάτας για την καλύτερη αξιοποίηση του νερού. [10,20,21,59,60]

1.9.2 Daminozide

Daminozide



Το N-dimethylamino succinic acid (daminozide, SADH) βρέθηκε να είναι αποτελεσματικό σαν επιβραδυντής της αύξησης και χρησιμοποιείται σε πολλά είδη φυτών.

Το daminozide χρησιμοποιείται στο αμπέλι για την αύξηση της καρπόδεσης καθώς και για την προώθηση της ανάπτυξης του χρώματος στα σταφύλια. Επιπλέον

έχει εφαρμογή στον περιορισμό της βλάστησης, στη βελτίωση της ανθοφορίας, στην αύξηση της καρποφορίας και στην ανάπτυξη καρπών ομοίου μεγέθους στη μηλιά, αχλαδιά, ροδακινιά, νεκταρινιά, κερασιά και φυστικιά. Επίσης χρησιμοποιείται για την επίτευξη έντονου κόκκινου χρώματος στις κόκκινες ποικιλίες μηλιάς και τη μείωση της πρόωρης καρπόπτωσης στη μηλιά. και άλλα καρποφόρα δένδρα. Ακόμη το daminozide χρησιμοποιείται για την αύξηση της παραγωγής στην αραχίδα, το πεπόνι και το καρπούζι.

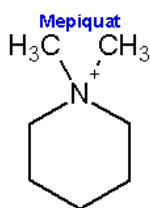
Ένα κοινό χαρακτηριστικό της εφαρμογής των φυτορρυθμιστικών ουσιών είναι το ό,τι καθυστερούν την πτώση των καρπών μέχρις ότου αυτοί να είναι έτοιμοι για συγκομιδή. Κατ' αυτόν τον τρόπο το daminozide μπορεί να παρεμποδίσει την πτώση των ώριμων καρπών της μηλιάς, της νεκταρινιάς, της ροδακινιάς, της κερασιάς και της αχλαδιάς και αυτό οφείλεται στην παρεμπόδιση της βλαστικής ανάπτυξης των δένδρων προς όφελος των καρπών.

Το daminozide απ' την άλλη, έχει δοκιμαστεί με αρκετά καλά αποτελέσματα και ως υποκινητής της πτώσης ωρίμων καρπών σε δένδρα όπως η κερασιά, η ροδακινιά και τα εσπεριδοειδή. Η δράση του οφείλεται στην παρεμπόδιση της δράσης των γιββερελλινών.

Στα ανθοκομικά φυτά το daminozide χρησιμοποιείται για τον περιορισμό του ύψους, για την αύξηση του αριθμού των ανθέων και την διαμόρφωση του σχήματος κυρίως όταν τα φυτά καλλιεργούνται σε γλάστρες (π.χ. αζαλέα, χρυσάνθεμο, γαρδένια, γεράνι και βιγκόνια).

Το daminozide συντίθεται από ένα παράγωγο του ηλεκτρικού οξέος (succinic acid) και της 1,1-διμεθυλ-υδραζίνης (unsymmetrical hydrazine, UDMH). Στον ανθρώπινο οργανισμό το daminozide μεταβολίζεται κατά 1% στη μη συμμετρική διμεθυλ-υδραζίνη (UDMH), ουσία με επικίνδυνες τοξικολογικές ιδιότητες ιδιαίτερα για τα παιδιά. Επιπροσθέτως η θερμότητα κι επομένως η θερμική κατεργασία των τροφίμων επιταχύνει την υδρόλυση του daminozide σε UDMH. Το UDMH όμως είναι καρκινογόνος ουσία, για την οποία κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του '80 παρουσιάστηκε ανησυχία για πιθανή μόλυνση στα διάφορα τρόφιμα, ειδικά στο χυμό και στη σάλτσα μήλων (όπου είχε προηγηθεί θερμική κατεργασία). [10,20,59,61,62]

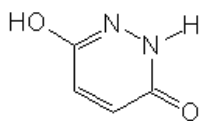
1.9.3 Mepiquat chloride



Το mepiquat chloride εισήχθη στη γεωργική πράξη το 1980 και χρησιμοποιείται για τον περιορισμό της βλάστησης, για την αύξηση της ανθοφορίας, για καλύτερο δέσιμο και ωρίμανση των καρυδιών στο βαμβάκι. Επίσης χρησιμοποιείται για την παρεμπόδιση της βλάστησης των κρεμμυδιών, του πράσου και του σκόρδου κατά την αποθήκευση. Σε ότι αφορά στην αύξηση της αντοχής στο πλάγιασμα στα σιτηρά και το λινάρι χρησιμοποιείται μίγμα mepiquat chloride + ethephon. Το mepiquat chloride δρα εμποδίζοντας την βιοσύνθεση του γιββερελλικού οξέος. [20,59]

1.9.4 Maleic hydrazide (μηλεϊνικό υδραζίδιο ή μαλεϊκή υδραζίδη (maleic hydrazide, MH))

Maleic hydrazide



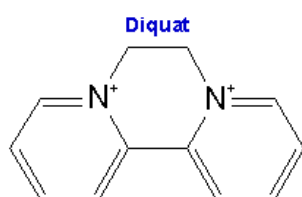
Το μηλεϊνικό υδραζίδιο χρησιμοποιείται για την παρεμπόδιση της εκβλάστησης και της παραγωγής ριζών των κονδύλων της πατάτας και των βολβών κρεμμυδιού με αποτέλεσμα την επέκταση τόσο της περιόδου αποθήκευσης όσο και της περιόδου διατήρησης των βολβών και των κονδύλων σε καλή κατάσταση μετά την έξοδο από την αποθήκευση μέχρι την κατανάλωση. Επίσης χρησιμοποιείται ως παρεμποδιστής της ανάπτυξης πλευρικών βλαστών στα αμερικανικού τύπου καπνά. Για το μηχανισμό δράσης του υποστηρίζεται ότι παρεμβάλεται στη βιοσύνθεση των νουκλεϊκών οξέων.

Η εφαρμογή μηλεϊνικού υδραζιδίου σε φυτά έχει σαν αποτέλεσμα τη διακοπή της επικράτησης των επακρίων οφθαλμών, αφού προκαλεί ολοκληρωτική παρεμπόδιση της κυτταρικής διαίρεσης στα ακραία μεριστώματα των φυτών (παρεμποδισμός της κυριαρχίας της κορυφής). Τα φυτά αναπτύσσουν πολλούς και κοντούς βλαστούς (ανάπτυξη πλαγίων οφθαλμών) με σκοτεινοπράσινα φύλλα, ενώ αν χρησιμοποιηθεί μεγαλύτερη δόση προκαλείται ολοκληρωτική ανάσχεση της αύξησης και της ανάπτυξης των φυτών. Το μηλεϊνικό υδραζίδιο αναφέρεται και σαν επιβραδυντής

αύξησης μόνο σε μικρές όμως δόσεις. Η μαλεϊκή υδραζίδη χρησιμοποιείται σε μικρές δοσολογίες στους χλοοτάπητες (γκαζόν) για τον περιορισμό των κοπών καθώς και σε θαμνώδη φυτά.

Επιπλέον η μαλεϊκή υδραζίδη χρησιμοποιείται ως γαμετοκτόνο στα εξής φυτά: αμπέλι, αραβόσιτος, πιπεριά, σιτάρι, τομάτα.. Είναι ακόμη γνωστή η χρήση της ως ουσία χημικού κλαδεύματος ή κορυφολογήματος. [20,59,63,64,65,66]

1.9.5 Diquat



Οι ζιζανιοκτόνες ιδιότητες του diquat ανακαλύφθηκαν στα τέλη της δεκαετίας του '50 (1958) και εισήχθηκε στη γεωργική πράξη το 1962. Πρόκειται για καθολικό ζιζανιοκτόνο με μηδενική υπολειμματική διάρκεια στο έδαφος, λόγω δέσμευσης από τα αργιλικά ορυκτά. Όμως τα προσροφημένα μόρια αν και δεν είναι φυτοτοξικά παραμένουν αδιάσπαστα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Το εμπορικό του σκεύασμα περιλαμβάνει και αντιδιαβρωτικές ενώσεις διότι το diquat οξειδώνει τους μεταλλικούς ψεκαστήρες. Το diquat κυκλοφορεί ως διχλωριούχο (diquat dichloride) ή διβρωμιούχο (diquat dibromide) άλας. Σε στερεά μορφή η ένωση είναι άχρωμη και παρουσιάζει μεγάλη υδατοδιαλυτότητα.

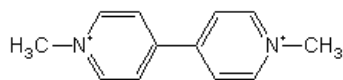
Χρησιμοποιείται με αυστηρά κατευθυνόμενο ψεκασμό σε ευρύ φάσμα πλατύφυλλων και αγρωστωδών ζιζανίων στα οπωροφόρα, το αμπέλι, την ελιά, τα εσπεριδοειδή, το σπαράγγι, τα βολβώδη λαχανικά (κρεμμύδι, πράσο, κ.α.), τα ζαχαρότευτλα, η πατάτα, ο καπνός, το βαμβάκι, τους καλωπιστικούς θάμνους και δέντρα, δασικά κ.α. Η ταχεία δέσμευσή του από τα αργιλικά ορυκτά του εδάφους επιτρέπει τη χρησιμοποίησή του εναντίον ζιζανίων πριν από το φύτευμα των φυτών. Επίσης χρησιμοποιούνται με καθολική εφαρμογή για την καταπολέμηση ζιζανίων σε μη γεωργικές εκτάσεις αλλά και ως αποξηραντικό φυλλώματος στο βαμβάκι, την πατάτα, τη σόγια, τον ηλιάνθο, το ρύζι, το καλαμπόκι, τη μηδική κ.α. για συγκομιδή σπόρων ή κονδύλων. Χρησιμοποιούνται ακόμη για την καταπολέμηση υδροχαρών ζιζανίων, όπως *Lemna minor* κ.α. σε αρδευτικά κανάλια, λίμνες κ.α.

Το diquat σε σχέση με το paraquat, είναι αποτελεσματικότερο σε ευρύτερο φάσμα πλατύφυλλων ζιζανίων. Ωστόσο είναι πολύ τοξικό για τον άνθρωπο αφού μπορεί να παράγει τις τοξικές ρίζες που προαναφέρθηκαν (ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και υδροξυλίων) και στον ανθρώπινο οργανισμό, γι' αυτό κατά την εφαρμογή του θα πρέπει οπωσδήποτε να λαμβάνονται όλα τα απαραίτητα προστατευτικά μέτρα. Η πρόσληψή τους από τα ζώα και τον άνθρωπο έχει ως συνέπεια την ταχεία καταστροφή των πνευμονικών κυψελίδων (lung fibrosis). Ο θάνατος σε τέτοιες περιπτώσεις είναι κατά κανόνα αναπόφευκτος επειδή δεν υπάρχει αντίδοτο.

Το diquat είναι πολύ καλό αποξηραντικό λόγω της γρήγορης φυτοτοξικής του δράσης στα φύλλα, προκαλώντας κάψιμο των φύλλων που θυμίζει τα συμπτώματα που προκαλούνται από τον παγετό. Το diquat ως αποξηραντικό χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες σποροπαραγωγής, στη μηδική, το τριφύλλι και τη σόγια. Ο μηχανισμός δράσης του οφείλεται στην παραγωγή ριζών $\text{OH}^\cdot$ και H_2O_2 που καταστρέφουν τους φυτικούς ιστούς. [10,12,59,67]

1.9.6 Paraquat

Paraquat



Οι ομοιότητες του paraquat με το diquat είναι πολλές αφού και τα δύο ανήκουν στην ομάδα των διπυριδιλίων.

Το paraquat κυκλοφορεί ως διχλωριούχο (paraquat dichloride) ή διμέθυλοθειϊκό (bis-methyl sulfate) άλας. Σε στερεά μορφή η ένωση είναι άχρωμη και παρουσιάζει μεγάλη υδατοδιαλυτότητα.

Το paraquat όπως και το diquat είναι πολύ καλό αποξηραντικό λόγω της γρήγορης φυτοτοξικής του δράσης στα φύλλα, προκαλώντας κάψιμο των φύλλων που θυμίζει τα συμπτώματα που προκαλούνται από τον παγετό.

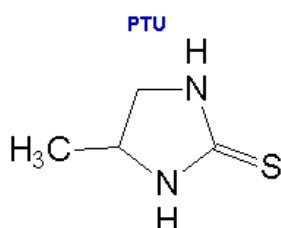
Το paraquat χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ζιζανίων σε ακαλλιέργητες εκτάσεις, στο αμπέλι, σε γραμμικές καλλιέργειες (βαμβάκι, τεύτλα, αραβόσιτος, καπνός), ελιά, εσπεριδοειδή, λαχανικά, μηδική, μηλοειδή, πατάτα και πυρηνόκαρπα.

Επίσης το paraquat χρησιμοποιείται ως αποξηραντικό στις πατάτες, τον ηλίανθο, τη σόγια και το βαμβάκι.

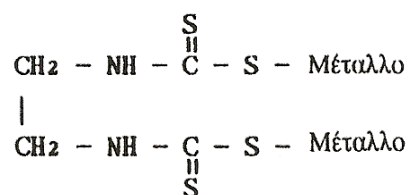
Το paraquat επίσης χρησιμοποιείται ως αποφυλλωτικό σε ευαίσθητα καλλιεργούμενα φυτά.. Η δράση του αυτή οφείλεται στην αφυδάτωση και αποξήρανση των φύλλων. Ο μηχανισμός δράσης του έγκειται στην παραγωγή ριζών $\text{OH}^\cdot$ και H_2O_2 που καταστρέφουν τους φυτικούς ιστούς. [10,12,59,67,68]

Τέλος έχει καταγραφεί ότι το paraquat ευθύνεται για σημαντικό ποσοστό (9%) δηλητηριάσεων από φυτοπροστατευτικά προϊόντα επί του συνόλου των κατηγοριών των προϊόντων φυτοπροστασίας. [5]

1.9.7 Propylenethiourea (PTU)



Τα μονο-αλκυλο-διθειοκαρβαμιδικά με γενικό τύπο:



που ονομάζονται και αλκυλενο (ή αιθυλενο)- δις-διθειοκαρβαμιδικά (Ethylene-Bis-DithioCarbamates, EBDCs) είναι τα πιο επιτυχή διθειοκαρβαμιδικά μυκητοκτόνα. Στα μονο-αλκυλο-διθειοκαρβαμιδικά ανήκει το propineb. Η ένωση αυτή χρησιμοποιείται ευρέως στην Ελλάδα για πολλές ασθένειες των οπωροφόρων, της αμπέλου, των λαχανικών, των εσπεριδοειδών, των τεύτλων, του καπνού και των καλλωπιστικών φυτών. Δεν είναι αποτελεσματική στα ωΐδια. Χρησιμοποιείται είτε για απολύμανση πολλαπλασιαστικού υλικού είτε για ψεκασμούς υπέργειων οργάνων των φυτών. Πλεονεκτεί έναντι των χαλκούχων γιατί δεν είναι φυτοτοξική και δίνει στο φύλλωμα καλύτερη εμφάνιση. Επίσης καταπολεμά και μερικά παθογόνα που έχουν μικρή ευαισθησία στα χαλκούχα, όπως ο πρώιμος περονόσπορος της πατάτας και τομάτας.

Ο κύριος μεταβολίτης του propineb είναι η *propylenethiourea* (PTU) που μελετήθηκε στην παρούσα εργασία, ενώ ένας άλλος πιθανός μεταβολίτης του είναι και η *ethylenethiourea* (ETU). Ο μεταβολισμός του propineb σε PTU επιτείνεται κατά πολύ μέσω θερμικής υδρόλυσης.

Σε ότι αφορά στο PTU, πρέπει να επισημανθεί ότι η ένωση αυτή δεν έχει υιοθετηθεί ακόμη για πρακτική χρήση αν και έχει ενδιαφέρον από άποψη έρευνας. Έρευνες έδειξαν ότι το PTU αποτρέπει την ανάπτυξη ασθενειών συγκεκριμένων φυτών, σε συγκεντρώσεις που επιδεικνύουν λίγη ή καθόλου μυκοτοξικότητα *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα το PTU είναι αποτελεσματικό απέναντι στον *Cladosporium cucumerinum*, προστατεύοντας τα φυτά. Το PTU είναι ένας ισχυρός αναστολέας της δράσης της πολυφαινολοξειδάσης αναστέλλοντας την εισβολή του παθογόνου στους φυτικούς ιστούς. Έτσι λοιπόν, δρα ως αντιδιδεισδυτικό απέναντι στον *P. oryzae* (ένας μύκητας υπεύθυνος για πρόκληση ασθενειών στο ρύζι) στο φιλμ της κυτταρίνης στο περίβλημα του ρυζιού. Αυτά τα δεδομένα καταδεικνύουν ότι το PTU θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως φυτοπροστατευτικό προϊόν, δρώντας απευθείας στο παθογόνο ως αντιδιδεισδυτικό.

Βραχεία έκθεση στα διθειοκαρβαμιδικά μπορεί να προκαλέσει ερεθισμό στα μάτια, στο δέρμα και στο αναπνευστικό. Επιπλέον το PTU επηρεάζει το θυρεοειδή προκαλώντας κάποιες φορές και καρκίνο) ενώ έχουν παρατηρηθεί και νευροτοξικές επιδράσεις. [4,10,11,13,59]

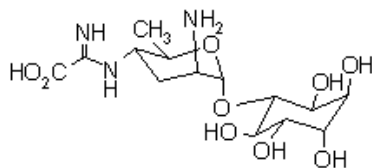
1.9.8 Oxytetracycline - chlorotetracycline

Η οξυτετρακυκλίνη και η χλωροτετρακυκλίνη παράγονται από είδη του γένους *Streptomyces* και είναι αποτελεσματικές εναντίον μερικών φυτοπαθογόνων βακτηρίων, όπως *Erwinia amylovora*, *Pseudomonas* spp. και *Xanthomonas* spp. Πιο ενδιαφέρουσα όμως είναι η χρησιμοποίησή τους για την καταπολέμηση ασθενειών που οφείλονται σε μυκοπλάσματα (MLO). Σε περιπτώσεις μάλιστα αμφιβολίας ως προς την αιτιολογία μιας μεταδοτικής ασθένειας, η χρήση τετρακυκλίνης μπορεί να μας βοηθήσει να αποφανθούμε ότι το αίτιο είναι μυκόπλασμα και όχι ιός. Η δράση των τετρακυκλινών έχει σαν τελικό αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της πρωτεϊνικής σύνθεσης και στα προκαρυωτικά (70S) και στα ευκαρυωτικά (80S) ριβοσώματα. Επιπλέον η δράση των τετρακυκλινών έχει πολλές διαφορές από τη δράση της στρεπτομυκίνης, π.χ. δεν προκαλείται λανθασμένη μετάφραση.

Η οξυτετρακυκλίνη χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του βακτηριακού καψίματος των μηλοειδών και της αχλαδιάς. [2,4,8,12,13,18]

1.9.9 Kasugamycin

Kasugamycin

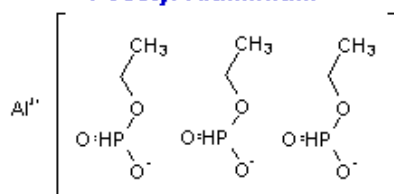


Η κασουγκαμυκίνη (kasugamycin) ανακαλύφθηκε στην Ιαπωνία για αποκλειστική χρήση στη φυτοπροστασία. Η κασουγκαμυκίνη ανήκει στα αντιμυκωτικά αντιβιοτικά, είναι ένας δευτερογενής μεταβολίτης του *Streptomyces kasugaensis* και εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη στα μέσα της δεκαετίας του '60.

Η κασουγκαμυκίνη δρα ως παρεμποδιστής της βιοσύνθεσης πρωτεϊνών τόσο στους μύκητες όσο και στα φυτά, παρεμποδίζοντας τα 80S ριβοσώματα. Πρόκειται για διασυστηματικό μυκητοκτόνο και βακτηριοκτόνο που χρησιμοποιείται για τον έλεγχο ασθενειών του ρυζιού αλλά και του φουζικλαδίου της μηλιάς και της κερκοσπορίωσης των τεύτλων. Είναι επίσης αποτελεσματικό εναντίον φυτοπαθογόνων βακτηρίων (θεραπευτικά και προστατευτικά) στα κολοκυθοειδή, στην τομάτα, στην πατάτα, στα εσπεριδοειδή, στο φασόλι, στην πιπεριά, στα καλωπιστικά (τριανταφυλλιά, γαρυφαλιά) και στον καπνό. [8,12,13,18,59,69,70,71]

1.9.10 Fosetyl-aluminium

Fosetyl-Aluminium



Το fosetyl-Al είναι διασυστηματικό μυκητοκτόνο της ομάδας των οργανοφωσφορικών (αλκυλοφωσφορικά) που εμφανίστηκε στη γεωργική πράξη το 1977. Ανήκει στις ενώσεις που επάγουν μηχανισμούς άμυνας των φυτών στις θέσεις εφαρμογής. Το fosetyl-Al είναι αποτελεσματικό για την αντιμετώπιση ωομυκήτων της τάξεως *Peronosporales* (που προκαλούν τον περονόσπορο και τον ψευδοπερονόσπορο) και είδη των γενών *Pythium* και *Phytophthora* (που προκαλεί την φυτοφθόρα), αλλά και για μετασυλλεκτικές επεμβάσεις όπως στην περίπτωση στην ασθένεια του ανανά που οφείλεται στον *Phytophthora parasitica* var. *parasitica*. Υποστηρίζεται ότι εκτός

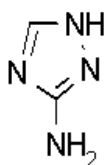
της αποπλαστικής κίνησης έχει και πολύ καλή συμπλαστική που ίσως οφείλεται στο μεταβολίτη του H_3PO_3 .

Ο μηχανισμός δράσης του φαίνεται να είναι διπλός. Αφενός παρουσιάζει άμεση τοξική δράση (κυρίως με τον μεταβολίτη του H_3PO_3 στον οποίο αποικοδομείται το fosetyl-Al στο ιστό των φυτών) και αφετέρου επάγει τους μηχανισμούς άμυνας του φυτού, όπως την παραγωγή πολυφαινόλων, φυτοαλεξινών, φλαβονοειδών και στιλβενίων. Οπωσδήποτε δεν φαίνεται να είναι γνωστή η πρωταρχική δράση του fosetyl-Al ή του H_3PO_3 που οδηγεί τελικά στην καταπολέμηση της ασθένειας.

Το fosetyl-Al χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση της φυτοφθώρας στα εσπεριδοειδή, στη μηλιά, στη φράουλα, στα καλλωπιστικά και στα κωνοφόρα, για την καταπολέμηση του περονόσπορου στα βολβώδη λαχανικά, στην τομάτα, για την καταπολέμηση του ψευδοπερονόσπορου στα κολοκυνθοειδή, για την καταπολέμηση της φόμοψης στο αμπέλι και για την καταπολέμηση του περονόσπορου και της φυτοφθώρας στο λάχανο, στο μαρούλι, στο κουνουπίδι, στην πατάτα, στον καπνό, στο αμπέλι και στον λυκίσκο. [4,8,12,13,59,72,73]

1.9.11 Amitrole

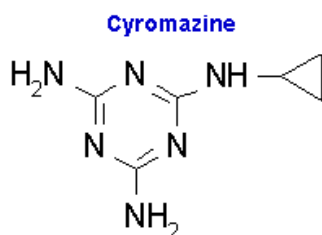
Amitrole



Η amitrole είναι μη εκλεκτικό, διασυστηματικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος, αποτελεσματική εναντίον ευρέως φάσματος ετήσιων και πολυετών αγρωστωδών και πλατύφυλλων ζιζανίων. Χρησιμοποιείται σε εγκατεστημένες καλλιέργειες καρποφόρων δένδρων (συμπεριλαμβανομένων των εσπεριδοειδών) και θάμνων, αμπέλου, ελιάς, καλλωπιστικών θάμνων κ.α. Χρησιμοποιείται επίσης ως καθολικό ζιζανιοκτόνο σε ακαλλιέργητες εκτάσεις, σε σιδηρόδρομους και βιομηχανικές περιοχές. Η δραστηριότητά της αυξάνει με την προσθήκη θειοκυανικού αμμωνίου. Η εφαρμογή της amitrole συνίσταται να γίνεται με κατευθυνόμενο ψεκασμό και όταν τα ζιζάνια έχουν ύψος 10-15 cm. Η αποτελεσματικότητά της μειώνεται όταν εφαρμόζεται σε πολύ ανεπτυγμένα ζιζάνια ή σε ζιζάνια που αναπτύσσονται κάτω από ξηρικές συνθήκες. Απορροφάται εύκολα από τις ρίζες και τα φύλλα των φυτών και μετακινείται τόσο συμπλαστικά όσο και αποπλαστικά εντός των φυτικών ιστών. Ο μηχανισμός δράσης

της δεν έχει διευκρινιστεί. Υποστηρίζεται ότι παρεμβαίνει στο στάδιο της κυκλοποίησης του λυκοπενίου. Η προσρόφησή της από τα εδαφικά κολλοειδή είναι ασθενής, γι' αυτό και έχει μεγάλη πιθανότητα έκπλυσης προς βαθύτερους εδαφικούς ορίζοντες. [12,59,71]

1.9.12 Cyromazine



Το cyromazine είναι τριαμινοτριαζινικό διασυστηματικό εντομοκτόνο. Εφαρμοζόμενο στο έδαφος προσλαμβάνεται από τις ρίζες των φυτών και μετακινείται ακροπεταλλικά. Δρα ως ρυθμιστής ανάπτυξης των εντόμων. Χρησιμοποιείται σε ψεκασμούς φυλλώματος για τον έλεγχο φυλλορυκτών (*Liriomyza spp.*) στα κηπευτικά, την πατάτα και τα καλλωπιστικά - ανθοκομικά, για την καταπολέμηση προνυμφών διπτέρων στα μανιτάρια, καθώς και για τον έλεγχο διπτέρων στα ζώα και τα πουλερικά. [2,59,74]

1.10 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό των φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι κυρίως η υγροχρωματογραφία (LC) και η αεριοχρωματογραφία (GC). Για τον προσδιορισμό τους υπάρχει πλήθος ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών, όπως UV (Ultra Violet), DAD (Diode Array Detector), FLD (Fluorescence Detector) και ECD (Electron Capture Detector). Η εφεύρεση νέων τεχνικών προσδιορισμού εξυπηρέτησε την ανάγκη της επίτευξης χαμηλότερων ορίων ανίχνευσης ώστε να μπορούν να προσδιορισθούν συγκεντρώσεις χαμηλότερες από τα όρια που έχουν θεσπιστεί για αυτές τις ενώσεις. Πλέον, η μέθοδος ανίχνευσης που επικρατεί στις μέρες μας για τον προσδιορισμό των φυτοφαρμάκων είναι η συζευγμένη φασματομετρία μαζών (MS/MS).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο ANTIBIOTIKA

2.1 ΓΕΝΙΚΑ

2.1.1 Εισαγωγή - Ορισμός

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς (κυρίως μύκητες, αλλά και βακτήρια) και έχουν την ιδιότητα να επιβραδύνουν και να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών (βακτήρια, ρικέτσιες, χλαμύδια) ή και να τους σκοτώνουν. Τα περισσότερα αντιβιοτικά προσφέρουν προστασία κυρίως εναντίον βακτηριακών λοιμώξεων και όχι ιικών ή προερχόμενων από μύκητες ή από άλλα μικρόβια, προσβάλλοντας μόνο τα κύτταρα των βακτηρίων, χωρίς ωστόσο, τα ίδια να προκαλούν βλάβη στα ανθρώπινα κύτταρα. Αν και ο όρος αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε αρχικά για οποιοδήποτε μέσο με βιολογική δράση ενάντια στους μικροοργανισμούς, εντούτοις, σήμερα αναφέρεται στην περιγραφή ουσιών με αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή ή αντιπαρασιτική δράση.

Η χρήση των αντιβιοτικών προκάλεσε επανάσταση στη σύγχρονη ιατρική. Αντίθετα με προηγούμενες θεραπείες μολύνσεων, οι οποίες συνήθως βασίζονταν στη χορήγηση χημικών ενώσεων, όπως η στρυχνίνη ή το αρσενικό με υψηλή τοξικότητα έναντι στα θηλαστικά, τα αντιβιοτικά που προέρχονται από μικρόβια έχουν ελάχιστες παρενέργειες και ιδιαίτερα αποτελεσματική δράση. Περισσότερα από 3500 αντιβιοτικά έχουν απομονωθεί από την ανακάλυψη της πενικιλίνης μέχρι σήμερα, πολλά από τα οποία παράγονται πλέον σε βιομηχανική κλίμακα. Αν και ο όρος «αντιβιοτικό» χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να αναφερθεί μόνο στις ουσίες που εξάγονται από έναν μύκητα ή άλλο μικροοργανισμό (φυσικά αντιβιοτικά), σήμερα χάρη στην αλματώδη πρόοδο της οργανικής χημείας περιλαμβάνει επίσης πολλές αντιβακτηριακές φαρμακευτικές ουσίες που παράγονται ημι-συνθετικά ή συνθετικά σε εργαστήρια. Η αποτελεσματικότητα των μεμονωμένων αντιβιοτικών ποικίλλει ανάλογα με τη θέση της μόλυνσης, την ικανότητα του αντιβιοτικού να προσεγγίσει το σημείο της μόλυνσης και τη δυνατότητα του μικροβίου να αλληλεπιδράσει με το αντιβιοτικό. [75]

Τα αντιβιοτικά χορηγούνται, τόσο στην ιατρική, όσο και στην κτηνιατρική, για την αντιμετώπιση πληθώρας βακτηριακών και μη λοιμώξεων. Η χρήση τους όμως δεν περιορίζεται αποκλειστικά σε θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά επεκτείνεται και στον τομέα της κτηνοτροφίας, όπου χορηγούνται για προληπτικούς σκοπούς, ενώ η χορήγησή τους ως αυξητικά πρόσθετα στις ζωοτροφές έχει απαγορευθεί τα τελευταία χρόνια, τουλάχιστον στις χώρες-μέλη της Ε.Ε. Η εκτεταμένη και αλόγιστη χορήγηση

των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία τις τελευταίες δεκαετίες ενέχει τον κίνδυνο, ποσότητες αυτών να περνούν από τα ζώα στα προϊόντα τους και από εκεί στη διατροφική αλυσίδα με αποτέλεσμα αφενός μεν την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών που εξουδετερώνουν τη δράση των συνταγογραφούμενων αντιβιοτικών στην ιατρική, αφετέρου τη δημιουργία κινδύνων για τη δημόσια υγεία (αλλεργίες). Για την αντιμετώπιση του προβλήματος καθίσταται αναγκαίος ο έλεγχος της παρουσίας υπολειμμάτων αντιβιοτικών σε κάθε είδους κτηνοτροφικά προϊόντα. [76]

2.1.2 Ταξινόμηση των αντιβιοτικών

Υπάρχουν πολλοί τρόποι ταξινόμησης της πληθώρας των αντιβιοτικών που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά, ανάλογα με το κριτήριο το οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Έτσι τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε «βακτηριοκτόνα» και «βακτηριοστατικά», ανάλογα με το αν με τη δράση τους θανατώνουν εκλεκτικά τα βακτήρια (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκοσίδες) ή αν αποτρέπουν τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων (π.χ. τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, χλωραμφαινικόλη) εμποδίζοντας την ανάπτυξη τους με βακτηριακή αλληλεπίδραση (πρωτεϊνική παραγωγή, αντιγραφή του DNA, μεταβολισμός των κυττάρων). Η ταξινόμηση αυτή των αντιβιοτικών έχει μόνο εργαστηριακή χρήση, αφού και οι δύο κατηγορίες αντιβιοτικών έχουν στόχο την αναστολή της βακτηριακής μόλυνσης. [75]

Ένα άλλο βασικό κριτήριο διαχωρισμού των αντιβιοτικών είναι το αντιμικροβιακό τους φάσμα, δηλαδή το πόσα διαφορετικά είδη μικροβίων επηρεάζονται από την παρουσία τους. Έτσι τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε «στενού ή περιορισμένου φάσματος» (narrow-spectrum) αν δρουν εναντίον ενός μόνο βακτηρίου ή μιας ομάδας ομοειδών βακτηρίων (π.χ. τα Gram-αρνητικά, τα Gram-θετικά βακτήρια) και σε «ευρέως ή εκτεταμένου φάσματος» (broad spectrum) που δρουν έναντι πολλών ειδών βακτηρίων (πενικιλίνες, τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη).

Ανάλογα με τη χημική τους σύσταση τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε προϊόντα αμινοξέων (πενικιλίνες), πολυπεπτιδίων (βακιτρακίνη), σακχάρων (αμινογλυκοσίδες), αλειφατικών οξέων (τετρακυκλίνες), πολυενίων (αμφοτερικίνη), αζολών (μικοναζόλη) κ.α. Τέλος, ως κριτήριο για την κατάταξη των αντιβιοτικών χρησιμοποιείται και ο μηχανισμός δράσης τους. Έτσι έχουμε αντιβιοτικά που δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες),

αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων (*τετρακυκλίνες*, *μακρολίδια*) και αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων των βακτηρίων (*σουλφοναμίδια*, *κινολόνες*). [75]

2.1.3 Η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική και στην κτηνοτροφία

Τα αντιβιοτικά τυγχάνουν ευρείας χρήσης εδώ και περίπου 60 χρόνια, τόσο στην κτηνιατρική όσο και στην κτηνοτροφία για τρεις κυρίως σκοπούς:

- 1) Τη θεραπεία των ζώων** που ασθενούν από κάποια βακτηριακή λοίμωξη. Με τον ίδιο τρόπο με τον οποίο τα αντιβιοτικά αποτέλεσαν επανάσταση για την ιατρική αποτέλεσαν επανάσταση και για την κτηνιατρική. Όπως και οι άνθρωποι έτσι και τα ζώα προσβάλλονται από βακτήρια και μικροοργανισμούς και η βασική θεραπεία των ασθενειών αυτών στηρίζεται στη χορήγηση αντιβιοτικών, είτε παρεντερικά, είτε μέσω της τροφής ή του νερού.
- 2) Την προφύλαξη των ζώων** από πιθανές ασθένειες. Τα αντιβιοτικά χορηγούνται προληπτικά στα ζώα μιας φάρμας, όταν παρουσιαστεί κάποιο κρούσμα ασθένειας σε κάποιο από αυτά ή όταν τα ζώα μεταφέρονται από τη μία μονάδα της φάρμας σε κάποια άλλη (π.χ. από τη μονάδα εκτροφής στη μονάδα αύξησης της μάζας (πάχυνσης)), ή από τη μία φάρμα σε μία άλλη. Παρόλο που στη σύγχρονη ιατρική η προληπτική χρήση των αντιβιοτικών είναι σχετικά περιορισμένη (τα αντιβιοτικά χορηγούνται για προφύλαξη μόνο κατά τη νοσηλεία ενός ασθενούς σε νοσοκομείο), στην κτηνοτροφία αποτελεί συχνή και ευρέως χρησιμοποιούμενη πρακτική.
- 3) Ως αυξητικά πρόσθετα στις ζωοτροφές**, με σκοπό να βελτιώσουν, τόσο το τελικό μέγεθος του ζώου, όσο και κυρίως το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να μεγαλώσει αυτό. Οι δόσεις των αντιβιοτικών που χορηγούνται για το σκοπό αυτό είναι σημαντικά μικρότερες από τις θεραπευτικές δόσεις.

Η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα αλλά και σοβαρά μειονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματα επικεντρώνονται σε τρεις κυρίως τομείς: ασφάλεια των προϊόντων της κτηνοτροφίας, μείωση του κόστους και προστασία του περιβάλλοντος. Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η διατήρηση της καλής υγείας των ζώων έχει άμεσο αντίκτυπο και στην ασφάλεια και την καλή ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων (κρέας, αυγά, γάλα, ψάρια).

Η χρήση των αντιβιοτικών προληπτικά και ως αυξητικά πρόσθετα σε ημιθεραπευτικές δόσεις μειώνει σημαντικά το ποσοστό των απωλειών των ζώων λόγω θανάτων από λοιμώξεις, ενώ παράλληλα αυξάνει το ρυθμό παραγωγής εξαιτίας μείωσης του χρόνου ανάπτυξης των ζώων. Αυτό επιτυγχάνεται με τρεις κυρίως μηχανισμούς. Πρώτα από όλα η παρουσία των αντιβιοτικών ελαττώνει τον αριθμό των παθογόνων βακτηρίων επηρεάζοντας τη μικροβιακή χλωρίδα του πεπτικού συστήματος των ζώων. Δεύτερον τα αντιβιοτικά παρεμβαίνουν άμεσα σε ορισμένες βιοχημικές διεργασίες των κυττάρων των ζώων, όπως το ισοζύγιο αζώτου, στην πρωτεϊνوسύνθεση και στις αντιδράσεις φωσφορυλίωσης. Τρίτον επηρεάζουν άμεσα το μεταβολισμό τους, βοηθώντας στη σύνθεση των βιταμινών και αυξάνοντας την απορροφητικότητα θρεπτικών ουσιών. Το τελικό αποτέλεσμα όλων των διεργασιών είναι η αύξηση της παραγωγής, γεγονός που συνεπάγεται ελάττωση του κόστους παραγωγής και επομένως ελάττωση του κόστους του τελικού προϊόντος με εμφανή πλεονεκτήματα για τον καταναλωτή.

Αν και τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται εδώ και εξήντα χρόνια στην κτηνοτροφία και παρ' όλο που από την αρχή παρουσιάστηκαν επικριτές της χρήσης αυτής, μόλις τα τελευταία είκοσι χρόνια τα μειονεκτήματα κι οι κίνδυνοι που ελλοχεύουν από την πρακτική αυτή άρχισαν να απασχολούν τόσο τον επιστημονικό και εμπορικό κόσμο, όσο και τους καταναλωτές. Τα μειονεκτήματα της χρήσης των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία διακρίνονται σε τρία επίπεδα ανάλογα με τους κινδύνους και τα προβλήματα που προκαλούν.

A. Η παρουσία υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα κτηνοτροφικά προϊόντα είναι πιθανό να έχει τοξική ή αλλεργιογόνο δράση στον άνθρωπο που θα τα καταναλώσει. Για προστασία του καταναλωτικού κοινού η χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία υπόκειται σε αυστηρούς περιορισμούς που καθορίζουν: την ποσότητα και τη συχνότητα των εφάπαξ αλλά και των ημερήσιων δόσεων, το χρόνο ανάκλησης των φαρμάκων (το χρονικό διάστημα που πρέπει να μεσολαβεί από τη διακοπή χορήγησης του αντιβιοτικού μέχρι τη σφαγή του ζώου), αλλά και τα όρια μέσα στα οποία πρέπει να βρίσκονται τα τυχόν υπολείμματα των αντιβιοτικών στα διάφορα κτηνοτροφικά προϊόντα.

B. Ενίσχυση του κινδύνου ζωικές λοιμώξεις να περάσουν από τα ζώα στον άνθρωπο. Γνωστά βακτήρια που πέρασαν στον άνθρωπο από ζώα είναι η σαλμονέλα, η λιστέρια και το καμπυλοβακτηρίδιο. Τα αντιβιοτικά πιστεύεται

ότι υποβοηθούν το φαινόμενο αυτό καθώς επηρεάζουν εκλεκτικά τη μικροβιακή χλωρίδα των ζώων, οπότε ενδέχεται η παρουσία τους να βοηθά εκλεκτικά κάποια βακτήρια.

Γ. Η ανάπτυξη και διάδοση τόσο μεταξύ των ζώων όσο και στους ανθρώπους μικροοργανισμών ανθεκτικών στα αντιβιοτικά. Ο κίνδυνος αυτός είναι σήμερα ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της χρήσης των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία.

Η προληπτική χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και η χρήση τους ως αυξητικά πρόσθετα επιτείνουν σημαντικά το φαινόμενο και συμβάλλουν στη διάδοση ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών στους ανθρώπους θέτοντας σε κίνδυνο την ανθρώπινη υγεία. Εκτός αυτού η υπερβολική χορήγηση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία θέτει πρώτα από όλα σε κίνδυνο την υγεία των ίδιων των ζώων. Έχει διαπιστωθεί πέραν πάσης αμφιβολίας ότι η αυξημένη χρήση των αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και η αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών από τους ίδιους τους ανθρώπους στην ιατρική συμβάλλει στην αύξηση των ανθεκτικών μικροοργανισμών, καθώς και στην παρά πέρα εξέλιξη των μηχανισμών αντίστασης. [77,78]

2.1.4 Μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών

Κακή χρήση των αντιβιοτικών από τους ανθρώπους συνήθως σημαίνει λήψη του αντιβιοτικού για χρονικό διάστημα μικρότερο από αυτό που καθορίζεται από την ιατρική συνταγή. Συχνά οι ασθενείς δεν αφήνουν το απαραίτητο χρονικό διάστημα που απαιτείται μεταξύ της χορήγησης του αντιβιοτικού και της εκκαθάρισης του ανθρώπινου οργανισμού από τους μολυσματικούς μικροοργανισμούς. Επίσης συχνά γίνεται και λανθασμένη χορήγηση των αντιβιοτικών, όπως για παράδειγμα είναι η χρήση αντιβακτηριακών αντιβιοτικών για τη θεραπεία σοβαρών μολύνσεων (π.χ. για ασθένειες ιογενούς προέλευσης) ή για κάποιο συνηθισμένο κρυολόγημα. Οι πρακτικές αυτές συχνά οδηγούν στην ανάπτυξη βακτηριακών πληθυσμών με ιδιαίτερη αντοχή στα αντιβιοτικά.

Πολύ σοβαρότερες είναι όμως οι επιπτώσεις όταν γίνεται λάθος χρήση των αντιβιοτικών (ως αυξητικά πρόσθετα πέρα από τα επιτρεπόμενα όρια, όπου βέβαια επιτρέπεται η χρήση τους) ή όταν χρησιμοποιούνται ασύστολα για την προφύλαξη και όχι για τη θεραπεία των ζώων (τα οποία εκτρέφονται και προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο). Η χρήση των αντιβιοτικών στην παραγωγή εδώδιμων κρεάτων

σχετίζεται άμεσα με το ζήτημα της αντοχής των αντιβιοτικών σε στελέχη βακτηρίων που περιλαμβάνουν τα *Salmonella ssp.*, *Campylobacter ssp.*, *Escherichia coli*. και *Enterococcus ssp.* Αποτελέσματα Ευρωπαϊκών και Αμερικάνικων ερευνών καταλήγουν στο ότι ανθεκτικά βακτήρια προκαλούν μολύνσεις στον άνθρωπο, οι οποίες δε θεραπεύονται με τα συνηθισμένα αντιβιοτικά που συνταγογραφούνται. [77,79,80]

2.1.5 Μικροβιακή Αντοχή

Η χρήση και κυρίως η κακή χρήση των αντιβιοτικών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής έναντι των αντιβιοτικών από μολυσματικούς οργανισμούς, όμοιους με την ανάπτυξη της αντοχής στα εντομοκτόνα από τα έντομα. Σύμφωνα με νέες θεωρίες θα πρέπει σχεδόν το 100% των μολυσματικών οργανισμών να καταστραφούν συνολικά, ώστε να αποφευχθεί η επιλεκτική μικροβιακή αντοχή. Εάν ένα μικρό υποσύνολο του πληθυσμού αυτού επιβιώσει της θεραπείας, θα αρχίσει να πολλαπλασιάζεται και η ευαισθησία του νέου αυτού πληθυσμού στο συγκεκριμένο αντιβιοτικό θα είναι κατά μέσο όρο πολύ χαμηλότερη από αυτή του αρχικού πληθυσμού, αφού ο νέος πληθυσμός θα έχει προέλθει από στελέχη που επιβίωσαν μετά την αρχική θεραπεία. Η επιβίωση του πληθυσμού συχνά οδηγεί σε κληρονομικότητα της αντοχής στις συγκεκριμένες ενώσεις, γεγονός που συναντάται πιο συχνά στον αρχικό πληθυσμό. [79,81]

Η σύγχρονη λοιπόν επιστημονική κοινότητα οδηγείται σ' ένα συνεχή αγώνα ανακάλυψης νέων και διαφορετικών αντιβιοτικών για να μειώνεται ο κίνδυνος της εξάπλωσης των μολύνσεων τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Το πρόβλημα της ανάπτυξης στην αντοχή των αντιβιοτικών επιδεινώνεται όταν γίνεται λανθασμένη χρήση των αντιβιοτικών στους ανθρώπους και στα ζώα. [78,80]

Ο όρος μικροβιακή αντοχή μπορεί να χρησιμοποιηθεί με δύο τρόπους, είτε ως μικροβιολογική αντοχή, είτε ως κλινική αντοχή. Οι ανθεκτικοί από μικροβιολογικής πλευράς οργανισμοί είναι αυτοί που έχουν οποιοδήποτε είδος ανθεκτικού μηχανισμού ή γονιδίου. Ο όρος μπορεί να αποδοθεί και ποσοτικά, χαρακτηρίζοντας κάποιο οργανισμό ως «μέτρια ή υψηλά ανθεκτικό» ή «χαμηλού και υψηλού επιπέδου ανθεκτικότητας».

Η ελάχιστη συγκέντρωση ενός αντιβιοτικού που απαιτείται για να δράσει ανασταλτικά στην ανάπτυξη ενός μικροοργανισμού (MIC, Minimum Inhibitory Concentration) είναι καθοριστική της βακτηριακής του ευαισθησίας. Γενικότερα, η

ανθεκτικότητα των βακτηρίων θα πρέπει να εκφράζεται ποσοτικά με τιμές της MIC, παρά να χαρακτηρίζονται τα βακτήρια ως ευαίσθητα ή ανθεκτικά από κλινικής άποψης. [75,76]

2.1.6 Γενετική της ανθεκτικότητας

Όταν τα αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκαν για πρώτη φορά για τη θεραπεία βακτηριακών μολύνσεων, η ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής κατά τη διάρκεια της θεραπείας δεν ήταν κάτι αναμενόμενο, αφού η μεταβολή της ανθεκτικότητας του βακτηρίου θεωρούνταν πολύ σπάνια. Μέχρι τότε δεν ήταν γνωστό, ότι ακόμα και στη φύση τα βακτήρια μπορούν να συλλέξουν και να ανταλλάξουν γενετικές πληροφορίες με σπάνια είδη. Η μικροβιακή αντοχή αναπτύσσεται ταχύτατα, αμέσως μετά την ανάπτυξη και την κλινική χρήση ενός αντιβιοτικού.

Η μικροβιακή αντοχή έχει γενετική βάση, η οποία μπορεί να προέρχεται από ένα συγκεκριμένο σημείο του βακτηριακού γονιδιώματος ή να μεταφέρεται μεταξύ των βακτηρίων. Όταν χρησιμοποιούνται τα αντιβιοτικά, είναι αναπόφευκτη η ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής, είτε από μετάλλαξη, είτε από απόκτηση γονιδίου, είτε από το συνδυασμό των δύο. [76,80]

2.2 ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ (Tetracyclines)

2.2.1 Οι τετρακυκλίνες και η φαρμακολογία τους

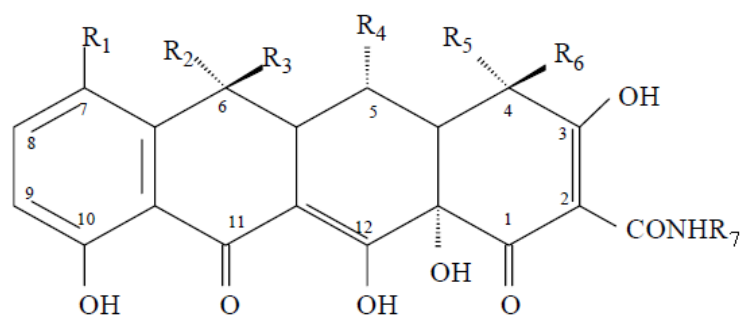
Οι τετρακυκλίνες αποτελούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιβιοτικών «ευρέως φάσματος». Ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1940 και ήταν η πρώτη ομάδα αντιβιοτικών στην οποία αποδόθηκε ο χαρακτηρισμός «αντιβιοτικά ευρέως φάσματος», λόγω της υψηλής δραστητικότητάς τους έναντι διαφόρων τύπων βακτηρίων, τόσο gram-θετικών (staphylococcus, streptococcus, pneumococcus, enterococcus), όσο και gram-αρνητικών (gonococcus, cholera, dysentery bacillus, brucella), μικροοργανισμών (chlamydiae, mycoplasmas, rickettsiae), καθώς και έναντι πρωτόζωων παρασίτων. Το ευρύ πεδίο της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των τετρακυκλινών το οποίο υπερκαλύπτει πολλές φορές αυτό άλλων ομάδων αντιβιοτικών, αλλά και η απουσία σημαντικών παρενεργειών, έχουν σαν αποτέλεσμα οι τετρακυκλίνες να χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική. Επιπλέον βρίσκουν εφαρμογή και ως αυξητικά πρόσθετα σε ζωοτροφές

στους τομείς της κτηνοτροφίας και ιχθυοτροφίας με στόχο την ταχεία αύξηση της παραγωγής. [82,83,84]

Στην κτηνιατρική χρησιμοποιούνται κυρίως για την πρόληψη και θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του αναπνευστικού, του πεπτικού και του ουρογεννητικού συστήματος. [82,84]

2.2.2 Χημεία των τετρακυκλινών

Οι τετρακυκλίνες από χημικής απόψεως περιλαμβάνουν έναν οκταϋδρόναφθακενικό κυκλικό σκελετό που αποτελείται από τέσσερις συμπτυκνωμένους εξαμελείς δακτυλίους με σύστημα συζυγών διπλών δεσμών, στους οποίους είναι προσαρμοσμένοι διάφοροι υποκαταστάτες (Σχήμα 2.1).



Σχήμα 2.1: Βασικός δομικός σκελετός των τετρακυκλινών. [85]

Οι τετρακυκλίνες είναι ενώσεις στερεές, κρυσταλλικές με χρώμα κίτρινο έως υποκίτρινο, σταθερές στον αέρα, αλλά με την έκθεσή τους στο ηλιακό φως ή σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από τους 180 °C) αποσυντίθενται και το χρώμα τους γίνεται πιο σκούρο. Επιπλέον η οξυτετρακυκλίνη είναι αρκετά υγροσκοπική ουσία. Συνήθως κυκλοφορούν ως άλατα του υδροχλωρικού οξέως.

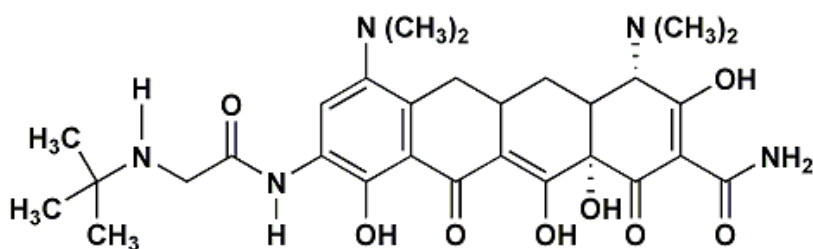
Εκτός των άλλων οι τετρακυκλίνες φθορίζουν ελαφρώς, με την ένταση του φθορισμού να αυξάνεται όταν συμπλοκοποιούνται με μέταλλα. Οι τετρακυκλίνες έχουν έντονη την τάση να σχηματίζουν κρυσταλλικά υδρίδια και άλατα με οξέα και βάσεις αλλά και φθορίζοντα σύμπλοκα με δισθενή και τρισθενή μεταλλικά ιόντα (Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Be^{2+} , Al^{3+}) σε όξινο ή αλκαλικό περιβάλλον. Άλλα μόρια με τα οποία έχουν την τάση να συμπλέκονται οι τετρακυκλίνες, είναι διάφορα ανιόντα (φωσφορικά, κιτρικά, σαλικυλικά, π-υδρόξυβενζοϊκά και ανιόντα ζαχαρίνης), ουρία, θειουρία, πολυβίνυλοπυρρολιδόνη, αλβουμίνες του ορού, λιποπρωτεΐνες, γλοβουλίνες, αλλά και με μόρια RNA. [85,86,87]

2.2.3 Σχέση χημικής δομής – αντιμικροβιακής δράσης

Βασικοί παράγοντες για την ανάπτυξη βακτηριοστατικής δράσης είναι:

1. Η ύπαρξη των τεσσάρων συμπυκνωμένων εξαμελών δακτυλίων
2. Η διατήρηση της στερεοχημικής διευθέτησης στους C 4 και 12 και των συστημάτων κετόνης-ενόλης στις θέσεις 11-12 και 1-3.

Η θέση 9 συγκέντρωσε τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον πολλών επιστημόνων στο πλαίσιο της προσπάθειας να αντιμετωπιστεί το πρόβλημα της αυξημένης ανθεκτικότητας πολλών μικροοργανισμών στις τετρακυκλίνες. Με προσθήκη στη θέση 9 μιας ακυλάμιδο-ομάδας, της οποίας το ακύλιο συνδέεται με κάποια αλκυλοαμίνη, προέκυψε μια νέα γενιά τετρακυκλινών, οι γλυκοκυκλίνες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι μικροοργανισμών που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης στις υπόλοιπες τετρακυκλίνες. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα γλυκοκυκλίνης είναι η tigecycline (τιγκεκυκλίνη) (Σχήμα 2.2). [86,88]



Σχήμα 2.2: Συντακτικός τύπος της τιγκεκυκλίνης. [89]

2.2.4 Τοξικότητα και παρενέργειες

Οι τετρακυκλίνες είναι σχετικά μη τοξικές. Το LD₅₀ της οξυτετρακυκλίνης μετά από ενδοφλέβια χορήγηση στα ποντίκια κυμαίνεται μεταξύ 150 και 180 mg/kg. Από τις συχνές παρενέργειες που παρατηρούνται, από τη χρήση τετρακυκλινών, είναι οι διαταραχές στην εντερική χλωρίδα λόγω της διατάραξης της ισορροπίας μεταξύ ευαίσθητων και ανθεκτικών στις τετρακυκλίνες μικροοργανισμών. [85]

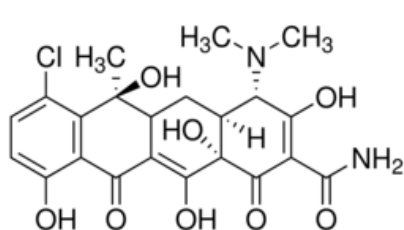
2.2.5 Χρήση των τετρακυκλινών στην κτηνιατρική και στην κτηνοτροφία

Το ευρύ πεδίο δραστηριότητας των τετρακυκλινών, η καλή απορροφητικότητά τους, η μικρή τοξικότητά τους σε υψηλές συγκεντρώσεις, καθώς και το σχετικά χαμηλό κόστος τους, έχουν ως αποτέλεσμα την ευρύτατα διαδεδομένη χρήση τους στην κτηνιατρική για την αντιμετώπιση βακτηριακών και μη λοιμώξεων των ζώων, αλλά και

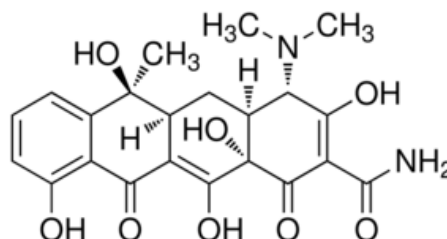
στην κτηνοτροφία για προληπτικούς λόγους και ως αυξητικά πρόσθετα στις ζωοτροφές. Ωστόσο στην Ευρωπαϊκή Ένωση η χρήση των τετρακυκλινών ως πρόσθετες ύλες στις ζωοτροφές καταργήθηκε, σύμφωνα με την οδηγία 70/524 ΕΟΚ. [85,90,91]

2.2.5.1 Φαρμακολόγια και φαρμακοκινητική των χρησιμοποιούμενων στην κτηνιατρική τετρακυκλινών

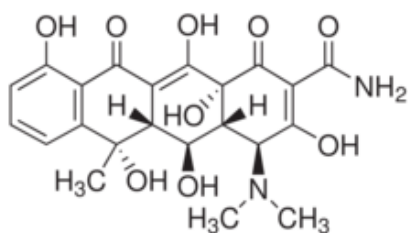
Τέσσερις τετρακυκλίνες: η χλωροτετρακυκλίνη, η οξυτετρακυκλίνη, η τετρακυκλίνη και η δοξυκυκλίνη (Σχήμα 2.4), κυκλοφορούν στην Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση ως κτηνιατρικά φάρμακα, με έγκριση του Εθνικού Οργανισμού Φαρμάκων (ΕΟΦ) και του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων (EMA, European Medicines Agency).



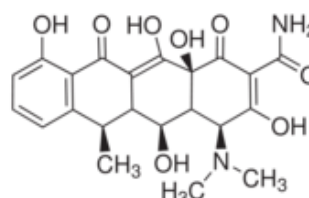
Χλωροτετρακυκλίνη



Τετρακυκλίνη



Οξυτετρακυκλίνη



Δοξυκυκλίνη

Σχήμα 2.3: Συντακτικοί τύποι των τεσσάρων τετρακυκλινών. [89]

2.2.5.1.1 Χλωροτετρακυκλίνη (Chlorotetracycline)

Η χλωροτετρακυκλίνη χορηγείται κυρίως σε μόσχους, ορνιθοειδή και χοίρους για την πρόληψη και θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του αναπνευστικού (οι διάφορες πνευμονίες και ρινίτιδες) και του πεπτικού συστήματος (βακτηριακή εντερίτιδα, κολοβακτηριδίαση), αλλά και της χολέρας των πτηνών. Όπως όλες οι

τετρακυκλίνες, η χλωροτετρακυκλίνη είναι αρκετά λιποδιαλυτή με αποτέλεσμα να κατανέμεται στους περισσότερους ιστούς. Τα μεγαλύτερα ποσοστά κατανομής εμφανίζονται κατά σειρά στους νεφρούς, το ήπαρ, τους μύες και το λίπος τόσο στους χοίρους, όσο και στα βοοειδή. Αποβάλλεται όπως και οι υπόλοιπες τετρακυκλίνες από το ουροποιητικό και το εντερικό σύστημα κατά κύριο λόγο, χωρίς προηγουμένως να μεταβολιστεί σε σημαντικό βαθμό.

Ο χρόνος ημιζωής της είναι σημαντικά μικρότερος από αυτόν των άλλων τριών τετρακυκλινών για όλα τα ζώα. Ανεπιθύμητες παρενέργειες που ενδέχεται να προκληθούν είναι αντιδράσεις υπερευαισθησίας, καταστροφή της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, δυσχρωματισμός των αναπτυσσόμενων δοντιών και γαστρεντερικές διαταραχές. [85,92,93]

2.2.5.1.2 Οξυτετρακυκλίνη (Oxytetracycline)

Χορηγείται σε βοοειδή, χοίρους, ορνιθοειδή, αιγοπρόβατα, ψάρια και ιπποειδή έχοντας ως στόχο τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού (βρογχοπνευμονία, ρινίτιδα), του πεπτικού (εντερίτιδα) και του ουρογεννητικού (μητρίτιδα, μαστίτιδα, σύνδρομο αγαλαξίας, πρόληψη αποβολών) συστήματος που προκαλούνται από gram-θετικά ή gram-αρνητικά βακτήρια και μικροοργανισμούς, ευαίσθητους στην οξυτετρακυκλίνη (*Pasteurella* spp, *Mycoplasma* spp, *Clostridium perfringens*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida*, *Rickettsia* spp). Η οξυτετρακυκλίνη είναι ο πλέον πολυχρησιμοποιημένος αντιμικροβιακός παράγοντας στην κτηνιατρική πρακτική. Σε περιπτώσεις έλλειψης επαρκούς εργαστηριακής υποστήριξης και αδυναμίας ταυτοποίησης του λοιμώδους παθογόνου παράγοντα οδηγούν συχνά τον κλινικό κτηνίατρο στη χρήση ενός αντιμικροβιακού με το ευρύ φάσμα δράσης της οξυτετρακυκλίνης. [85,92]

Η χορήγηση μπορεί να γίνει τόσο από το στόμα, όσο και παρεντερικά (ενδομυϊκή έγχυση). Παρουσιάζει το ίδιο φάσμα κατανομής στους διάφορους ιστούς με τις υπόλοιπες τετρακυκλίνες και ο χρόνος αποβολής της είναι μέτριος. Ο καθορισμένος χρόνος αναμονής ποικίλει ανάλογα με την οδό χορήγησης της οξυτετρακυκλίνης.

Στις ανεπιθύμητες ενέργειες εντάσσονται αντιδράσεις υπερευαισθησίας, καταστροφή της μικροχλωρίδας, δυσχρωματισμός των αναπτυσσόμενων δοντιών και γαστρεντερικές διαταραχές μετά από του στόματος χορήγηση. Αντενδείκνυται η

χορήγηση οξυτετρακυκλίνης με άλλα αντιβιοτικά και κυρίως με πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες. [92,93]

2.2.5.1.3 Δοξυκυκλίνη (Doxycycline)

Η δοξυκυκλίνη παρουσιάζει παρόμοια φαρμακολογικά δράση με την οξυτετρακυκλίνη και χορηγείται σε βοοειδή, χοίρους, ψάρια, και ορνιθοειδή κατά κύριο λόγο. Σε αντίθεση όμως με την οξυτετρακυκλίνη, αλλά και τις άλλες δύο τετρακυκλίνες εμφανίζει μεγαλύτερη δραστικότητα έναντι ορισμένων βακτηρίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται αφενός μεν στο ό,τι απορροφάται καλύτερα και από τις τρεις άλλες τετρακυκλίνες, αφετέρου στο ό,τι αποβάλλεται με μικρότερο ρυθμό από ότι αυτές. Η ταχύτερη απορρόφηση και η βραδύτερη αποβολή της δοξυκυκλίνης σχετίζεται με τη χημική της δομή, καθώς είναι η πιο λιπόφιλη από όλες τις τετρακυκλίνες και μία από τις πιο σταθερές. Επιπλέον, ενώ η απορροφητικότητα των τριών προαναφερθεισών τετρακυκλινών επηρεάζεται άμεσα από την παρουσία τροφής, λόγω των συμπλόκων με μέταλλα που σχηματίζονται, η δοξυκυκλίνη έχει μικρή τάση να σχηματίζει κι έτσι η απορροφητικότητά της δε μειώνεται κατά την παρουσία τροφής.

Λόγω της λιποφιλικότητάς της κατανέμεται πολύ καλά σε όλους τους ιστούς με τα μεγαλύτερα ποσοστά να εμφανίζονται στους νεφρούς και το ήπαρ. Αποβάλλεται κυρίως από το εντερικό σύστημα χωρίς προηγουμένως να μεταβολιστεί. Είναι δυνατό να παρατηρηθούν γαστρεντερικές διαταραχές και μεταβολές της εντερικής χλωρίδας με συνέπεια την πιθανή δραστηριοποίηση κι άλλων παθογόνων μικροοργανισμών πρέπει να αποφεύγεται η ταυτόχρονη χορήγηση της δοξυκυκλίνης με πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες καθώς υπάρχει ένας δυναμικός ανταγωνισμός μεταξύ της δοξυκυκλίνης και αυτών των αντιβιοτικών. [85,92,93]

Καθώς η μόνη τετρακυκλίνη που χορηγείται παρεντερικά με ενδομυϊκή έγχυση είναι η οξυτετρακυκλίνη, αποτελεί τη μοναδική τετρακυκλίνη που χρησιμοποιείται στη θεραπεία λοιμώξεων των αιγοπροβάτων κι αυτό διότι απαγορεύεται η από του στόματος χορήγηση τετρακυκλινών στα ζώα αυτά, καθώς καταστρέφεται η μικροχλωρίδα του πεπτικού τους συστήματος. Αυστηρές απαγορεύσεις στη θεραπεία με τετρακυκλίνες τίθενται στις περιπτώσεις μικρών σε ηλικία ζώων, αλλά και ζώων που κυοφορούν και αυτό διότι οι τετρακυκλίνες δεσμεύουν τα ιόντα ασβεστίου

σχηματίζοντας σύμπλοκα, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η φυσιολογικά ανάπτυξη. [85,92]

2.2.5.2 Οι τετρακυκλίνες στην κτηνοτροφία

Οι τετρακυκλίνες ήταν η πρώτη κατηγορία αντιβιοτικών τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην κτηνοτροφία ως αυξητικά πρόσθετα. Η χρήση τους ξεκίνησε το 1949, σχεδόν αμέσως μετά την ανακάλυψη της πρώτης τετρακυκλίνης, όταν οι Stokstad και Juke χρησιμοποίησαν ως μαγιά μια καλλιέργεια *Streptomyces aureofaciens* (από την καλλιέργεια των συγκεκριμένων στρεπτομυκήτων ένα χρόνο πριν είχε παραχθεί το αντιβιοτικό χλωροτετρακυκλίνη) ως φθηνή πηγή βιταμίνης B₁₂, αλλά θεωρήθηκε ότι ήταν το αποτέλεσμα της παρουσίας της χλωροτετρακυκλίνης. Παρόμοια συμπεριφορά παρουσίασαν και άλλα αντιβιοτικά με αποτέλεσμα η χρήση τους στην κτηνοτροφία να γενικευθεί. [94]

Από τη δεκαετία του 1970 όμως άρχισαν να πραγματοποιούνται και να δημοσιεύονται μελέτες σχετικά με τα αρνητικά αποτελέσματα της μακροχρόνιας χορήγησης αντιβιοτικών στα ζώα, ακόμα και σε ημιθεραπευτικές δόσεις. Οι λόγοι ήταν δύο. Πρώτα από όλα εκτιμήσεις ότι η πρακτική αυτή συνέβαλε σημαντικά στην ανάπτυξη ανθεκτικών στις τετρακυκλίνες βακτηριακών στελεχών, και δεύτερον ο κίνδυνος ύπαρξης καταλοίπων τετρακυκλινών και κυρίως των παραπροϊόντων τους σε κτηνοτροφικά προϊόντα, ο οποίος καθιστά επικίνδυνη την κατανάλωσή τους. Για όλους τους παραπάνω λόγους από το 1975, σε αντίθεση με ό,τι ισχύει στις ΗΠΑ, τον Καναδά, αλλά και σε άλλες χώρες, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει απαγορεύσει τη χρήση τετρακυκλινών ως αυξητικά πρόσθετα στην κτηνοτροφία (Οδηγία 70/524 ΕΟΚ). [90,91]

Παρά την απαγόρευση αυτή, όπως επισημαίνεται από οργανισμούς υγείας υπάρχει έντονος ο κίνδυνος παράνομης χρησιμοποίησης τετρακυκλινών ως αυξητικά πρόσθετα σε ζωοτροφές. Η χρήση αυτή μάλιστα δεν περιορίζεται μόνο στις τέσσερις προαναφερθείσες τετρακυκλίνες που χορηγούνται εγκεκριμένα στην κτηνιατρική, αλλά επεκτείνεται και στις υπόλοιπες τέσσερις που είναι εμπορικά διαθέσιμες (μινοκυκλίνη, μετακυκλίνη, ντεμεκλοκυκλίνη, ρολιτετρακυκλίνη), λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει η χρήση τους. Ένα παράδειγμα είναι η μινοκυκλίνη που είναι η πιο δραστική από όλες τις τετρακυκλίνες κι επιπλέον εμφανίζει δραστηριότητα απέναντι και

σε πολλά βακτήρια που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης απέναντι στις υπόλοιπες τετρακυκλίνες.

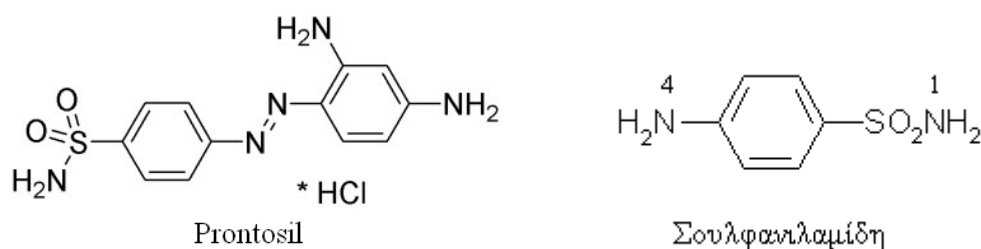
Για όλους αυτούς τους λόγους τις τελευταίες δεκαετίες στην Ευρωπαϊκή Ένωση γίνεται προσπάθεια ελέγχου του φαινομένου, τόσο νομοθετικά, όσο και σε πρακτικό επίπεδο με την οργάνωση ενός συστήματος επαγρύπνησης, το οποίο διενεργεί συνεχώς ελέγχους για την ενδεδειγμένη χρήση των τετρακυκλινών και γενικότερα των αντιβιοτικών. [85]

2.3 ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΑ (Sulfonamides)

2.3.1 Εισαγωγή

Η πρόοδος της Οργανικής Χημείας είχε ως αποτέλεσμα πολλές κατηγορίες αντιβιοτικών να είναι προϊόντα χημικής σύνθεσης. Η πρώτη ένωση με χημειοθεραπευτική δράση σε κλινική χρήση ήταν το Prontosil ένα αζω-παράγωγο με δομή παραπλήσια των σουλφονιλαμιδίων. Αργότερα αναπτύχθηκαν τα σουλφοναμίδια που μέχρι σήμερα, παίζουν σημαντικό ρόλο στη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών. [84]

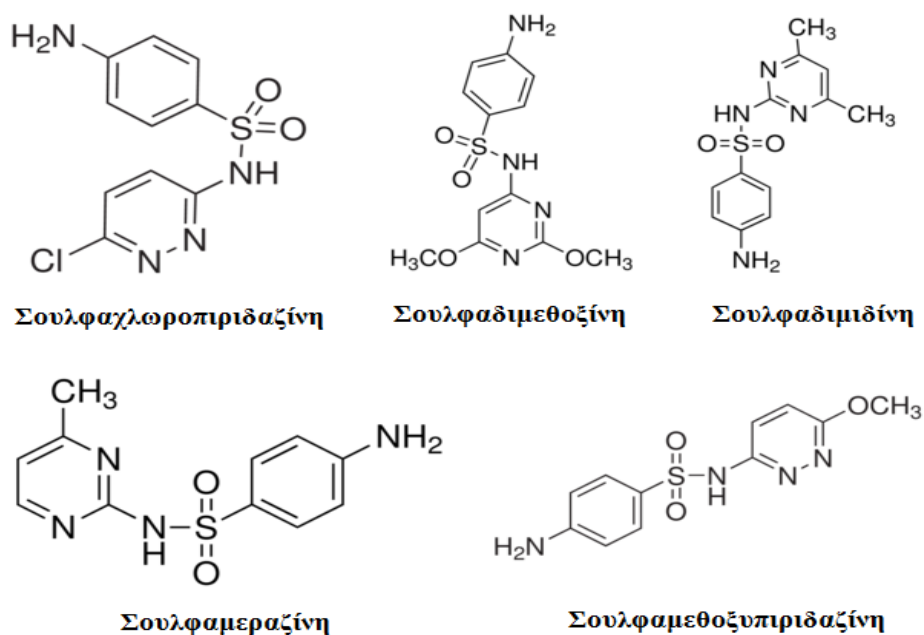
Πιο συγκεκριμένα οι αντιμικροβιακές ιδιότητες των σουλφοναμιδίων ανακαλύφθηκαν το 1935 από τον Gerhard Domagk. Ύστερα από εξέταση μεγάλου αριθμού χρωστικών ουσιών που περιείχαν την σουλφοναμιδική ομάδα (SO_2NH_2) δημοσίευσε στη Γερμανία μια εργασία που αναφερόταν στις αντιμικροβιακές ιδιότητες της προντοζίλης (prontosil). Όπως αποδείχτηκε αργότερα, οι αντιμικροβιακές ιδιότητες της προντοζίλης οφείλονταν στην ικανότητά της να απελευθερώνει στον οργανισμό την σουλφανιλαμίδα (Σχήμα 2.5). [85,95]



Σχήμα 2.4: Συντακτικοί τύποι του prontosil και της σουλφανιλαμίδης. [95]

Η σουλφανιλαμίδα είναι η απλούστερη σουλφοναμίδα και αποτελεί τη βασική σουλφοναμιδική ρίζα από την οποία ξεκίνησε η σύνθεση χιλιάδων (άνω των 5.000) συνθετικών παραγώγων. Από το μεγάλο αυτό αριθμό σουλφοναμιδίων λιγότερο από 80 βρήκαν θεραπευτική χρήση στην κτηνιατρική.

Αυτό γίνεται με την αντικατάσταση του υδρογόνου στην 4η και 1η θέση του αζώτου με διάφορες χημικές ρίζες. Ανάλογα με το ποια θέση υδρογόνου του αζώτου (N) στο σουλφοναμίδικό μόριο αντικαθίσταται τα παράγωγα ονομάζονται N-1 ή N-4 (Σχήμα 2.6). Τα σουλφοναμίδια, που χρησιμοποιούνται σαν αντιμικροβιακοί παράγοντες στην κτηνιατρική, είναι βασικά N-1 παράγωγα. Μόνο οι ενώσεις της σουλφαθειαζόλης (sulfathiazole), όπως η φθαλλοσουλφαθειαζόλη (phthalylsulfathiazole) είναι N-4 παράγωγα. [85]



Σχήμα 2.5. Συντακτικοί τύποι ορισμένων σουλφοναμίδων. [81]

Αν και τα σουλφοναμίδια είναι αμφοτερικές ενώσεις, συμπεριφέρονται εντούτοις σαν ασθενή οργανικά οξέα και διαλύονται καλύτερα σε αλκαλικό παρά σε όξινο περιβάλλον. Η σταθερά διάστασης (pK_a) των σουλφοναμίδων που έχουν θεραπευτικό ενδιαφέρον κυμαίνεται μεταξύ 4,8 και 8,6. [85]

2.3.2 Κατάταξη σουλφοναμίδων

Οι σουλφοναμίδες, ενώ έχουν ουσιαστικά το ίδιο αντιμικροβιακό φάσμα, διαφέρουν μεταξύ τους ως προς ορισμένες φαρμακοκινητικές ιδιότητες. Κυρίως ως προς την ημιπερίοδο αποβολής, δηλαδή το χρόνο που απαιτείται από τη στιγμή χορήγησής τους μέχρι την πτώση του επιπέδου τους στο αίμα κατά το ήμισυ. Με βάση το βαθμό απορρόφησης από τον εντερικό σωλήνα οι σουλφοναμίδες διακρίνονται σε διασυστημικής δράσης (χορηγούμενες σε περιπτώσεις γενικών λοιμώξεων) και σε σουλφοναμίδες χορηγούμενες επί λοιμώξεων του γαστρεντερικού (Πίνακας 2.1.). [85]

Πίνακας 2.1. Κατάταξη σουλφοναμίδων [85]

ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ ΕΠΙ ΓΕΝΙΚΩΝ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ	
Sulfanilamide (Σουλφανιλαμίδη)	Sulfamethoxypyridazine (Σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη)
Sulfadiazine (Σουλφαδιαζίνη)	Sulfaethoxypyridazine (Σουλφαιθοξυπυριδαζίνη)
Sulfapyrimidine (Σουλφαπυριμιδίνη)	Sulfamethoxypyrimidine
Sulfadimidine (Σουλφαδιμιδίνη)	Sulfafurazole (Σουλφαφουραζόλη)
Sulfamethazine (Σουλφαμεθαζίνη)	Sulfisoxazole (Σουλφισοξαζόλη)
Sulfamerazine (Σουλφαμεραζίνη)	Sulfabromomethazine (Σουλφαβρωμομεθαζίνη)
Sulfapyridine (Σουλφαπυριδίνη)	Sulfapyrazole (Σουλφαπυραζόλη)
Sulfadoxine (Σουλφαδοξίνη)	Sulfamethizole (Σουλφαμεθειζόλη)
Sulfadimethoxine (Σουλφαδιμεθοξίνη)	Sulfamethoxazole (Σουλφαμεθοξαζόλη)
Sulfasomidine (Σουλφασομοδίνη)	
Sulfachlorpyridazine (Σουλφαχλωροπυριδαζίνη)	
ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ ΕΠΙ ΛΟΙΜΩΞΕΩΝ ΓΑΣΤΡΕΝΤΕΡΙΚΟΥ	
Pthalylsulfathiazole (Φθαλυλοσουλφαθειαζόλη)	Pthalylsulfacetamide (Φθαλυλοσουλφακεταμίδη)
Succinylsulfathiazole (Σουκκινυλοσουλφαθειαζόλη)	Sulfaguanidine (Σουλφαγουανιδίνη)
Formosulfathiazole	Sulfaquinoxaline (Σουλφακινοξαλίνη)
	Sulfasalazine (Σουλφασαλαζίνη)
ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΕΣ ΤΟΠΙΚΗΣ ΧΡΗΣΕΩΣ	
Sulfacetamide (Σουλφακεταμίδη)	Mafenide (Μαφενίδη)
Sulfathiazole (Σουλφαθειαζόλη)	

Θα πρέπει εντούτοις να σημειωθεί ότι η κατάταξη των σουλφοναμίδων σε βραχείας και παρατεταμένης δράσης βασίζεται περισσότερο στις φαρμακοκινητικές τους ιδιότητες ως προς τον άνθρωπο. Στα ζώα οι ιδιότητες αυτές ποικίλλουν από ζώο σε ζώο, γι' αυτό η κατάταξη αυτή στις περισσότερες περιπτώσεις δεν έχει βάση.

2.3.3 Αντιμικροβιακό φάσμα

Οι σουλφοναμίδες αναστέλλουν την ανάπτυξη τόσο των κατά Gram θετικών όσο και κατά Gram αρνητικών βακτηριδίων. Επίσης είναι δραστικές έναντι μερικών χλαμυδίων, πρωτόζωων, όπως κοκκίδια και *Toxoplasma spp.* Το φάσμα δράσης των

διάφορων σουλφοναμίδων δε διαφέρει σημαντικά μεταξύ τους. Παρατηρούνται περισσότερο ποσοτικές διαφορές παρά ποιοτικές. Ειδικότερα η διαβάθμιση της δραστηριότητας των σουλφοναμίδων έχει ως εξής:

α) Ισχυρή δραστηριότητα έναντι των: *Escherichia coli* (λοιμώξεις του ουροποιητικού, σηψαιμία), *Shigella*, *Streptococcus pyogenes*, *Diplococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*.

β) Μέτρια δραστηριότητα έναντι των: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus albus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella*, *Brucella spp.*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium spp.*, *Eimeria spp.*, *Toxoplasma gondii*.

γ) Ασθενή δραστηριότητα έναντι των: *Salmonella spp.*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella spp.*, *Corynebacterium spp.*, *Plasmodia*.

δ) Καθόλου δραστηριότητα έναντι των: *Treponema*, *Borrelia*, *Spirilaceae*, *Mycobacterium*, ρικετσιών και μυκήτων. [84,85]

2.3.4 Αντιμετώπιση ασθενειών και χορήγηση σουλφοναμίδων κατ' είδος ζώου

Αιγοπρόβατα

Οι σουλφοναμίδες στα ενήλικα αιγοπρόβατα χορηγούνται παρεντερικά, για την αντιμετώπιση της μαστίτιδας, των πυοβακιλλικών λοιμώξεων, της λοιμώδους ποδοδερμίτιδας, της λοιμώδους κερατοεπιπεφικίτιδας, της ενζωτικής αποβολής. Στα αμνοερίφια πριν τη λειτουργία της μεγάλης κοιλίας οι σουλφοναμίδες χορηγούνται ως επί το πλείστον από το στόμα, για την αντιμετώπιση των κολιβακιλλικών γαστρεντερικών λοιμώξεων, της πολυαρθρίτιδας και των κοκκιδιάσεων.

Βοοειδή

Οι σουλφοναμίδες στα ενήλικα βοοειδή χορηγούνται παρεντερικά για την αντιμετώπιση της ακτινοβακίλλωσης, της ακτινομύκωσης, της μαστίτιδας, των πυοβακιλλικών λοιμώξεων, της παστεριδίωσης, της λοιμώδους ποδοδερμίτιδας και της λοιμώδους κερατοεπιπεφικίτιδας. Στους μόσχους πριν τη λειτουργία της μεγάλης κοιλίας οι σουλφοναμίδες χορηγούνται από το στόμα αλλά και παρεντερικά για την αντιμετώπιση των κολιβακιλλικών γαστρεντερικών λοιμώξεων, της πολυαρθρίτιδας, των κοκκιδιάσεων και των πνευμονικών λοιμώξεων. Η σουλφαδιμιδίνη είναι ίσως η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη σουλφοναμίδα στα μεγάλα ζώα. Αυτό οφείλεται μεταξύ άλλων στο χαμηλό της κόστος. Η σουλφαδιμεθοξίνη και η σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη

δίνουν ωστόσο μεγαλύτερης διάρκειας θεραπευτικά επίπεδα στο πλάσμα των βοοειδών σε σχέση με τη σουλφαδιμιδίνη.

Χοίροι

Ο ρυθμός απέκκρισης των σουλφοναμιδών στους χοίρους είναι βραδύτερος απ' ότι στα μηρυκαστικά και στα άλογα. Οι δόσεις τους συνεπώς στα ζώα αυτά είναι σχετικά χαμηλότερες. Προτιμάται η χορήγηση από το στόμα κυρίως με την τροφή και σπανιότερα με το νερό. Η σουλφαδιμιδίνη χρησιμοποιείται προληπτικά και θεραπευτικά σε μεγάλη έκταση για την αντιμετώπιση της ατροφικής ρινίτιδας και άλλων αναπνευστικών λοιμώξεων. Ευρύτατα χρησιμοποιείται επίσης ο συνδυασμός της σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης κυρίως στα νεογέννητα χοιρίδια και την περίοδο του απογαλακτισμού, για την αντιμετώπιση των γαστρεντερικών και αναπνευστικών λοιμώξεων.

Πτηνά

Οι σουλφοναμίδες στα πτηνά χορηγούνται σχεδόν αποκλειστικά με το πόσιμο νερό, για την αντιμετώπιση αναπνευστικών λοιμώξεων και της κοκκιδίασης.

Κουνέλια

Μεταξύ των σουλφοναμιδών που μπορούν να χορηγηθούν στα κουνέλια χωρίς την εκδήλωση ανεπιθύμητων ενεργειών συγκαταλέγονται η σουλφαδιμιδίνη, η σουλφαδοξίνη και ο κλασικός συνδυασμός σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης. [85]

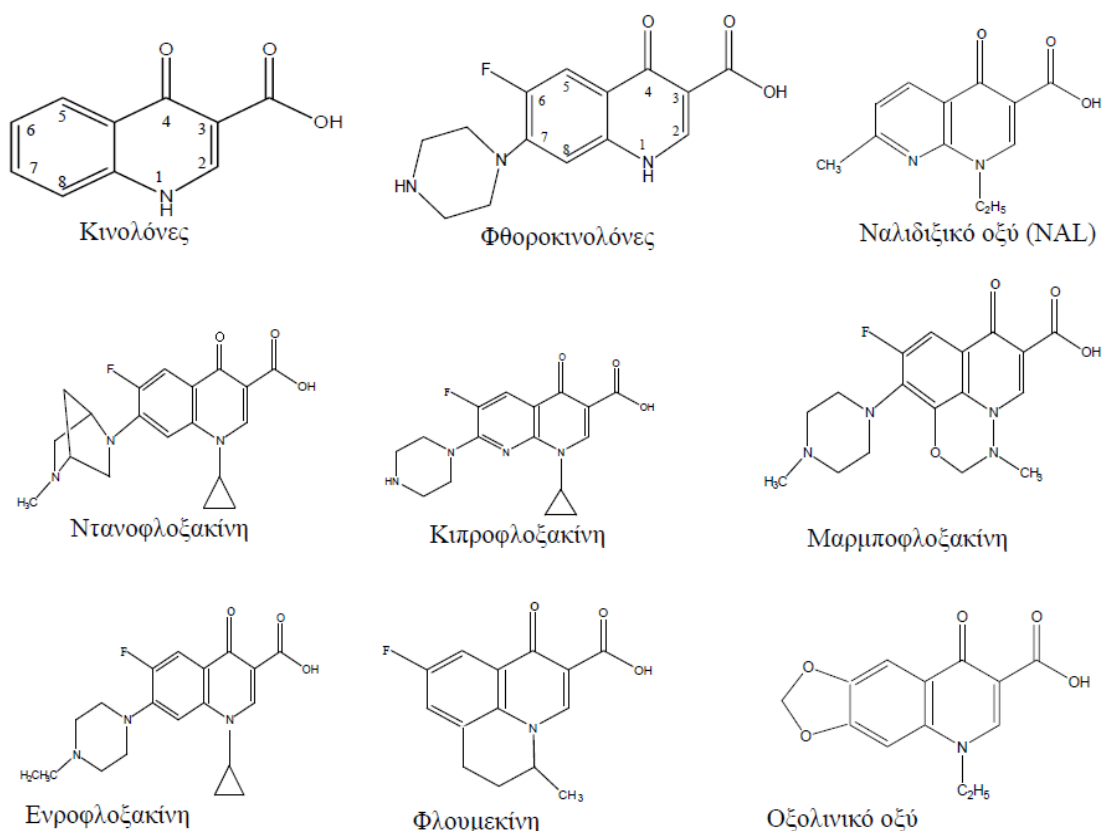
2.4 KINOLONEΣ (Quinolones)

2.4.1 Εισαγωγή

Οι «κινολόνες» αποτελούν μια κατηγορία αντιβιοτικών-αντιβακτηριακών φαρμάκων των οποίων η δράση εστιάζεται στην αναστολή της λειτουργίας του ενζύμου DNA-γυράση. Το πρώτο μέλος της ομάδας των κινολονών ανακαλύφθηκε το 1962 από τον Lescher και την ομάδα του και έγινε αποδεκτό από τον Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA, Food and Drug Administration) το 1963, για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Όλες οι κινολόνες διαθέτουν στο μόριό τους μια καρβοξυλική ομάδα στη θέση 3 και μια καρβόνυλο ομάδα στη θέση 4. Αργότερα με την εισαγωγή του φθορίου στη θέση 6 και της πιπεραζινυλικής ομάδας στη θέση 7, προέκυψε η δεύτερη γενιά των κινολονών, γνωστές ως «φθοροκινολόνες». [84]

2.4.2 Δομή-χαρακτηριστικά των κινολονών

Οι κινολόνες είναι καρβοξυλικά οξέα που περιλαμβάνουν είτε το δακτύλιο της ναφθυριδόνης, όπου στις θέσεις 1 και 8 υπάρχει άτομο του αζώτου (όπως είναι το ναλιδιξικό οξύ) ή το δακτύλιο της κινολόνης όπου υπάρχει μόνο ένα άτομο αζώτου στη θέση 1 (Σχήμα 2.8). Όλες οι δομικές αλλαγές γίνονται πάνω στη βασική δομή της κινολόνης και στον πυρήνα της ναφθυριδόνης, όπου προστίθενται στο μόριο επιπλέον αλυσίδες. Το ναλιδιξικό οξύ, η πρώτη κινολόνη, έχει πολλά δομικά χαρακτηριστικά όμοια με αυτά των μεταγενεστέρων κινολονών και βασίζεται στον πυρήνα του 4-οξο-1,8-ναφθυριδιν-3-καρβοξυλικού οξέος. Όλες οι κινολόνες περιλαμβάνουν ένα άτομο οξυγόνου εκτός του δακτυλίου στη θέση 4. Έχει αποδειχθεί ότι τόσο το εξω-κυκλικό αυτό οξυγόνο όσο και η καρβοξυλική ομάδα παίζουν το σημαντικότερο ρόλο στη δράση των ενώσεων αυτών. Οι περισσότερες ενώσεις που έχουν αναπτυχθεί βασίζονται στον πυρήνα της κινολόνης και όχι της ναφθυριδόνης. Η πρώτη ένωση με πυρήνα κινολόνης που συντέθηκε είναι η ροζοξακίνη η οποία έχει σημαντικές βελτιώσεις σε σχέση με το ναλιδιξικό οξύ.



Σχήμα 2.6. Χημική δομή ναλιδιξικού οξέως, κινολονών και φθοροκινολονών. [89]

Η εισαγωγή διακλάδωσης στη θέση 7 της πιπεραζινυλικής αλυσίδας βελτίωσε τη δράση έναντι των Gram-αρνητικών βακτηρίων και βοήθησε στη διεύρυνση του αντιβακτηριακού φάσματος κατά των *Pseudomonas*. Στην κατηγορία αυτή ανήκει το πιπεμιδικό οξύ, το οποίο επίσης χαρακτηρίζεται και από τη δράση έναντι των Gram-θετικών ειδών. Ο πιπεραζινικός δακτύλιος αύξησε την ικανότητα των κινολονών να διεισδύουν στα βακτηριακά κύτταρα, ενισχύοντας τη δράση τους. Η πρώτη ένωση με άτομο φθορίου στη θέση 6 ήταν η φλουμεκίνη η οποία ήταν η πρώτη ένωση με ενδείξεις ότι η δράση των ενώσεων αυτής της ομάδας κατά των Gram-θετικών βακτηρίων μπορεί να βελτιωθεί. [96]

Η πραγματική επανάσταση έγινε όταν συνδυάστηκαν τα δύο παραπάνω χαρακτηριστικά σε ένα μόριο, στο μόριο της νορφλοξακίνης, η οποία χαρακτηρίζεται ως 6-φθοριωμένη ένωση με πιπεραζινικό δακτύλιο στη θέση 7. Η νορφλοξακίνη έχει ευρύ φάσμα δράσης κατά των Gram-αρνητικών και ορισμένων Gram-θετικών βακτηρίων. Γεγονός ήταν πως η νορφλοξακίνη σημάδεψε μια επιτυχημένη περίοδο ερευνών για αλλαγές στα μόρια των φθοροκινολονών. Μετά τη νορφλοξακίνη κυκλοφόρησαν στην αγορά αρκετές ακόμα φθοροκινολόνες που χρησιμοποιούνται μέχρι σήμερα, όπως η ενοξακίνη, η κιπροφλοξακίνη (όπου η εισαγωγή της κυκλοπρόπυλο ομάδας στη θέση 1 συνέβαλε σημαντικά στη βελτίωση της δράσης της) και η οφλοξακίνη. Τα πλεονεκτήματα των ενώσεων αυτών είναι ότι έχουν ευρύ φάσμα δράσης κατά των Gram-θετικών ειδών, αλλά και κατά των Gram-αρνητικών και ότι απορροφώνται εύκολα από τα γαστρεντερικά όργανα εξασφαλίζοντας ικανοποιητικές συγκεντρώσεις στο αίμα, επιτρέποντας τη συστηματική τους χρήση για την αντιμετώπιση μολύνσεων. Ύστερα από αρκετά χρόνια χρήσης και μελετών αυτών των ενώσεων έχει αποδειχθεί ότι η δράση τους κατά των Gram-θετικών βακτηρίων είναι ανεπαρκής για την αντιμετώπιση μολύνσεων του αναπνευστικού συστήματος. Επίσης παρ' όλο που η ανάπτυξη της αντοχής σε αυτά τα είδη είναι σχετικά μικρή σε σχέση με το ναλιδιξικό οξύ, για ορισμένα είδη, όπως για τα *Staphylococcus aureus* και τα *Pseudomonas aeruginosa*, η αντοχή έχει αρχίσει να γίνεται ανησυχητική. [82,97]

2.4.3 Αντιμικροβιακή δράση

Τα μέλη της πρώτης γενιάς των αντιβιοτικών (ναλιδιξικό οξύ, φλουμεκίνη, οξολινικό οξύ) ήταν δραστικά κυρίως κατά των Gram-αρνητικών βακτηρίων (*Salmonella spp.*, *E. coli*, *Bordella spp.* και *Yersinia spp.*). Από τη σύνθεση της

νορφλοξακίνης, ξεκίνησε η δεύτερη γενιά των κινολονών, που ονομάστηκαν φθοροκινολόνες. Το φάσμα δράσης των φθοροκινολονών διευρύνθηκε και κατά των Gram-θετικών βακτηρίων (*Staphylococci*, *Streptococci*, *Listeria monocytogenes*), συμπεριλαμβάνοντας επίσης τα *Campylobacter spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma spp* και κατά των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών αναερόβιων βακτηρίων. Εξαιρετική in vitro δράση παρατηρείται κατά των περισσότερων εντεροβακτηρίων, περίπλοκων Gram-αρνητικών βακτηρίων, συμπεριλαμβανομένων των *Haemophilus spp.* και Gram-αρνητικών βακτηρίων, όπως οι *Neissera gonorrhea*, *Neissera meningitides* και *Moraxella catarrhalis*. Επίσης έχει αποδειχθεί ότι η 8-μεθοξυ-ομάδα των κινολονών αυξάνει τη δράση τους κατά των Gram-θετικών βακτηρίων. [82,84,98]

2.4.4 Ταξινόμηση κινολονών

Η ταξινόμηση των κινολονών μπορεί να γίνει με διάφορα κριτήρια: την ημερομηνία έγκρισής τους, τη γενιά τους, τη χημική τους δομή, το αντιβακτηριακό τους φάσμα δράσης, τη μορφή με την οποία χορηγούνται κ.ά. Παρ' όλα αυτά δεν προτείνεται κάποια συγκεκριμένη ταξινόμησή τους. Διαφορετικές απόψεις προτείνονται από τους ειδικούς καταλήγοντας σε περισσότερα από ένα μοντέλα ταξινόμησής τους. [99]

Μια πρώτη ταξινόμησή τους μπορεί να είναι αυτή που χωρίζει τις κινολόνες σε δύο γενιές. Οι πρώτης γενιάς είναι οι κινολόνες που δεν περιέχουν το άτομο του φθορίου στο μόριό τους, όπως είναι το ναλιδιξικό οξύ και το οξολινικό οξύ και οι δεύτερης γενιάς που περιλαμβάνονται οι ενώσεις που φέρουν άτομο φθορίου.

Η αντιμικροβιακή δράση των κινολονών είναι ένα άλλο κριτήριο για την ομαδοποίησή τους. Μια άλλη ταξινόμηση των κινολονών η οποία βασίζεται στις κλινικές εφαρμογές, δίνεται στον Πίνακα 2.2. Σύμφωνα με αυτή την ταξινόμηση, οι κινολόνες της πρώτης γενιάς π.χ. ναλιδιξικό και οξολινικό οξύ είναι ενώσεις με Gram αρνητική δράση, που συνήθως χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Οι δεύτερης γενιάς π.χ. νορφλοξακίνη, κiproφλοξακίνη, διαθέτουν δράση κατά των Gram-θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Τα μέλη της τρίτης γενιάς όπως η τεμαφλοξακίνη έχουν ισχυρή δράση κατά των *Staphylococci*, καθώς και διευρυμένο φάσμα δράσης κατά των αναερόβιων βακτηρίων, *Chlamydia* και

Mycoplasma. Τα μέλη της τέταρτης γενιάς χρησιμοποιούνται για ενδο-γαστρικές λοιμώξεις, μεταξύ άλλων εφαρμογών.

Τέλος υπάρχει άλλη μία ταξινόμηση των κινολονών, αυτή με βάση τους υποκαταστάτες στις θέσεις N-1, C-5 και C-7, στη θέση 8 και στα τρικυκλικά μόρια. [96,100]

Πίνακας 2.2. Ταξινόμηση των κινολονών σύμφωνα με την κλινική τους χρήση και το αντιμικροβιακό τους φάσμα δράσης. [84,96]

Ταξινόμηση	Κινολόνες	Κλινικές Εφαρμογές
1ης γενιάς κινολόνες	Ναλιδιξικό οξύ Κινοξακίνη Οξολινικό οξύ Φλουμεκίνη Πιπεμιδικό οξύ	-Απλές μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος
2ης γενιάς κινολόνες	Ροζοξακίνη Λομεφλοξακίνη Νορφλοξακίνη Οφλοξακίνη Ενροφλοξακίνη Κιπροφλοξακίνη Ενοξακίνη	- Απλές μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος - Πολύπλοκες μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος -Πυελονεφρίτιδα -Σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες -Προστάτης αδένας -Μολύνσεις του δέρματος και των ιστών
3ης γενιάς κινολόνες	Αμιφλοξακίνη Φλεροξακίνη Γκατιφλοξακίνη Γκεμιφλοξακίνη Πεφλοξακίνη Ρουφλοξακίνη Σπαρφλοξακίνη Τεμαφλοξακίνη Τοζουφλοξακίνη Σαραφλοξακίνη	- Απλές μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος - Πολύπλοκες μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος -Πυελονεφρίτιδα -Σεξουαλικά μεταδιδόμενες ασθένειες -Προστάτης αδένας -Μολύνσεις του δέρματος και των ιστών -Οξείες χρόνιες βρογχίτιδες -Ιογενείς πνευμονίες
4ης γενιάς κινολόνες	Γρεπαφλοξακίνη Λεβοφλοξακίνη Μαξιφλοξακίνη Τροβαφλοξακίνη	-Δράσεις των τριών πρώτων γενεών -Ενδο-γαστρικές μολύνσεις -Εξαιρετικά πολύπλοκες μολύνσεις του ουροποιητικού συστήματος -Εξαιρετικές πυελονεφρίτιδες -Ενδονοσοκομειακές πνευμονίες -Γυναικολογικές μολύνσεις

2.4.5 Χρήση στην Κτηνιατρική

Σημαντική και ολοένα αυξανόμενη είναι την τελευταία δεκαετία η χρήση των κινολονών και των φθοροκινολονών στην κτηνιατρική. Η σαραφλοξακίνη ήταν η πρώτη φθοροκινολόνη, η χρήση της οποίας επιτράπηκε για θεραπευτικούς σκοπούς στα πουλικά, από τον Αμερικάνικο Οργανισμό Τροφίμων και Φαρμάκων (US Food and Drug Administration). Έκτοτε οι κινολόνες άρχισαν να χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία, στην πτηνοτροφία και στις ιχθυοκαλλιέργειες για την αντιμετώπιση λοιμώξεων του ουροποιητικού, του αναπνευστικού και του γαστρεντερικού συστήματος. Επίσης χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία κτηνιατρικών νοσημάτων σε ζώα που προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο. Αρκετές κινολόνες αναπτύχθηκαν αποκλειστικά για κτηνιατρική χρήση. Για παράδειγμα η ντανοφλοξακίνη, η ενροφλοξακίνη και η σαραφλοξακίνη χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία αναπνευστικών και εντερικών βακτηριακών μολύνσεων στην πτηνοτροφία, στην κτηνοτροφία και στις ιχθυοκαλλιέργειες. [82,96]

2.4.6 Αντοχή στις φθοροκινολόνες

Η αντοχή στις φθοροκινολόνες βασίζεται είτε στη μετάλλαξη του βακτηρίου σε ανθεκτικό στο φάρμακο, είτε στη μείωση της ενδο-κυτταρικής συγκέντρωσης του φαρμάκου. Οι δομικές μεταλλάξεις αφορούν τα γονιδιώματα *gyrA* και *gyrB* (κώδικες της DNA γυράσης) και τα *parC*, *parE* (κώδικες της τοποϊσομεράσης IV). Πλήθος μεταλλάξεων έχει παρατηρηθεί σε ποικιλία γονιδιακών στόχων, μεγάλου εύρους των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων. Η επίδραση των μεταλλάξεων ποικίλλει ανάλογα με τις φθοροκινολόνες. [96,101]

2.5 ΚΑΤΑΛΟΙΠΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Τα κτηνοτροφικά προϊόντα, (εδώδιμοι ιστοί, γαλακτοκομικά, αυγά) αφενός μεν καταλαμβάνουν ένα πολύ μεγάλο τμήμα του σύγχρονου τρόπου διατροφής, αφετέρου έχουν μεγάλη σημασία για τη σωστή θρέψη και ανάπτυξη του ανθρώπου. Περιέχουν πρωτεΐνες, σίδηρο, βιταμίνη B₁₂ που λαμβάνεται μόνο από ζωικά προϊόντα, κ.α. Όμως ελλοχεύουν και πολλοί κίνδυνοι από την κατανάλωση ζωικών προϊόντων. Αυτοί οι κίνδυνοι αφορούν παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια και παράσιτα), κατάλοιπα φαρμάκων-αντιβιοτικών και χημικές ουσίες (πρόσθετες ύλες στις ζωοτροφές). Επιπλέον μπορεί να εμφανιστούν προβλήματα στην υγεία από τη μη ισορροπημένη και

κακή διατροφή από τα προϊόντα αυτά και κυρίως από την κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων κρέατος κακής ποιότητας. Είναι γεγονός ότι κατά καιρούς έχουν απασχολήσει την κοινή γνώμη μεγάλα διατροφικά ζητήματα, όπως το σύνδρομο των τρελών αγελάδων, η νόσος των πουλερικών, η γρίπη των χοίρων και οι διοξίνες σε πουλερικά και χοίρους. [102]

Ο όρος κατάλοιπα αναφέρεται σε ό,τι μένει στα κτηνοτροφικά προϊόντα από φάρμακα που χορηγήθηκαν άμεσα στα ζώα (είτε για θεραπεία, είτε για πρόληψη ασθενειών, είτε ως αυξητικοί παράγοντες) ή έλαβαν έμμεσα τα ζώα (κατά τη βόσκησή τους στους αγρούς ή καταναλώνοντας τροφές, δημητριακά ή καρπούς επιβαρυνμένους με φυτοπροστατευτικά προϊόντα), καθώς και στους μεταβολίτες των φαρμάκων. Μία μεγάλη ποικιλία αντιβιοτικών χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς, προληπτικούς και αυξητικούς (όπου και για όποια αντιβιοτικά επιτρέπεται) σκοπούς στην εκτροφή των παραγωγικών ζώων. Ως αποτέλεσμα ο κίνδυνος αυτών των φαρμάκων να υφίστανται στα τελικά προϊόντα και μέσω της κατανάλωσης να περνούν στον άνθρωπο, είναι σημαντικός. Στο πλαίσιο της προσπάθειας περιορισμού του φαινομένου αυτού και προστασίας των καταναλωτών, καταβάλλονται προσπάθειες περιορισμού της χορήγησης αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων σε παραγωγικά ζώα σε παγκόσμιο επίπεδο. Παράλληλα πραγματοποιούνται έλεγχοι με στόχο, τόσο την ανίχνευση, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό καταλοίπων αντιβιοτικών σε κτηνοτροφικά προϊόντα. [78,103]

2.6 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ ΣΤΑ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΑ ΖΩΑ ΚΑΙ ΣΤΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΟΥΣ

2.6.1 Νομοθεσία της Ε.Ε. για τα κατάλοιπα αντιβιοτικών σε τρόφιμα

Η ασφάλεια των τροφίμων και η προστασία της υγείας των καταναλωτών αποτελούν βασική επιδίωξη και στόχο της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Έτσι η Ευρωπαϊκή Επιτροπή, αλλά και τα επιμέρους κράτη – μέλη έχουν αρχίσει να επανεξετάζουν τον τρόπο με τον οποίο χειρίζονται τη διατροφική αλυσίδα και τη γενική αναδιατύπωση της κοινοτικής νομοθεσίας σε σταθερές επιστημονικές βάσεις και στα σύγχρονα δεδομένα. Στο πλαίσιο αυτό έχουν ληφθεί ορισμένες δράσεις: α) Η δημιουργία της Ευρωπαϊκής Αρχής για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA, European Food Safety Authority), μιας ανεξάρτητης υπηρεσίας τροφίμων, της οποίας ευθύνη είναι η επιστημονική αξιολόγηση και επικοινωνία, σε στενή συνεργασία με τους εθνικούς οργανισμούς και

τις εθνικές επιστημονικές οργανώσεις (με τον κανονισμό (ΕΚ) με αριθμό 178/2002). Επιπλέον η EFSA αξιολογεί τους κινδύνους που συνδέονται με την τροφική αλυσίδα και ενημερώνει το ευρύ κοινό για τους πραγματικούς και τους αναδυόμενους κινδύνους. β) Η αναδιοργάνωση της κοινοτικής νομοθεσίας και κατ' επέκταση και των εθνικών νομοθεσιών. γ) Η δημιουργία οργανισμών υπεύθυνων για την ασφάλεια των τροφίμων σε εθνικό επίπεδο (π.χ. Ενιαίος Φορέας Ελέγχου Τροφίμων, ΕΦΕΤ) σε όλα τα κράτη – μέλη και η συνεργασία μεταξύ τους.

Για να υιοθετηθεί συνολική και ολοκληρωμένη προσέγγιση «από το αγρόκτημα μέχρι το τραπέζι» (farm to table), η νομοθεσία πρέπει να καλύπτει όλες τις πτυχές της αλυσίδας παραγωγής τροφίμων: την παραγωγή, τη μεταποίηση, τη μεταφορά, τη διανομή και τη διάθεση των τροφίμων ή των ζωοτροφών. Σε όλα τα στάδια αυτής της αλυσίδας τη νομική ευθύνη για τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων έχει η επιχείρηση των τροφίμων και παρόμοιο σύστημα εφαρμόζεται στις επιχειρήσεις των ζωοτροφών. [104,105,106]

Σε αντίθεση με ότι συμβαίνει στις ΗΠΑ και σε άλλες χώρες, η Ευρωπαϊκή νομοθεσία διαχειρίζεται το ζήτημα των κτηνιατρικών σκευασμάτων διακρίνοντας τις δύο διαφορετικές χρήσεις τους πλήρως, και θέτοντας διαφορετικά κριτήρια για κάθε μία. Έτσι από τη μία πλευρά υπάρχουν τα κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται για θεραπευτικούς σκοπούς και από την άλλη τα πρόσθετα διατροφής που χορηγούνται ως αυξητικοί παράγοντες. Η διάκριση αυτή ξεκίνησε τη δεκαετία του 1970 με την οδηγία 70/524 ΕΟΚ, η οποία άρχισε να εφαρμόζεται από το 1975. Με την οδηγία αυτή η Ευρωπαϊκή Ένωση απαγόρευε τη χορήγηση των περισσότερων αντιβιοτικών, αλλά και άλλων φαρμάκων τα οποία χρησιμοποιούνται στην ιατρική και στην κτηνιατρική για θεραπευτικούς σκοπούς ως αυξητικά πρόσθετα στην κτηνοτροφία. Η προσπάθεια αυτή ολοκληρώθηκε με την οδηγία 96/51 ΕΕ καθώς απαγορεύει ρητά τη χρησιμοποίηση οποιουδήποτε φαρμακευτικού προϊόντος για θεραπευτικούς και αυξητικούς σκοπούς ταυτόχρονα. Μετέπειτα η Ευρωπαϊκή Ένωση κατήργησε τη χρήση όλων των αντιβιοτικών (εκτός των κοκκιδιοστατικών και των ιστομονοστατικών) ως πρόσθετες ύλες στις ζωοτροφές από την 1/1/2006, σύμφωνα με το άρθρο 11 του Κανονισμού 1831/2003 ΕΚ. Σε ότι αφορά τη χρησιμοποίηση των κοκκιδιοστατικών και των ιστομονοστατικών ως πρόσθετες ύλες στις ζωοτροφές αποφασίστηκε η σταδιακή κατάργησή τους έως την 31 Δεκεμβρίου 2012. [90,104,107,108,109]

2.6.2 Κτηνιατρικά φάρμακα

Ως κτηνιατρικό φάρμακο ορίζεται σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία, κάθε ουσία ή σύνθεση ουσιών που φέρεται να έχει θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες έναντι των ασθενειών των ζώων. Θεωρείται, επίσης, κτηνιατρικό φάρμακο κάθε ουσία ή σύνθεση ουσιών που δύναται να χορηγηθεί σε ζώο με σκοπό να γίνει ιατρική διάγνωση ή να αποκατασταθούν, να βελτιωθούν ή να τροποποιηθούν φυσιολογικές λειτουργίες στο ζώο ασκώντας φαρμακολογική, ανοσολογική ή μεταβολική δράση. Η παραγωγή, πώληση, προμήθεια και χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων στην Ευρωπαϊκή Ένωση ρυθμίζονται με βάση την αρχική οδηγία 2001/82 ΕΚ και από τις τροποποιήσεις της: οδηγία 2004/28 ΕΚ, 2009/53 ΕΚ και τον κανονισμό 470/2009 ΕΚ. Επιπλέον οι τέσσερις αυτοί κλάδοι κτηνιατρικών φαρμάκων ελέγχονται από την επιτροπή για τα κτηνιατρικά φαρμακευτικά σκευάσματα (Committee for veterinary medicinal products, CVMP), στο πλαίσιο της ευρωπαϊκής υπηρεσίας για την αξιολόγηση των φαρμάκων (European Agency for the Evaluation of Medicines, EMA). [103,110,111,112,113]

Για να προστατεύεται η δημόσια υγεία, οι φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες, με βάση την επιστημονική αξιολόγηση της ασφάλειας των εν λόγω ουσιών, ταξινομήθηκαν σε τέσσερα παραρτήματα του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90 του Συμβουλίου, της 26ης Ιουνίου 1990, για τη θέσπιση κοινοτικής διαδικασίας για τον καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Επίσης σύμφωνα με τον κανονισμό αυτό ορίστηκε ως «κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων» να θεωρούνται όλες οι φαρμακολογικά ενεργές ενώσεις, είτε πρόκειται για ενεργά συστατικά, είτε για έκδοχα, είτε για προϊόντα αποικοδόμησης ή μεταβολισμού που παραμένουν στα τρόφιμα που προέρχονται από ζώα στα οποία χορηγήθηκε το συγκεκριμένο κτηνιατρικό φάρμακο.

Ως «ανώτατο όριο καταλοίπων» ορίζεται η μέγιστη συγκέντρωση καταλοίπων που προκύπτει από τη χρήση του κτηνιατρικού φαρμάκου (εκφρασμένη σε mg/kg ή µg/kg με βάση το βάρος του νωπού προϊόντος) η οποία μπορεί να θεωρείται ως νομίμως επιτρεπτή από την Ε.Ε. ή να αναγνωρίζεται ως αποδεκτή εντός ή επί του τροφίμου. Το όριο αυτό βασίζεται στον τύπο και στην ποσότητα καταλοίπων που θεωρείται ότι δε συνεπάγονται τοξικολογικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, όπως εκφράζονται με την παραδεκτή ημερήσια δόση, ή σε προσωρινή παραδεκτή ημερήσια δόση που χρησιμοποιεί πρόσθετο παράγοντα ασφαλείας. Το όριο αυτό λαμβάνει επίσης

υπόψη άλλους κινδύνους για τη δημόσια υγεία, καθώς και την τεχνολογία τροφίμων. Κατά τη θέσπιση του ανώτατου ορίου καταλοίπων, λαμβάνονται επίσης υπόψη τα κατάλοιπα που εμφανίζονται σε τρόφιμα φυτικής προέλευσης ή/και στο περιβάλλον. Επιπλέον, το όριο αυτό μπορεί να μειώνεται, ώστε να συμβιβάζεται με την ορθή πρακτική κατά τη χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων και στο βαθμό που υφίστανται πρακτικές αναλυτικές μέθοδοι. Με τη θέσπιση των ανώτατων ορίων καταλοίπων διευκολύνεται η εμπορία των τροφίμων ζωικής προέλευσης μεταξύ των κρατών-μελών της Ένωσης αλλά και ευρύτερα στην παγκόσμια αγορά.

Επιπλέον στο παράρτημα I του εν λόγω κανονισμού περιλαμβάνονταν ουσίες για τις οποίες έχουν καθοριστεί ανώτατα όρια καταλοίπων, στο παράρτημα II περιλαμβάνονταν ουσίες για τις οποίες δεν είναι αναγκαίο να καθοριστεί κανένα ανώτατο όριο καταλοίπων, στο παράρτημα III περιλαμβάνονταν ουσίες για τις οποίες έχουν καθοριστεί προσωρινά ανώτατα όρια καταλοίπων και στο παράρτημα IV περιλαμβάνονταν ουσίες για τις οποίες δεν καθορίζεται κανένα ανώτατο όριο λόγω του ότι τα κατάλοιπα των εν λόγω ουσιών, ανεξαρτήτως ορίων, συνιστούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.

Ωστόσο λόγω της επιστημονικής και τεχνικής προόδου, η παρουσία καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων στα τρόφιμα ήταν δυνατόν να ανιχνεύεται σε όλο και χαμηλότερα επίπεδα. Εκτός αυτού υπήρχε ανάγκη για αύξηση των διαθέσιμων ειδών κτηνιατρικών φαρμάκων καθώς και φαρμάκων για ειδικές παθήσεις ζώων παραγωγής τροφίμων. Το πρόβλημα αυτό εντεινόταν από το ό,τι είχε γίνει χρονοβόρα και ασύμφορη η αδειοδότηση νέων κτηνιατρικών φαρμάκων. Επιπλέον η ανάγκη προστασίας της δημόσιας υγείας σύμφωνα με τις σύγχρονα αναγνωρισμένες αρχές εκτίμησης της ασφάλειας από διεθνείς οργανισμούς ή επιστημονικούς φορείς θεσπισμένους στην Κοινότητα, λαμβάνοντας υπόψη τους τοξικολογικούς κινδύνους, την περιβαλλοντική ρύπανση, καθώς και τις μικροβιολογικές και φαρμακολογικές επιδράσεις των καταλοίπων, οδήγησε τα όργανα της ΕΕ στην κατάργηση του κανονισμού αριθ. 2377/90 ΕΟΚ και στην δημιουργία ενός νέου κανονισμού με αριθμό 470/2009 ΕΚ (της 6ης Μαΐου 2009) για τη θέσπιση κοινοτικών διαδικασιών σε σχέση με τον καθορισμό ορίων καταλοίπων των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. [Στο Παράρτημα 2 παρατίθενται τα ανώτατα όρια καταλοίπων αντιβιοτικών όπως ορίζονται από την Ε.Ε. για τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης.] [103,114]

Απαραίτητη προϋπόθεση για την αδειοδότηση οποιουδήποτε κτηνιατρικού φαρμάκου ήταν και είναι η ύπαρξη καθορισμένων ανώτατων ορίων καταλοίπων Maximum Residue Limits, MRLs) στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Σε αντίθεση με την αδειοδότηση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου η οποία μπορεί να γίνει τόσο σε κεντρικό ευρωπαϊκό επίπεδο, όσο και σε επίπεδο μιας χώρας-μέλους, ο καθορισμός των MRLs γίνεται κεντρικά από την επιτροπή για τα κτηνιατρικά φαρμακευτικά σκευάσματα (CVMP). Για λόγους απλούστευσης και σαφήνειας η ΕΕ σε νέο κανονισμό με αριθμό 37/2010 (της 22ας Δεκεμβρίου 2009) ταξινόμησε τις φαρμακολογικώς δραστικές ουσίες όσον αφορά τα ανώτατα όρια καταλοίπων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης σε δύο ξεχωριστούς πίνακες: έναν για τις επιτρεπόμενες ουσίες, που περιλαμβάνονταν στα παραρτήματα I, II και III του κανονισμού (ΕΟΚ) αριθ. 2377/90, και έναν για τις απαγορευμένες ουσίες που περιλαμβάνονταν στο παράρτημα IV του εν λόγω κανονισμού. Επιπλέον στον πρώτο πίνακα του νέου κανονισμού αναφέρονται αναλυτικά όλα τα ανώτατα όρια καταλοίπων των φαρμακολογικώς δραστικών ουσιών στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. [103,114,115]

2.6.3 Φαρμακούχες ζωοτροφές

Ως φαρμακούχος ζωοτροφή ορίζεται σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία κάθε μίγμα κτηνιατρικού φαρμάκου και ζωοτροφής που διατίθεται στην αγορά έτοιμο προς χρήση και προορίζεται να χορηγηθεί στα ζώα χωρίς άλλη επεξεργασία, λόγω των θεραπευτικών ή προληπτικών ιδιοτήτων του ή των άλλων ιδιοτήτων του φαρμάκου, όπως αυτές αναφέρονται στον ορισμό του κτηνιατρικού φαρμάκου. Η παραγωγή, πώληση, προμήθεια και χρήση των φαρμακούχων ζωοτροφών στην Ευρωπαϊκή Ένωση ρυθμίζεται από την οδηγία 90/167 ΕΟΚ. Οι φαρμακούχες ζωοτροφές επιτρέπεται να παρασκευάζονται μόνο από προμείγματα για φαρμακούχες ζωοτροφές, η παραγωγή και χρήση των οποίων καθορίζεται από την αρχική οδηγία 2001/82 ΕΚ και από τις τροποποιήσεις της: οδηγία 2004/28 ΕΚ, 2009/53 ΕΚ και τον κανονισμό 470/2009 ΕΚ. Ως φαρμακούχο πρόμειγμα ορίζεται κάθε κτηνιατρικό φάρμακο εκ των προτέρων παρασκευασμένο με σκοπό τη μεταγενέστερη παρασκευή φαρμακούχων ζωοτροφών. Για να χρησιμοποιηθεί μία δραστική ουσία σε φαρμακούχο πρόμειγμα πρέπει προηγουμένως να έχει καταχωρηθεί σε κάποιο από τα τρία πρώτα παραρτήματα του κανονισμού 2377/90 ΕΟΚ και από τη 10^η Φεβρουαρίου 2010 και στον πρώτο πίνακα του κανονισμού 37/2010, ώστε να έχει καθορισμένα ανώτατα όρια καταλοίπων.

Υπολογίζεται ότι το 60% των αντιβιοτικών χορηγούνται στα ζώα με τη μορφή φαρμακούχων ζωοτροφών. [113,114,116]

2.6.4 Έλεγχος της παρουσίας καταλοίπων αντιβιοτικών

Ο έλεγχος της παρουσίας διαφόρων ειδών καταλοίπων στα ίδια τα ζώα αλλά και σε άλλα προϊόντα ζωικής προέλευσης (κρέας, γάλα, αυγά, μέλι, ψάρια) ρυθμίζεται μέσω της οδηγίας 96/23 ΕΚ. Ως κατάλοιπο ορίζεται κάθε κατάλοιπο είτε ουσιών που έχουν φαρμακολογικά δράση είτε των προϊόντων αποικοδόμησής τους, καθώς και άλλων ουσιών που μεταφέρονται στα ζωικά προϊόντα και μπορούν να βλάψουν την ανθρώπινη υγεία. Η οδηγία περιλαμβάνει διάφορα είδη καταλοίπων, όπως κτηνιατρικά φάρμακα και φαρμακούχες ζωοτροφές, περιβαλλοντικά απόβλητα, χημικές ουσίες και αυξητικά πρόσθετα. Επιπλέον καθορίζει τις μεθόδους δειγματοληψίας και τις συνθήκες κάτω από τις οποίες γίνεται ο έλεγχος των παραγωγών ζώων και των προϊόντων τους. Τέλος μέσω της οδηγίας αυτής οργανώνεται ένα δίκτυο εργαστηρίων και προγραμμάτων επιτήρησης για τον έλεγχο των καταλοίπων, τόσο σε ευρωπαϊκό, όσο και σε εθνικό επίπεδο. [117]

Σύμφωνα με την οδηγία οι ουσίες-κατάλοιπα χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες την ομάδα Α που περιλαμβάνει τις ουσίες για τις οποίες υπάρχει μηδενική αντοχή και την ομάδα Β, η οποία περιλαμβάνει όλα τα κτηνιατρικά φάρμακα για τα οποία έχουν καθοριστεί όρια και διάφορες άλλες ουσίες.

Σε αντίθεση με ότι ισχύει στις ΗΠΑ, αλλά και σε άλλες χώρες, στην Ευρωπαϊκή Ένωση δεν ορίζονται πρότυπες τεχνικές και μέθοδοι τις οποίες οφείλουν να χρησιμοποιούν τα κράτη-μέλη και τα εργαστήρια του προγράμματος επιτήρησης για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό των καταλοίπων αντιβιοτικών στα παραγωγικά ζώα και στα πρωτογενή προϊόντα τους. Αντίθετα μέσω της οδηγίας 96/23 ΕΚ καθορίζονται τα κριτήρια επίδοσης, τα διάφορα χαρακτηριστικά και τα όρια που θα πρέπει να πληρούν οι διάφορες αναλυτικές τεχνικές και μέθοδοι για να χρησιμοποιηθούν στον έλεγχο των καταλοίπων. Η τακτική αυτή προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα με κυριότερο τη μεγάλη ευελιξία, καθώς επιτρέπει την άμεση προσαρμογή των χρησιμοποιούμενων αναλυτικών μεθόδων στις τεχνολογικές εξελίξεις, ενώ παράλληλα δίνει τη δυνατότητα γρήγορης αντιμετώπισης καινούριων προβλημάτων ανάλογα με τις εκάστοτε απαιτήσεις.

Για την εφαρμογή της οδηγίας 96/23 ΕΚ εκδόθηκε η απόφαση 2002/657 ΕΚ, η οποία προσδιορίζει με μεγάλη ακρίβεια τα χαρακτηριστικά επίδοσης των αναλυτικών τεχνικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέθοδοι επιβεβαίωσης στον προσδιορισμό οργανικών καταλοίπων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι τεχνικές αυτές είναι η υγρή ή η αέρια χρωματογραφία (LC ή GC) σε συνδυασμό με φασματομετρία μαζών ή υπερύθρου (MS ή IR) για τα κατάλοιπα τόσο της ομάδας Α όσο και της ομάδας Β, ενώ για τα κατάλοιπα της ομάδας Β μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν η υγρή χρωματογραφία με ανιχνευτή του υπεριώδους (UV/Vis), με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (DAD), με φθορισμόμετρο και με ανοσογράφημα, αλλά και η αέρια χρωματογραφία με ανιχνευτή δέσμησης ηλεκτρονίων (ECD) και η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας με ανιχνευτή UV/Vis πλήρους σάρωσης.

Επιπροσθέτως η απόφαση 2002/657 ΕΚ διασφαλίζει την ποιότητα και τη συγκρισιμότητα των αναλυτικών αποτελεσμάτων των εργαστηρίων που διενεργούν ελέγχους καταλοίπων φαρμακολογικά ενεργών ενώσεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση συστημάτων διασφάλισης ποιότητας και συγκεκριμένα με την εφαρμογή μεθόδων που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με κοινές διαδικασίες και κριτήρια επίδοσης.

Ως αποτέλεσμα της προόδου που έχει συντελεσθεί στην αναλυτική χημεία μετά την έκδοση της οδηγίας 96/23/ΕΚ η έννοια των συνήθων μεθόδων και των μεθόδων αναφοράς, έχει αντικατασταθεί από την προσέγγιση βάσει κριτηρίων, σύμφωνα με την οποία καθορίζονται κριτήρια επίδοσης και διαδικασίες για την επικύρωση μεθόδων διαλογής και επιβεβαιωτικών μεθόδων. Προκειμένου επίσης να εξασφαλισθεί η εναρμονισμένη εφαρμογή της οδηγίας 96/23/ΕΚ ήταν απαραίτητο να προβλεφθεί μια διαδικασία για το σταδιακό καθορισμό των ελάχιστων απαιτούμενων ορίων επίδοσης (Minimum Required Performance Limits, MRPLs) των αναλυτικών μεθόδων για τις ενώσεις που η χρήση τους απαγορεύεται ρητά στην Ευρωπαϊκή Ένωση. [118,119]

Η οδηγία 96/23/ΕΚ αφορά στη λήψη μέτρων ελέγχου για ορισμένες ενώσεις και τα κατάλοιπά τους σε ζώντα ζώα και σε προϊόντα τους. Η οδηγία ορίστηκε τον Απρίλιο 1996 και καταργεί τις παλαιότερες οδηγίες 85/358/ΕΕΚ και 86/469/ΕΕΚ και αποφάσεις 89/187/ΕΕΚ και 91/664/ΕΕΚ. Τα κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων που θα πρέπει να ελέγχονται σύμφωνα με την παρούσα οδηγία αναφέρονται στο Παράρτημα Ι αυτής και χωρίζονται σε δύο ομάδες Α και Β, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 2.3. [117]

Πίνακας 2.3. Ταξινόμηση των ενώσεων που θα πρέπει να ελέγχονται σε ζώντα ζώα και στα προϊόντα τους, σύμφωνα με το Παράρτημα I της οδηγίας 96/23/EC. [117]

ΟΜΑΔΑ Α: Ενώσεις με αναβολική δράση και μη επιτρεπόμενες ενώσεις	ΟΜΑΔΑ Β: Κτηνιατρικά φάρμακα και επιβλαβείς ενώσεις.
1. Στιλβένια, παράγωγα στιλβενίων, τα άλατα και εστέρες τους. 2. Θυρεοστατικές ενώσεις. 3. Στεροειδή. 4. Λακτόνες του ρεσοκυκλικού οξέος. 5. β-ανταγωνιστές. 6. Ενώσεις του Παραρτήματος IV του κανονισμού 2377/90/EEC.	1. Αντιβακτηριακές ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των σουλφοναμιδίων και των κινολονών. 2. Άλλα κτηνιατρικά φάρμακα: i. Ανθελμινθικά. ii. Κοκκιδιοστατικά, συμπεριλαμβανομένων των νιτροϊμιδαζολίων. iii. Καρβαμιδικές και πυρεθροειδείς ενώσεις. iv. Ηρεμιστικά. v. Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη. vi. Άλλες ενώσεις με φαρμακολογική δράση. 3. Άλλες ενώσεις και επιβλαβείς που υπάρχουν στο περιβάλλον. i. Οργανοχλωριωμένες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένων των PCBs. ii. Οργανοφωσφορικές ενώσεις. iii. Χημικά στοιχεία. iv. Μυκοτοξίνες. v. Χρωστικές. 4. Άλλες, συμπεριλαμβανομένων των μη εγκεκριμένων ενώσεων που χρησιμοποιούνται ενδεχομένως για κτηνιατρικούς σκοπούς.

Επιπλέον με την απόφαση 2002/657/EC καθορίζονται οι κανόνες για τις αναλυτικές μεθόδους που θα χρησιμοποιηθούν κατά τις δοκιμές ανάλυσης των επίσημων δειγμάτων. Επίσης σύμφωνα με το άρθρο 6 της συγκεκριμένης απόφασης

καθορίζεται ο τρόπος ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Έτσι, το αποτέλεσμα μιας ανάλυσης θεωρείται «μη συμμορφούμενο» όταν υπερβαίνει το όριο απόφασης της μεθόδου επιβεβαίωσης για την προσδιοριζόμενη ένωση. Ως όριο απόφασης μιας μεθόδου νοείται το όριο στο οποίο και πάνω από το οποίο μπορεί να αποφασισθεί ότι ένα δείγμα είναι μη συμμορφούμενο με πιθανότητα σφάλματος α . Ως σφάλμα α νοείται η πιθανότητα να είναι «συμμορφούμενο» το εξεταζόμενο δείγμα, ακόμα κι αν η μέτρηση κατέληξε σε μη συμμορφούμενα αποτελέσματα («ψευδής απόφαση περί μη συμμόρφωσης»). Για τις ενώσεις με καθορισμένο επιτρεπόμενο όριο, το όριο απόφασης είναι η συγκέντρωση πέραν της οποίας μπορεί να αποφασιστεί με στατιστική βεβαιότητα $1-\alpha$, εάν έχει υπάρξει αληθώς υπέρβαση του ορίου. Ενώ για τις ενώσεις χωρίς καθορισμένο όριο απόφασης, είναι η μικρότερη συγκέντρωση στην οποία μια μέθοδος μπορεί να διακρίνει με στατιστική βεβαιότητα $1-\alpha$, εάν είναι παρούσα η συγκεκριμένη προσδιοριζόμενη ένωση. Για τις ενώσεις της ομάδας Α του παραρτήματος Ι της οδηγίας 96/23/EC το σφάλμα είναι μικρότερο του 1%, ενώ για όλες τις άλλες ουσίας το σφάλμα α είναι 5% ή μικρότερο. [119]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3ο ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

3.1 ΓΕΝΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

3.1.1 Εισαγωγή

Οι μυκοτοξίνες (mycotoxins) είναι παράγωγα δευτερογενούς μεταβολισμού ορισμένων μυκήτων οι οποίοι μολύνουν μεγάλη κατηγορία τροφίμων και έχουν τοξική επίδραση στα ζώα και στους ανθρώπους. Πιο συγκεκριμένα παράγονται όταν πρόδρομες ενώσεις τους, οι οποίες είναι προϊόντα του πρωτογενούς μεταβολισμού, σχηματίζονται σε μεγάλες ποσότητες μη χρήσιμες για το μύκητα. Παρ' όλα αυτά όμως, δεν υπάρχει κάποιος προφανής λόγος των μυκοτοξινών στην άμεση ανάπτυξη και στο μεταβολισμό των μικροοργανισμών. Δεν αποκλείεται όμως να εντάσσονται στο γενικότερο αμυντικό σύστημα των μυκήτων ως ένα αμυντικό μέσο ενάντια στους ανταγωνιστές μύκητες. [73,120,121]

Μέχρι σήμερα έχουν ταυτοποιηθεί περισσότερες από 300 περίπου μυκοτοξίνες (και κάθε χρόνο αυτός ο αριθμός αυξάνεται), παραγόμενες από περίπου 350 είδη μυκήτων. Έχει αποδειχθεί ότι μία συγκεκριμένη μυκοτοξίνη μπορεί να παράγεται από περισσότερα του ενός είδη μυκήτων, ενώ ένας μύκητας μπορεί να παράγει περισσότερες από μία μυκοτοξίνες. Αυτό όμως που πρέπει να τονιστεί είναι ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των μυκήτων δεν συνθέτει τοξίνες και ότι ποτέ όλα τα είδη του ίδιου γένους δεν είναι μυκοτοξιγόνα αλλά ούτε και τα γένη του ίδιου είδους. Ορισμένα γένη μυκήτων που βιοσυνθέτουν μυκοτοξίνες είναι ο *Aspergillus*, ο *Penicillium*, ο *Fusarium*, ο *Alternaria* και ο *Claviceps* (Σχήμα 3.1 και 3.2). Οι περισσότερες μυκοτοξίνες είναι μικρού μοριακού βάρους και δομικά διαφέρουν μεταξύ τους. [122,123]

Οι μυκοτοξίνες δημιουργούνται κυρίως κατά το τέλος της εκθετικής φάσης της ανάπτυξης των μυκήτων, την οποία ανάπτυξη ευνοούν μία συνισταμένη περιβαλλοντικών παραγόντων. Αυτές εισάγονται στον οργανισμό μέσω της τροφής (στο πεπτικό σύστημα), του δέρματος ή της εισπνοής και προκαλούν τοξινώσεις, η ένταση των οποίων εξαρτάται από την ποσότητα της τοξίνης και από το είδος ή το στέλεχος του μύκητα από τον οποίο παράχθηκε. Μερικές από τις κυριότερες μυκοτοξίνες είναι οι: αφλατοξίνες B₁, B₂, G₁, G₂ και M₁, ωχρατοξίνη A, ζηραλενόνη, φουμονισίνες (B₁, B₂, B₃), τριχοθεκένια (T-2 και HT-2), δεοξυνιβαλενόλη (DON), νιβαλενόλη, πατουλίνες, αματοξίνες, αλκαλοειδή Ergot, citrinin, κυκλοπιαζονικό οξύ, μονιλινοφορμίνη κ.α. Περισσότερες από 14 (κυρίως αφλατοξίνες) έχουν καρκινογόνο

δράση, ενώ άλλες προκαλούν άλλους τύπους βλαβών στα ζώα και στον άνθρωπο. [124,125]



Σχήμα 3.1. Αριστερά, φυστίκια στα οποία έχουν αναπτυχθεί μύκητες του γένους *Aspergillus* και δεξιά, καλαμπόκι στο οποίο έχουν αναπτυχθεί μύκητες του γένους *Fusarium*. [126,127]

Οι ευρέως αναγνωρισμένες βλαπτικές επιδράσεις των μυκοτοξινών στην υγεία των ζώων και του ανθρώπου, καθώς και οι τεράστιες οικονομικές απώλειες που επιφέρουν ετήσια στην παγκόσμια βιομηχανία τροφίμων, έχουν στρέψει την προσοχή του επιστημονικού κόσμου στην εξεύρεση ουσιαστικών τρόπων περιορισμού της επιμόλυνσης της τροφικής αλυσίδας με τις ουσίες αυτές. Κατά γενικό κανόνα τα βρέφη είναι περισσότερο ευαίσθητα στις μυκοτοξίνες από ό,τι ο ανεπτυγμένος ανθρώπινος οργανισμός, επειδή ο αμυντικός μηχανισμός του οργανισμού τους δεν είναι πλήρως εξελιγμένος κι επειδή η τροφή τους έχει ως βάση τα δημητριακά που ρυπαίνονται με μυκοτοξίνες καθ' υπερβολή, σε σύγκριση με άλλα τρόφιμα. [122,128,129]

Μερικές μυκοτοξίνες είναι πολύ τοξικές, τουλάχιστο για τα πειραματόζωα, αφού η θανατηφόρα δόση (LD_{50}) είναι <5 mg κατά Kg βάρους ζώοντος. Έτσι η απαίτηση για ασφαλή τρόφιμα σε συνδυασμό με την τοξικότητα πολλών μυκοτοξινών, έχει οδηγήσει τις σχετικές με την ποιότητα των τροφίμων, εποπτικές αρχές στην Ευρώπη στον καθορισμό ανώτατων επιτρεπτών επιπέδων των μυκοτοξινών στα τρόφιμα. [122]

Οι μυκοτοξίνες, γενικά, στην πλειοψηφία τους καταστρέφονται δύσκολα ή και καθόλου με τις επεξεργασίες στις οποίες υπόκεινται κατά τις βιομηχανικές διαδικασίες παραγωγής ή με το μαγείρεμα. [130,131]

Η παρουσία και η ποσότητα των μυκοτοξινών στα τρόφιμα είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με περιβαλλοντικές παραμέτρους και με τις διαδικασίες παραγωγής των τροφίμων. [132]

3.1.2 Μέτρα περιορισμού των μυκοτοξινών στα τρόφιμα

Η μόλυνση τροφίμων και ζωοτροφών με βιοτοξίνες, όπως μυκοτοξίνες, είναι ένα υψίστης σημασίας ζήτημα που συγκεντρώνει το ενδιαφέρον της διεθνούς επιστημονικής κοινότητας, όσο αφορά τρόπους αντιμετώπισης κι επιτρεπτά όρια της παρουσίας των μυκοτοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές.

Τα επιτρεπτά όρια παρουσίας μυκοτοξινών στα τρόφιμα, προκύπτουν από συνδυασμό πολλών παραγόντων, όπως:

- Διαθεσιμότητα αξιόπιστων αναλυτικών δεδομένων, τα οποία και θα καθορίσουν τα προϊόντα για τα οποία πρέπει να εφαρμοστούν νομοθετικές ρυθμίσεις.
- Η διαθεσιμότητα τοξικολογικών δεδομένων και μεθόδων ανάλυσης απαραίτητων για τη δυνατότητα θέσπισης ορίων επικινδυνότητας.
- Κατανομή των μυκοτοξινών στα προϊόντα η οποία πρέπει να είναι ομοιογενής, διότι διαφορετικά υπάρχει κίνδυνος λανθασμένης εκτίμησης.
- Νομοθεσίες χωρών οι οποίες συνεργάζονται εμπορικά, αφού οι μη αναγκαίες αυστηρές νομοθετικές ρυθμίσεις πιθανόν να προκαλέσουν προβλήματα σε χώρες που κάνουν εξαγωγές όσον αφορά την εύρεση αγοραστών για τα προϊόντα τους. [133]

3.2 ΜΥΚΗΤΕΣ

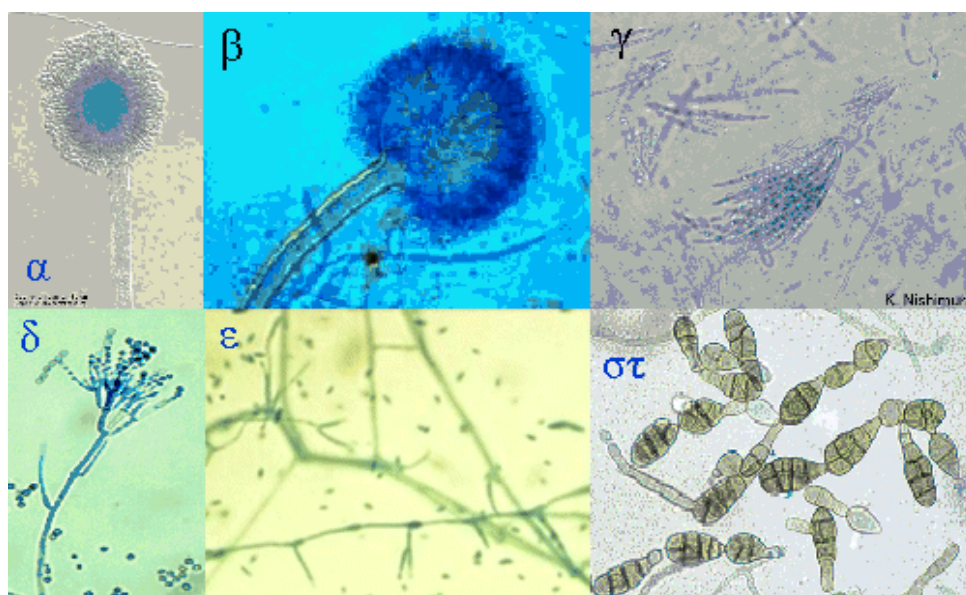
3.2.1 Γενικά στοιχεία

Οι μύκητες παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στον κύκλο ζωής ως αποικοδομητές της οργανικής ύλης. Συγκεκριμένα ως ετερότροφοι οργανισμοί μετατρέπουν την οργανική ύλη (πρωτεΐνες, λίπη, υδατάνθρακες κ.α.) σε ενέργεια και ανόργανες ενώσεις. Η αλλοίωση των τροφίμων λοιπόν, από τους μικροοργανισμούς, είναι απλά η προσπάθεια της μικροχλωρίδας του τροφίμου να διεξάγει τέτοιου είδους αντιδράσεις. Πολλά είδη μυκήτων είναι υπεύθυνα για την παρασκευή πολλών βιομηχανικών προϊόντων όπως είναι το κιτρικό οξύ, οι βιταμίνες, τα αντιβιοτικά και διάφορα ένζυμα, αλλά και τα βελτιωτικά και τα πρόσθετα των τροφίμων. Μάλιστα τα γένη των *Aspergillus* και *Penicillium* είναι μεταξύ των πιο σημαντικών οργανισμών που χρησιμοποιούνται στη βιοτεχνολογία και οι εφαρμογές τους είναι ποικίλες, περιλαμβάνοντας την παραγωγή ενζύμων ή πρωτογενών και δευτερογενών μεταβολιτών καθώς και τροποποίηση τροφίμων. Επίσης στους μύκητες οφείλεται η

ωρίμανση ορισμένων τροφίμων και η βελτίωση οργανοληπτικών χαρακτηριστικών τους όπως π.χ. διάφορα τυριά (τύπου ροκφόρ κ.α.), σάλτσες κ.α. Ωστόσο πολλές φορές οι μύκητες είναι υπεύθυνοι για την υποβάθμιση και σήψη τροφίμων και ζωοτροφών. Επίσης, υπάρχουν πολλές ασθένειες των φυτών που αποδίδονται σε μύκητες, ενώ μόνο ένας μικρός αριθμός αυτών είναι παθογόνοι για ζώα και ανθρώπους. [73,122,134]

3.2.2 Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση των μυκήτων στα τρόφιμα

Η εμφάνιση των μυκήτων (που παράγουν μυκοτοξίνες) στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές εξαρτάται από μία συνισταμένη παραγόντων που ο καθένας τους επιδρά με το δικό του τρόπο στη μυκηλιακή ανάπτυξή τους. Οι παράγοντες αυτοί επιγραμματικά είναι οι εξής: η ενεργότητα νερού (a_w), η θερμοκρασία συγκομιδής, αλλά κυρίως στους χώρους αποθήκευσης, παραγωγής και κατανάλωσης, το pH, η του αέρα σε CO_2 και O_2 , η φύση του τροφίμου (υγρή ή στερεή), τα θρεπτικά τους συστατικά και τέλος η ύπαρξη μικροβιακών ανταγωνιστών, αλλά και συγκεκριμένων ουσιών, όπως π.χ. αλάτι, ζάχαρη, συντηρητικά.



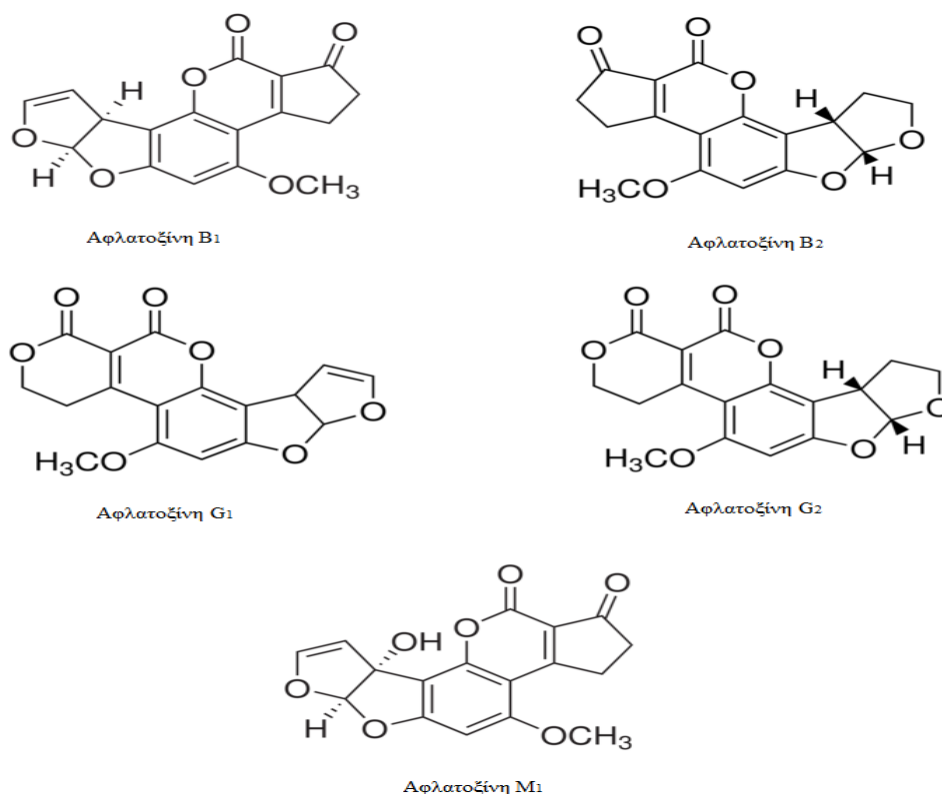
Σχήμα 3.2. Μορφή ορισμένων μυκήτων που παράγουν μυκοτοξίνες: α) *Aspergillus flavus*, β) *Aspergillus ochraceus*, γ) *Fusarium moniliforme*, δ) *Penicillium verrucosum*, ε) *Fusarium proliferatum* και στ) *Alternaria alternata*. [135,136,137,138,139,140]

3.3 ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

3.3.1 Εισαγωγή

Οι αφλατοξίνες είναι μία ευρεία ομάδα ισχυρά τοξικών, καρκινογόνων και μεταλλαξιογόνων ουσιών. Αποτελούν προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ορισμένων στελεχών μυκήτων της ομάδας «*Aspergillus flavus group*», συγκεκριμένα των *A. flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomius*, από όπου πήραν και το όνομά τους (A-flatoxins). Ανακαλύφθηκαν στη Μ. Βρετανία (δεκαετία 1960) στην προσπάθεια των επιστημόνων να εξηγήσουν μία μαζική δηλητηρίαση 10000 πουλερικών. Όπως αποδείχθηκε, τα πουλερικά αυτά είχαν τραφεί με ζωοτροφές επιβαρυνμένες με μεγάλες ποσότητες αφλατοξινών, οι οποίες προκάλεσαν την οξεία δηλητηρίασή τους. [134,141,142,143]

Οι αφλατοξίνες που παρουσιάζουν το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι οι B₁, B₂, G₁ και G₂ (Σχήμα 3.3). Τα ονόματά τους προκύπτουν από το χρώμα που εκπέμπουν όταν φθορίζουν, μπλε (Blue) και πράσινο (Green) αντίστοιχα. Οι τοξίνες αυτές συνήθως βρίσκονται μαζί στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές σε διάφορες αναλογίες. Εν τούτοις η αφλατοξίνη B₁ είναι συνήθως κυρίαρχη (παράγεται σε μεγαλύτερες ποσότητες σε σύγκριση με τις υπόλοιπες) και επιπλέον εμφανίζει τη μεγαλύτερη τοξικότητα, είναι η πιο ισχυρά φυσικώς παραγόμενη καρκινογόνος ουσία στον πλανήτη. Μάλιστα η παρουσία της αφλατοξίνης B₁ στα τρόφιμα, κατά κανόνα προϋποθέτει και την παρουσία των άλλων αφλατοξινών, ενώ το αντίστροφο δεν ισχύει απαραίτητως. Κύριο μεταβολικό προϊόν της αφλατοξίνης B₁ αποτελεί η αφλατοξίνη M, η οποία απαντάται στο γάλα και στα ούρα των βοοειδών, που εκτρέφονται για παραγωγή γάλακτος και άλλων θηλαστικών όταν αυτά έχουν τραφεί με μολυσμένες τροφές. Η ονομασία της προκύπτει από την παρουσία της στο γάλα (M-milk) και τυγχάνει σημαντικού ενδιαφέροντος από πλευράς υγείας των καταναλωτών και ειδικά της ευαίσθητης ομάδας των παιδιών και των βρεφών. [128,134,144]



Σχήμα 3.3. Συντακτικοί τύποι των κυριότερων αφλατοξινών. [89]

Οι κατηγορίες τροφίμων στις οποίες εμφανίζονται οι αφλατοξίνες είναι: ξηροί καρποί, αποξηραμένα φρούτα, μπαχαρικά, όσπρια, ελαιώδεις καρποί, δημητριακά και προϊόντα αυτών, όπως ψωμί, corn flakes, γαλακτοκομικά, ζωοτροφές και επομένως και ζωικά προϊόντα, μέσω της τροφικής αλυσίδας. Οι αφλατοξίνες εμφανίζονται στα διάφορα στάδια της κατεργασίας αυτών των τροφίμων (καλλιέργεια-συγκομιδή-αποθήκευση-κατανάλωση).

Η παρουσία αφλατοξινών στα τρόφιμα λαμβάνει χώρα, είτε άμεσα κατά την προσβολή μυκήτων, είτε έμμεσα με τη μεταφορά των αφλατοξινών στα ζωικά προϊόντα. Η μόλυνση ενός τροφίμου από αφλατοξίνες, είναι αθροιστική διαδικασία. Μπορεί να ξεκινήσει στο φυτό πριν τη συγκομιδή και να συσσωρευτεί και άλλη ποσότητα αργότερα κατά τη συγκομιδή, την ξήρανση, την αποθήκευση ή την επεξεργασία μέχρι την τελική κατανάλωσή του. Συνήθεις τεχνικές επεξεργασίας δεν φέρουν κανένα αποτέλεσμα έναντι της αποικοδόμησης και απαλλαγής από την τοξίνη στα τρόφιμα. [128,145]

Η σύνθεση των αφλατοξινών εξαρτάται από το είδος του στελέχους του μύκητα, τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται οι αποικίες και τους

θρεπτικούς παράγοντες. Υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ουσιών που παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των αφλατοξινών κυρίως μέσω της επίδρασής τους στη μυκηλιακή ανάπτυξη. [128,146]

Γενικά, η πορεία βιοσύνθεσης των αφλατοξινών είναι μία περίπλοκη διαδικασία του δευτερογενούς μεταβολισμού. Η κατανόηση της βιοσύνθεσης των αφλατοξινών είναι σημαντική για τη λήψη περιοριστικών μέτρων στο πρόβλημα της επιμόλυνσης των τροφίμων με αφλατοξίνες. [128]

3.3.2 Βιοσύνθεση αφλατοξινών

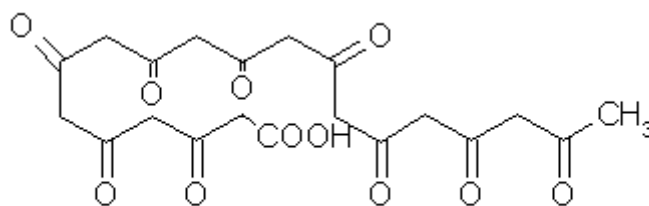
Ως πρωτογενής μεταβολισμός ορίζεται το σύνολο των αναβολικών (σύνθεση βιομάζας) και καταβολικών (αποικοδόμηση βιομάζας για παραγωγή ενέργειας) διεργασιών που λαμβάνουν χώρα σε κάθε οργανισμό, συνεπώς και στους μύκητες.

Ο δευτερογενής μεταβολισμός διαφοροποιείται από τον πρωτογενή στα εξής σημεία:

- Πραγματοποιείται με έντονους ρυθμούς κατά κανόνα μετά την ολοκλήρωση του μεγαλύτερου μέρους της κυτταρικής ανάπτυξης και συνδέεται με μορφολογικές αλλαγές, όπως η σποριογονία.
- Περιορίζεται σε μικρό αριθμό ειδών ή ορισμένα στελέχη κάποιων ειδών μυκήτων.
- Τα προϊόντα του δευτερογενούς μεταβολισμού δεν εξυπηρετούν βασικές λειτουργίες του κυττάρου, αλλά είναι δραστικά έναντι των μικροοργανισμών, φυτών και ζώων, ω αντιβιοτικά, φυτοτοξίνες και μυκοτοξίνες αντίστοιχα.
- Δεν απαιτεί ένζυμα υψηλής εξειδίκευσης σε αντίθεση με τον πρωτογενή.

Ο δευτερογενής μεταβολισμός είναι μία προσπάθεια των μικροοργανισμών να ανταποκριθούν και να επιβιώσουν κάτω από συνθήκες stress, όπως π.χ. σε συνθήκες έλλειψης θρεπτικών συστατικών. Χαρακτηριστικό είναι ότι όταν κάποιο θρεπτικό υλικό εξαντληθεί και περιορίζεται η ανάπτυξη του μύκητα, τότε η βιοσύνθεση της ΑΦΒ₁ εξελίσσεται με ραγδαίους ρυθμούς. [147,148]

Η βιοσύνθεση των αφλατοξινών γίνεται μέσω πρόδρομων ενώσεων πολυκετιδίων (δευτερογενείς μεταβολίτες που παράγονται σε σημαντικά ποσά από ορισμένους μύκητες) (Σχήμα 3.4) με 20 άτομα άνθρακα, από όπου μία ομάδα δύο ατόμων άνθρακα απομακρύνεται κατά το σχηματισμό ενός διφουρανικού δακτυλίου. [73,128,149]



Σχήμα 3.4. Δομή ενός πολυκετιδίου (δεκακετίδιο). [149]

Είναι δυνατό να λεχθεί ότι ένα περίπλοκο ρυθμιστικό δίκτυο ελέγχει τη βιοσύνθεση της αφλατοξίνης B₁. Οι παράγοντες οι οποίοι εμπλέκονται ως ρυθμιστές είναι πολλοί και διάφοροι. Γίνεται προσπάθεια να κατανοηθεί σε βάθος η βιοσυνθετική πορεία της ΑΦΒ₁, αλλά και να διευκρινιστούν οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ρυθμιστικών παραγόντων. Έτσι σαν πρώτο βήμα σε αυτή την ερευνητική προσπάθεια ετέθη η αναγνώριση νέων γονιδίων τα οποία συμμετέχουν στην πορεία της βιοσύνθεσης της ΑΦΒ₁. Ένας αποτελεσματικός τρόπος ανίχνευσης και αναγνώρισης τέτοιων γονιδίων είναι η κατανομή του DNA των διαφορετικά εκφραζόμενων γονιδίων του μύκητα κατά τη διάρκεια της παραγωγής της ΑΦΒ₁. [128,150]

Μελέτες βιοσύνθεσης σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες έχουν δείξει ότι το όξινο pH ευνοεί την παραγωγή αφλατοξινών, ενώ το ουδέτερο ή ελαφρώς αλκαλικό ευνοεί τη σύνθεση λιπιδίων. Το δεδομένο αυτό καθώς και άλλα παρόμοια οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι υφίσταται μία αντίστροφη σχέση μεταξύ λιπιδίων και αφλατοξινών. Η ίδια αντίστροφη σχέση παρατηρήθηκε και για τα φωσφολιπίδια, τους εστέρες και τους κηρούς. [151]

Η παραγωγή αφλατοξινών, έχει αποδειχθεί, πως *in vitro* διεγείρεται κατά την προσθήκη σε καλλιέργειες των *A. parasiticus* και *A. flavus*:

- Ενώσεων που φέρουν δακτύλιο εποξειδίου. [152]
- Αλογονομεθανίων που μπορεί να σχηματίζουν ρίζες. [151]
- Συνθετικών λιποϋπεροξειδίων ή φυσικά παραγόμενων στα φυτά με δράση λιποξυγενασών ή με τη βοήθεια των περιβαλλοντικών συνθηκών. [153,154]
- Ενώσεων που οξειδώνουν την εργοστερόλη των μυκηλιακών κυττάρων. [155]

3.3.3 Τοξική δράση των αφλατοξινών

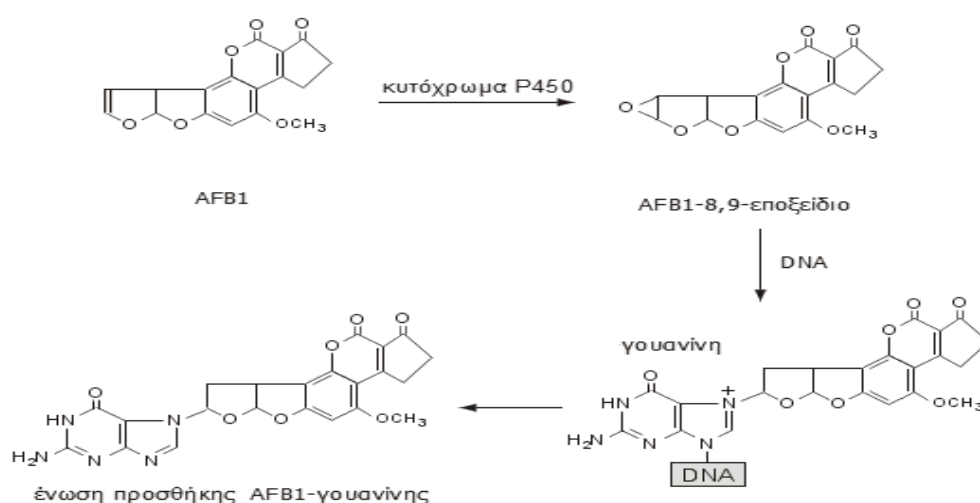
Η τοξικότητα των αφλατοξινών διακρίνεται σε οξεία και χρόνια. Η οξεία χαρακτηρίζεται κυρίως από αιμορραγίες και οφείλεται κατά κύριο λόγο στον κουμαρινικό πυρήνα.

Η χρόνια τοξικότητα χαρακτηρίζεται από καρκίνο και κίρρωση του ήπατος και τερατογενέσεις αυξάνοντας τη συχνότητα των χρωμοσωμικών διαταραχών στο μυελό των οστών και υποβοηθώντας γονιδιακές μεταλλάξεις. Αυτή η τοξικότητα οφείλεται στην παρουσία ενός διπλού δεσμού στον ακραίο φουρανικό δακτύλιο. Ο διπλός αυτός δεσμός διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό των αφλατοξινών στον ανθρώπινο οργανισμό. Συγκεκριμένα οι αφλατοξίνες, μετά την είσοδό τους στον οργανισμό, κατευθύνονται στο συκώτι κι ενεργοποιούνται από το κυτόχρωμα P-450NF, σχηματίζοντας ένα 8-9 εποξείδιο με μικρή διάρκεια ζωής. [73,75,128,134,152]

Το ενδιάμεσο αυτό ακολουθεί μία από τις παρακάτω πορείες:

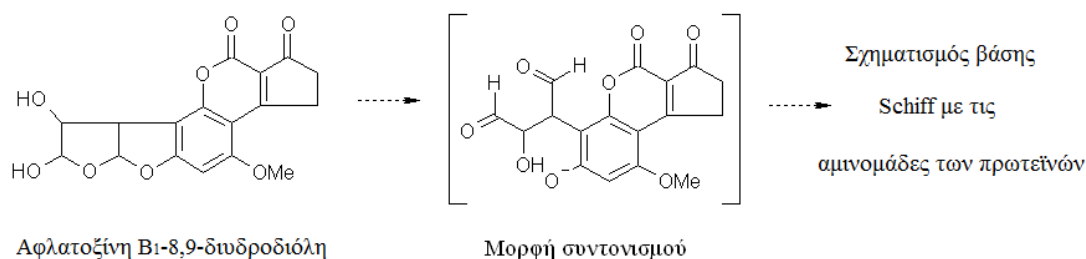
1. Μετατρέπεται σε υδροξυλιωμένα παράγωγα τα οποία αποβάλλονται.
2. Προσδένονται ομοιοπολικά σε DNA ή RNA.
3. Σχηματίζει ομοιοπολικούς δεσμούς με πρωτεΐνες.

Στη δεύτερη περίπτωση το παράγωγο DNA-εποξείδιο σχηματίζεται μέσω πυρηνόφιλης προσβολής κυρίως από το N-7 της βάσης της γουανίνης (Σχήμα 3.5). Έτσι η αφλατοξίνη εισχωρεί στη διπλή έλικα του DNA με αποτέλεσμα την καρκινογένεση και την τερατογένεση. [75,128,134,156]



Σχήμα 3.5. Μηχανισμός εισαγωγής αφλατοξινών στο DNA. [134]

Στην τρίτη περίπτωση το εποξείδιο της αφλατοξίνης μετά από υδρόλυση μετατρέπεται σε ΑΦΒ₁-8,9-διϋδροδιόλη, η οποία σταθεροποιείται με συντονισμό (Σχήμα 3.6). Οι αλδεϋδικές ομάδες μπορούν μετά να σχηματίσουν μία βάση Schiff με τις αμινομάδες των πρωτεϊνών. [128,157]



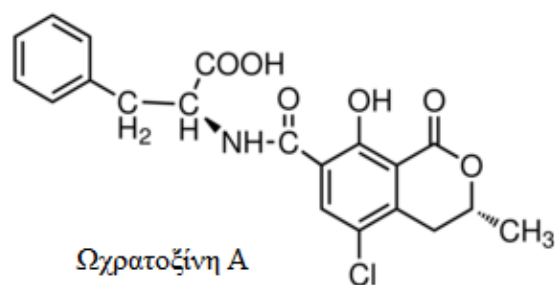
Σχήμα 3.6. Σχηματισμός βάσης Schiff μεταξύ των αμινομάδων των πρωτεϊνών και της ΑΦΒ₁-8,9-διϋδροδιόλης. [128]

Σημειώνεται (ειδικά για τις αφλατοξίνες) ότι η δραστηρότητά τους είναι σημαντικά υψηλότερη σε άτομα που βρίσκονται σε κατάσταση ανοσοκαταστολής σε σχέση με υγιή άτομα. Έτσι η μείωση των προσλαμβανόμενων, μέσω της διατροφής, αφλατοξινών σε ευπαθείς ομάδες είναι πολύ σημαντική. [128]

3.4 ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΕΣ

3.4.1 Εισαγωγή – Φυσικοχημικά χαρακτηριστικά ωχρατοξίνης Α

Η ωχρατοξίνη Α (OTA) (Σχήμα 3.7), είναι μυκοτοξίνη που παράγεται κυρίως από τους μύκητες *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium verrucosum* (αλλά και σε μικρότερες ποσότητες από τους *Aspergillus carbonarius* και *Penicillium nordicum*) σε τροπικά και ψυχρά κλίματα αντίστοιχα ως δευτερογενής μεταβολίτης. Η ωχρατοξίνη Α είναι φυσικώς παραγόμενη μυκοτοξίνη. Είναι διαδεδομένη στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές. Δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία για τοξινώσεις των εργαζομένων από έκθεση σε αυτήν. Εν δυνάμει έκθεση εργαζομένων στην OTA μπορεί να υπάρχει για το προσωπικό που χειρίζεται και αποθηκεύει σπόρους, καλαμπόκι, δημητριακά και προϊόντα αυτών, καφές και ζωοτροφές στα οποία έχουν αναπτυχθεί τοξινογόνοι μύκητες. Ακόμη ωχρατοξίνη Α έχει βρεθεί στην μπύρα, στον καφέ, στο ελαιόλαδο, στις ελιές. Η OTA είναι μία πολύ επικίνδυνη, τοξική χημική ουσία. [73,134]



Σχήμα 3.7. Συντακτικός τύπος της Ωχρατοξίνης Α. [89]

3.4.2 Βιοσύνθεση της ωχρατοξίνης Α

Η ΟΤΑ είναι ένα φαινυλαλανινικό παράγωγο ενός υποκατεστημένου διϋδρο-ισοκουμαρινικού δακτυλίου. Η βιοσύνθεσή της ξεκινάει από ένα οξικό παράγωγο ισοκουμαρινικού πεντακετιδίου του οποίου η δομή μοιάζει με τη δομή μιας άλλης νεφροτοξίνης, της κιτρινίνης. Σε πρώτο στάδιο γίνεται η υποκατάσταση ενός μεθυλίου στο δακτύλιο και στη συνέχεια ακολουθεί αμιδικός δεσμός μεταξύ του καρβοξυλίου του ισοκουμαρινικού πεντακετιδίου και της αμινομάδας της φαινυλαλανίνης. Μέχρι τα στάδια αυτά έχει σχηματιστεί η ωχρατοξίνη Β. Τέλος πραγματοποιείται άλλη μία υποκατάσταση, ενός ατόμου χλωρίου, με αποτέλεσμα η ωχρατοξίνη Β να μετατρέπεται σε ωχρατοξίνη Α. Η δομή της ΟΤΑ εκφράζει την τοξική της δράση παρεμποδίζοντας την πρωτεϊνοσύνθεση και συγκεκριμένα τη δράση του ενζύμου φαινυλαλανίνο-t-RNA-συνθετάση. [73,158]

3.4.3 Άλλες ωχρατοξίνες

Οι μεταβολίτες των μικροοργανισμών *Aspergillus ochraceus* και *Penicillium verrucosum* είναι στην πραγματικότητα μία οικογένεια ουσιών της οποίας το σημαντικότερο μέλος είναι η ΟΤΑ. Εκτός από την προαναφερθείσα υπάρχουν και άλλες ωχρατοξίνες οι οποίες δεν παράγονται σε αξιοσημείωτες ποσότητες. Αυτές είναι: η ωχρατοξίνη Β (ΟΤΒ) (η δομή της ΟΤΒ είναι σχεδόν ίδια με αυτήν της ΟΤΑ με τη διαφορά ότι η ΟΤΒ δεν περιλαμβάνει χλώριο στον ισοκουμαρινικό δακτύλιο), η ωχρατοξίνη α (ochratoxin alpha- ΟΤα), η ωχρατοξίνη β (ochratoxin beta- ΟΤβ).

Επίσης από το μύκητα *Aspergillus* μπορούν να παραχθούν η ωχρατοξίνη C (αιθυλεστέρας της ΟΤΑ) και η 4-υδροξυ ΟΤΑ. Συνήθως όμως η ΟΤΑ και περιστασιακά η ΟΤΒ είναι τα μέλη που απαντώνται σε αναπτυγμένες αποικίες μυκήτων. [159]

3.4.4 Τοξική δράση της ωχρατοξίνης Α

Η ωχρατοξίνη Α, όπως και οι περισσότερες μυκοτοξίνες, διακρίνεται για την πολύ μεγάλη και ποικίλη τοξικολογική της δράση τόσο στα ζώα όσο κυρίως και στους ανθρώπους. Επίσης είναι νεφροτοξίνη με ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τις βιομηχανίες κρέατος πουλερικών και χοιρινών, που φθάνει στον άνθρωπο μέσω των προϊόντων κρέατος. Η ΟΤΑ είναι μία άκρως τοξική ουσία η οποία μπορεί να έχει τόσο οξεία όσο και χρόνια δράση κυρίως στον άνθρωπο, προκαλώντας κατά κύριο λόγο σημαντικές βλάβες στα νεφρά.

Η δράση της ωχρατοξίνης Α είναι πολύπλοκη, αφού μπορεί να επιδρά με μεγάλη ποικιλομορφία στον ανθρώπινο οργανισμό. Πιο συγκεκριμένα, η ΟΤΑ είναι νεφροτοξική, γονιδιοτοξική και πιθανώς να έχει και καρκινογόνο δράση. [73,122]

Ορισμένα συμπτώματα στον ανθρώπινο οργανισμό που σχετίζονται με τη δράση της ΟΤΑ είναι η ανοσοκαταστολή, η απόπτωση (θάνατος κυττάρων), ενδημική νεφροπάθεια, εντερίτιδες, ηπατοτοξικότητα, καρκινογένεση, κρεατιναιμία, όγκοι των ουροθηλίων, τερατογενέσεις και μεταλλάξεις. [121]

3.4.4.1 Νεφροτοξικότητα

Σε αρκετές χώρες, όπως η Δανία, η Τσεχία, η Σλοβακία κ.α., έχουν αναφερθεί περιπτώσεις χοίρων που είχαν τα συμπτώματα νεφροπάθειας που προκλήθηκε από την φυσική έκθεση των ζώων σε ΟΤΑ μέσω των ζωοτροφών. Η ασθένεια αυτή των χοίρων αποδίδεται ως χοίρειος μυκοτοξινική νεφροπάθεια (mycotoxin porcine nephropathy, MPN). Περιπτώσεις ενδημικής νεφροπάθειας έχουν αναφερθεί και σε ανθρώπους εκτός των παραπάνω περιπτώσεων για τα ζώα. Τέτοιας μορφής νεφροπάθειες πλήττουν αποκλειστικά αγροτικούς πληθυσμούς ενηλίκων. Γενικά η ασθένεια εκδηλώνεται με τη μειωμένη ικανότητα των νεφρών να κατακρατήσουν την ουρία. [73,160,161]

3.4.4.2 Καρκινογένεση

Η ωχρατοξίνη Α, ενοχοποιείται εκτός των άλλων και για την εμφάνιση όγκων κυρίως στα νεφρά. Έχουν προταθεί τρεις πιθανοί μηχανισμοί δράσης της ΟΤΑ:

- I. Αναστολή της αναπνοής των μιτοχονδρίων, φαινόμενο που συνδέεται με τη μειωμένη απόδοση της παραγωγής του ATP.
- II. Αναστολή του ενζύμου συνθετάση του t-RNA που συνοδεύεται από μειωμένη πρωτεϊνοσύνθεση.

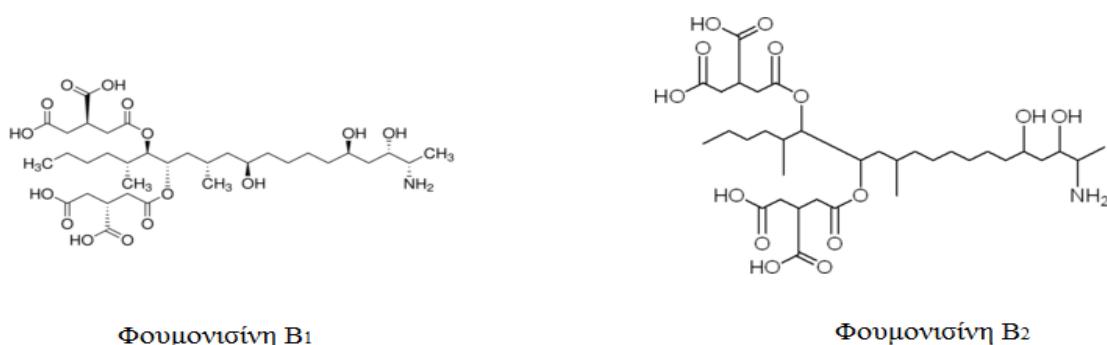
III. Ενισχυμένη υπεροξειδωση των λιπιδίων και δημιουργία ελευθέρων ριζών.
[162,163]

3.5 ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ

3.5.1 Εισαγωγή – Φυτικοχημικά χαρακτηριστικά φουμονισινών

Οι φουμονισίνες είναι μια ομάδα μυκοτοξινών που ανακαλύφθηκε σχετικά πρόσφατα. Η πρώτη αναφορά έγινε το 1988 στην Νότια Αφρική, ενώ διερευνούταν η σχέση μεταξύ του καρκίνου του οισοφάγου στον άνθρωπο και της κατανάλωσης καλαμποκιών μολυσμένων από τον *Fusarium moniliforme*. Αυτές οι μυκοτοξίνες (φουμονισίνες), με κύριο εκπρόσωπό τους τη φουμονισίνη B₁, παράγονται κυρίως από τα παθογόνα στελέχη των *Fusarium moniliforme* (συνώνυμο *F. verticillioides*) και *F. proliferatum* (δευτερογενή προϊόντα μεταβολισμού) αλλά και γενικότερα από διάφορους μύκητες του γένους *Fusarium*. Ακόμη οι φουμονισίνες παράγονται και από τον μύκητα *Alternaria alternata* σε πολύ μικρές ποσότητες, στη ντομάτα, στο σπαράγγι και στο σκόρδο. [121,142]

Οι ευρύτερα διαδεδομένες φουμονισίνες είναι οι B₁, B₂, B₃ (Σχήμα 3.8). Οι φουμονισίνες είναι θερμικά σταθερές και πολικές ενώσεις (διαλυτές στο νερό και τα διαλύματα ύδατος της μεθανόλης και του ακετονιτριλίου, αλλά δεν είναι διαλυτές στους μη πολικούς διαλύτες). Από πλευράς χημικής δομής είναι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες με μία τελική αμινομάδα και δύο πλευρικές αλυσίδες τρικαρβοξυλικών οξέων (διεστέρες του προπάν-1,2,3-τρίκαρβοξυλικού οξέος). Δεν περιέχουν αρωματικό δακτύλιο ή χρωμοφόρες περιοχές, ώστε να είναι εύκολη η ανίχνευσή τους. [142,164]



Σχήμα 3.8. Συντακτικοί τύποι των Φουμονισινών B₁ και B₂. [89]

Οι φουμονισίνες παρουσιάζονται ιδιαίτερα σταθερές σε ένα πλήθος χημικών διαδικασιών και αλλαγών στη θερμοκρασία. Είναι φυσικοί μολυσματικοί παράγοντες

των σιταριών και των δημητριακών παγκοσμίως και βρίσκονται συνήθως στο καλαμπόκι και τα προϊόντα που παράγονται από αυτό καθώς και στις ζωοτροφές. [165]

Έχει διαπιστωθεί ότι οι φουμονισίνες προκαλούν όγκους στα νεφρά και στο ήπαρ σε πειραματόζωα (ποντίκια). Επίσης προκαλούν σοβαρές διαταραχές στα ζώα [166] όπως π.χ. μείωση του ρυθμού ανάπτυξης και παράλυση στα πουλερικά, ενώ μελέτες απέδειξαν πως ευθύνονται για ασθένειες όπως το πνευμονικό οίδημα [167] και υδροθώρακα στους χοίρους [129] καθώς και λευκοεγκεφαλομαλάκυνση (ELEM) στα ιπποειδή και στα κουνέλια. [168,169] Επίσης προκαλούν καρκίνο του ήπατος και του οισοφάγου στα ζώα [170,171] και στον άνθρωπο. [172]

Ειδικότερα η φουμονισίνη B₁ προσελκύει την περισσότερη προσοχή δεδομένου ότι απαντώνται σε ποσοστό μεγαλύτερο του 70% της συνολικής περιεκτικότητας σε φουμονισίνες στα μολυσμένα δείγματα καλαμποκιού και εκθέτει τον άνθρωπο σε υψηλό κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου. Ακόμη η φουμονισίνη B₁ μεταβολίζεται κατά τη διάρκεια επεξεργασίας των τροφίμων. Το φαινόμενο αυτό στηρίζεται κυρίως στη μερική ή πλήρη υδρόλυση της μίας ή και των δύο εστέρομάδων. Εκτός αυτού, η μερική υδρόλυση έχει παρατηρηθεί και παρουσία υγρασίας κάτω από τις υψηλές θερμοκρασίες. [173,174]

3.5.2 Μέθοδοι που επιδρούν στην μείωση-αποικοδόμηση των φουμονισινών

Ένας αριθμός στρατηγικών για τη μείωση των συγκεντρώσεων των φουμονισινών στα τρόφιμα είναι σήμερα σε εξέλιξη. Κάποιες προσεγγίσεις κατευθύνονται προς την αντοχή στη μόλυνση ή στη μείωση των φουμονισινών, ενώ άλλες στοχεύουν στην «αποτοξίνωση» των επιμολυσμένων τροφίμων (αποικοδόμηση των φουμονισινών). [142]

3.5.2.1 Βιολογικές μέθοδοι

Μία βιολογική μέθοδος καταπολέμησης των φουμονισινών που πολύ πιθανώς στο μέλλον να υπάρξει είναι η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτών που θα είναι ανθεκτικά στους μύκητες του γένους *Fusarium*. Επίσης γενετικά τροποποιημένα φυτά θα μπορούσαν να παράξουν αντιμυκωτικές πρωτεΐνες, ώστε να υπάρξει προστασία από τις φουμονισίνες και γενικά από τις μυκοτοξίνες. Μία ποικιλία πρωτεϊνών που ταυτοποιήθηκαν από μικροοργανισμούς ή φυτά φάνηκε να έχουν αντιμυκωτικές ιδιότητες. Μία άλλη πιθανή προσέγγιση θα ήταν να ταυτοποιηθούν

φυσικώς υπάρχοντα συστατικά στο καλαμπόκι, στο σοργό και στο αναποφλοϊώτο ρύζι, τα οποία αναστέλλουν τη σύνθεση της φουμονισίνης.

Δύο είδη σαπροφυτικών μυκήτων που απομονώθηκαν από μουχλιασμένα καλαμπόκια αποδείχθηκε ότι ήταν ικανά να χρησιμοποιήσουν σαν αποκλειστική πηγή άνθρακα τη φουμονισίνη B₁. Ακόμη αυτοί οι μύκητες φάνηκε ότι έχουν ένζυμα που υδρολύουν και μεταβολίζουν τις φουμονισίνες (Duvick *et al.*, 1994). Το γενικό συμπέρασμα διαφόρων ερευνών σχετικά με τη μείωση των φουμονισινών είναι ότι η ελάττωση ανιχνεύσιμων τοξινών δεν έχει πάντα σαν αποτέλεσμα τη μείωση της τοξικότητας. [142]

3.5.2.2 Φυσικές μέθοδοι

Τα μόρια των φουμονισινών μπορούν να μεταβληθούν με διαφόρους τρόπους σε μόρια μη τοξικά. Οι επιδράσεις της θερμότητας στην τοξικότητα των φουμονισινών δεν είναι ακόμη πλήρως ξεκάθαρες. Ορισμένες έρευνες υποδεικνύουν σημαντικές μειώσεις της συγκέντρωσης των φουμονισινών ως αποτέλεσμα της θέρμανσης υδατικών διαλυμάτων φουμονισίνης στους 150°C και παραπάνω (Jackson, 1996). Τα ίδια αποτελέσματα προκύπτουν με επεξεργασία καλαμποκιών μέσω βρασίματος. Όμως προφανώς η θέρμανση προκαλεί υδρόλυση των πρωτοταγών αμινών των φουμονισινών, αφήνοντας το υπόλοιπο μόριο ανέπαφο. Η τοξικότητα των προϊόντων της υδρόλυσης έχει προσδιοριστεί με ορισμένα πειράματα. Άλλες πάλι μελέτες έδειξαν ότι η συγκέντρωση των φουμονισινών δε μειώθηκε με θέρμανση (Sydenham *et al.*, 1995). Παρ' όλα αυτά υπάρχουν αντικρουόμενες αναφορές για την τοξικότητα των προϊόντων υδρόλυσης (Murphy *et al.*, 1996). Έχει επίσης βρεθεί ότι οι υδρολυμένες φουμονισίνες έχουν παρόμοια τοξικότητα με τη μη τροποποιημένη φουμονισίνη B₁ (Murphy *et al.*, 1996). [142]

3.5.2.3 Χημικές μέθοδοι

Οι χημικές μέθοδοι για την «αποτοξίνωση» των φουμονισινών έχουν περιορισμένη επιτυχία. Διάφορα εμπορικά διαθέσιμα ένζυμα έχουν δοκιμαστεί για την ικανότητά τους να «αποτοξινώνουν» τις φουμονισίνες (Wang *et al.*, 1991). Κανένα από αυτά τα προϊόντα δεν μείωσε σημαντικά τη φουμονισίνη B₁.

Έρευνες έχουν δείξει ότι η επεξεργασία των τροφίμων με υδροξείδιο του ασβεστίου (Ca(OH)₂) μπορεί να μειώσει τα επίπεδα της φουμονισίνης B₁ (Murphy *et*

al., 1996, Park *et al.*, 1992, Sydenham *et al.*, 1995). Επίσης η επεξεργασία τροφίμων επιμολυσμένων με φουμονισίνη B₁ με υδατικό διάλυμα φρουκτόζης είχε ως αποτέλεσμα σημαντική μείωση των επιπέδων της φουμονισίνης B₁. Πιο συγκεκριμένα έρευνα σε πειραματόζωα (αρουραίοι) η διατροφή των οποίων αποτελείτο από τρόφιμα που είχαν υποστεί την παραπάνω επεξεργασία, είχε ως αποτέλεσμα τη μη εμφάνιση καρκίνου. Μία άλλη μέθοδος που μελετήθηκε ήταν η επεξεργασία καλαμποκιού με ένα συνδυασμό από H₂O₂ και NaHCO₃. Έχει αναφερθεί ότι αυτή η επεξεργασία μείωσε τις συγκεντρώσεις των φουμονισινών στο 100% στο επιμολυσμένο καλαμπόκι (Park *et al.*, 1992). [142]

3.5.3 Τοξική δράση των φουμονισινών

Οι φουμονισίνες προκαλούν αναστολή της βιοσύνθεσης των σφινγολιπιδίων που αποτελούν συστατικό των κυτταρικών και άλλων μεμβρανών. Συγκεκριμένα, αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου N-ακετυλοτρανσφεράση (ένζυμο απαραίτητο για την παραγωγή σφινγολιπιδίων), επομένως και την ενζυμική αντίδραση μετατροπής της σφινγανίνης σε σφινγოსίνη, με αποτέλεσμα την αύξηση του λόγου των συγκεντρώσεων σφινγανίνης/σφινγოსίνη επιδρώντας με αυτό τον τρόπο στη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων. Επίσης οι φουμονισίνες έχουν κυτταροτοξική, ανοσοκατασταλτική και ηπατοτοξική δράση. Επιπλέον ως μηχανισμοί τοξικής δράσης των φουμονισινών, έχουν αναφερθεί η πρόκληση διαταραχών στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων και των γλυκεροσφολιπιδίων καθώς και στη μετάφραση του γενετικού υλικού σε κύτταρα διαφόρων ιστών. [142,165,175,176,177]

Τρόφιμα που περιέχουν αραβόσιτο, είναι τα πιο πιθανά να περιέχουν τοξίνες αυτής της οικογένειας και έτσι σε αυτά στρέφουν τη προσοχή τους οι βιομηχανίες τροφίμων. Υψηλά ποσοστά περιεκτικότητας σε φουμονισίνες έχουν καταγραφεί σε μικρής έκτασης (οικιακές) καλλιέργειες καλαμποκιού τόσο στη Κίνα όσο και στη Νότια Αφρική. Για τους λόγους αυτούς κρίθηκε αναγκαίο το FDA και η Ε.Ε. να θεσπίσουν ανώτατα όρια του συνολικού περιεχομένου fumonisin στο καλαμπόκι (2-4 ppm, από τον FDA) και σε τροφές (5-100 ppm από τον FDA) που βασίζονται σε αυτό. Επίσης η Ευρωπαϊκή Επιτροπή πρότεινε μια μέγιστη ανεκτή ημερήσια δόση (PMTDI) για κάθε μία από τις τρεις φουμονισίνες (B₁, B₂, B₃) στον οργανισμό τα 2 g/kg σωματικού βάρους. [178,179]

3.6 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΤΗΣ Ε.Ε. ΚΑΙ ΑΝΩΤΑΤΑ ΕΠΙΤΡΕΠΤΑ ΟΡΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Οι σύγχρονες επιστημονικές και τεχνολογικές γνώσεις καθώς και η βελτίωση των τεχνικών παραγωγής και αποθήκευσης δεν εξασφαλίζουν την παρεμπόδιση της ανάπτυξης τοξινογόνων μυκήτων κι επομένως και την εμφάνιση μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Για το λόγο αυτό θεωρείται απαραίτητο να οριστούν όσο το δυνατό χαμηλότερα όρια για τις ουσίες αυτές.

Για τις αφλατοξίνες ορίζονται δύο όρια, το συνολικό για όλες τις αφλατοξίνες και το όριο που αφορά μόνο την αφλατοξίνη B₁. Τα όρια και στις δύο περιπτώσεις είναι λίγο μεγαλύτερα για τα τρόφιμα, που πρόκειται να υποστούν κάποια φυσική επεξεργασία κατά την οποία υπάρχει πιθανότητα να μειωθεί η ποσότητα των αφλατοξινών, σε σχέση με αυτά που πρόκειται να διατεθούν για άμεση κατανάλωση ή πρόκειται να αποτελέσουν συστατικά κάποιου άλλου τροφίμου. [179]

Όπως για τις αφλατοξίνες, έτσι και για την ωχρατοξίνη A, τα όρια ασφάλειας στις παιδικές και βρεφικές τροφές είναι χαμηλότερα, για ευνόητους λόγους, από τα αντίστοιχα όρια για τα τρόφιμα γενικής κατανάλωσης. Βεβαίως δεν παραβλέπεται η σημασία των ορίων της ΟΤΑ στις ζωοτροφές, αφού η μεταφορά της τοξίνης μέσω της διατροφικής αλυσίδας είναι πολύ σημαντική.

Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή θέσπισε τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 401/2006 (23 Φεβρουαρίου 2006) για τον καθορισμό μεθόδων δειγματοληψίας και ανάλυσης (όπου συμπεριλαμβάνονται και τα κριτήρια επίδοσης) για τον επίσημο έλεγχο των επιπέδων μυκοτοξινών στα τρόφιμα. Ακολούθησε και τροποποίηση του, ο κανονισμός 178/2010 (2 Μαρτίου 2010) (όσον αφορά τις αραχίδες (φιστίκια), άλλους ελαιούχους σπόρους, τους καρπούς με κέλυφος, τους πυρήνες βερίκοκων, τη γλυκόριζα και το φυτικό έλαιο). Έτσι αναγνώρισε ότι η δειγματοληψία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην ακρίβεια με την οποία καθορίζονται τα επίπεδα των μυκοτοξινών, τα οποία κατανέμονται κατά τρόπο ανομοιόμορφο σε μία παρτίδα. Συνεπώς, ήταν αναγκαίο να καθοριστούν γενικά κριτήρια με τα οποία πρέπει να συμμορφώνεται η μέθοδος δειγματοληψίας. Επίσης ήταν αναγκαίο να καθοριστούν τα γενικά κριτήρια, με τα οποία έπρεπε να συμμορφώνονται οι μέθοδοι ανάλυσης, ώστε να εξασφαλιστεί ότι τα εργαστήρια τα οποία είναι επιφορτισμένα με τη διεξαγωγή των ελέγχων χρησιμοποιούν μεθόδους ανάλυσης με συγκρίσιμο επίπεδο απόδοσης. [180,181]

Τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τις μυκοτοξίνες που επιμολύνουν τα τρόφιμα καθορίζονται από τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1881/2006 (19 Δεκεμβρίου 2006) και από τις τροποποιήσεις του: κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 1126/2007 (28 Σεπτεμβρίου 2007) (για τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων για ορισμένες ουσίες που επιμολύνουν τα τρόφιμα όσον αφορά τις τοξίνες από μύκητες του γένους *Fusarium* στον αραβόσιτο και στα προϊόντα αραβοσίτου) και κανονισμός (ΕΕ) αριθ. 105/2010 (5 Φεβρουαρίου 2010) (για τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων ωχρατοξίνης Α σε κάποια επιπλέον τρόφιμα). Τέλος σχετικά με την παρουσία ωχρατοξίνης Α, φουμονισινών, δεσοξυνιβαλενόλης, ζεαραλενόνης, Τ-2 και HT-2 σε προϊόντα που προορίζονται για ζωοτροφές, με σύσταση της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2006/576/ΕΚ, 17 Αυγούστου 2006) καθορίστηκαν κάποιες καθοδηγητικές τιμές. [179,182,183,184]

[Στο Παράρτημα 3 παρατίθενται τα μέγιστα επιτρεπτά όρια μυκοτοξινών όπως ορίζονται από την Ε.Ε. για διάφορες κατηγορίες τροφίμων και ζωοτροφών. [179,182,183,184,185,186,187]]

3.7 ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

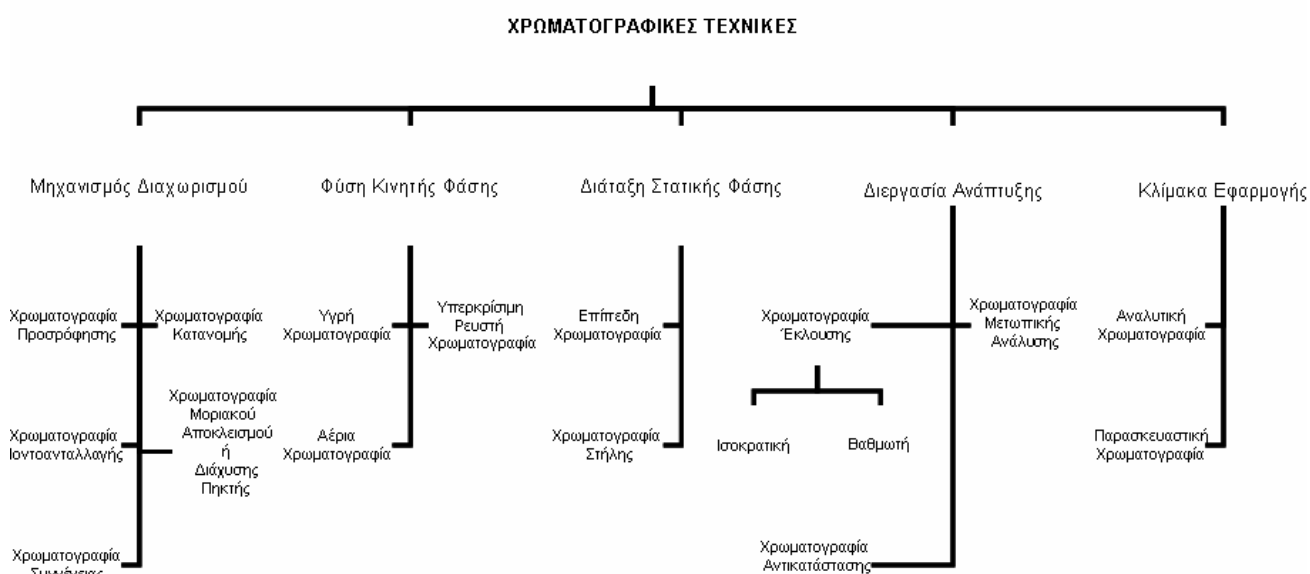
Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει πολλές προσπάθειες για την ανάπτυξη μεθόδων που αφορούν τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μυκοτοξινών χρησιμοποιώντας LC-MS/MS. Αυτό θα μείωνε εξαιρετικά το κόστος αλλά και τον χρόνο της ανάλυσης. Αν και η φασματοσκοπία μάζας συχνά προσφέρει επαρκή επιλεκτικότητα και ευαισθησία, η εφαρμογή της στην ταυτόχρονη ανάλυση πολλών μυκοτοξινών, παρεμποδίστηκε μόνο από την διαφορετικότητα που παρουσιάζουν στις χημικές ιδιότητες τους οι τοξίνες όπως (οξύτητα, βασικότητα, πολικότητα). Για αυτό τον λόγο έπρεπε να υπάρξουν συμβιβασμοί ως προς την επιλογή της κινητής φάσης, του μέσου εκχύλισης αλλά και για τις πειραματικές συνθήκες (θερμοκρασία).

Ταχείς μέθοδοι οι οποίες βασίζονται σε ανοσοχημικές τεχνικές έχουν το πλεονέκτημα ότι δεν απαιτούν στάδια καθαρισμού. Η ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) είναι μια τεχνική η οποία χρησιμοποιείται ευρέως για το γρήγορο έλεγχο των περισσότερων μυκοτοξινών, ειδικά για τον έλεγχο των πρώτων υλών. Αν και οι δοκιμές ELISA εμφανίζουν υψηλή εξάρτηση από το υπόστρωμα, τα πλεονεκτήματα της είναι η μεγάλη ταχύτητα, η ευκολία της λειτουργίας της και η ευαισθησία. Οι δοκιμές ELISA είναι διαθέσιμες στο εμπόριο για τις περισσότερες από τις σημαντικότερες μυκοτοξίνες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4ο ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να διαχωριστούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τη φύση των δυνάμεων που καθορίζουν την κατανομή ανάμεσα στις φάσεις, την επιλογή των δύο φάσεων, τη διάταξη της στατικής φάσης, τη διεργασία ανάπτυξης και την κλίμακα εφαρμογής. Στο σχήμα 4.1 δίνεται μια συνολική ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών, έτσι όπως αυτή μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τρόπους. [188]



Σχήμα 4.1. Ταξινόμηση των χρωματογραφικών τεχνικών. [189]

4.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) άρχισε να αναπτύσσεται τη δεκαετία του '60, με την πρόοδο της τεχνολογίας, καθώς άρχισαν να κατασκευάζονται χαλύβδινες στήλες ανθεκτικές στις μεγάλες πιέσεις και αντλίες υψηλής πίεσης, σταθερής παροχής. Η HPLC ουσιαστικά είναι εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης των στηλών, οπότε και αναπτύσσονται μεγάλες πιέσεις.

Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση, ως αποτέλεσμα συνδυασμού των διαφορετικών μηχανισμών. Στην HPLC το δείγμα εισάγεται στην

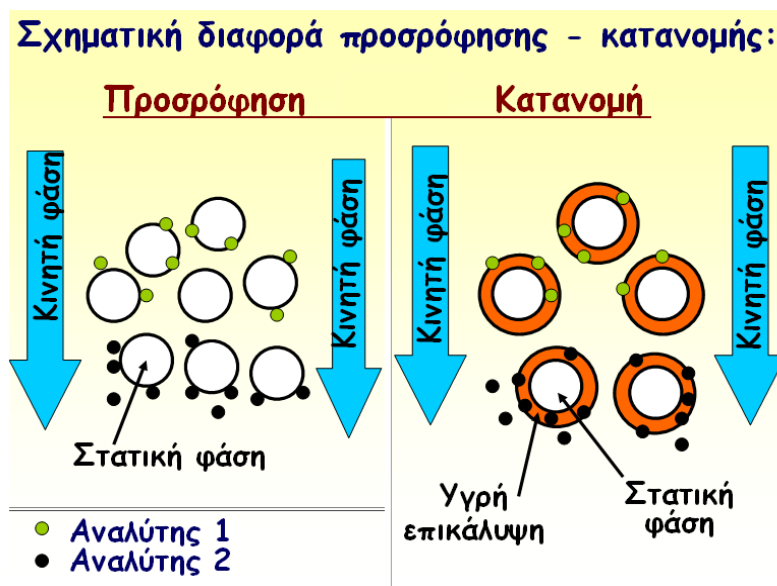
κορυφή της χρωματογραφικής στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται με τη μορφή ζωνών και τελικά εκκλούνται το ένα μετά το άλλο.

Η HPLC είναι μία αναλυτική τεχνική διαχωρισμού και ποσοτικού προσδιορισμού μη πτητικών ή θερμοευαίσθητων ουσιών, με καθολική εφαρμογή (αφού λίγες ουσίες εξαιρούνται από την HPLC) και ευαισθησία. Η χρησιμοποιούμενη κινητή φάση είναι υγρή, ενώ η στατική φάση είναι στερεά ή υγρή ακινητοποιημένη πάνω σε αδρανές υπόστρωμα. [190,191,192]

Στα πειράματα που αρχικά έγιναν από τον Tswett είχε χρησιμοποιηθεί μια πολική στατική φάση και η κινητή φάση ήταν περισσότερο άπολη. Το είδος αυτό της χρωματογραφίας προσρόφησης καλείται «χρωματογραφία κανονικής φάσης». Στον Πίνακα 4.1 δίνεται η ταξινόμηση των μορφών της HPLC ανάλογα με το μηχανισμό διαχωρισμού. [192]

Πίνακας 4.1. Ταξινόμηση των μορφών της HPLC, με βάση τις ιδιότητες των ενώσεων που διαχωρίζονται. [193]

Είδη Χρωματογραφίας	Μηχανισμοί Διαχωρισμού
Χρωματογραφία Προσρόφησης (κανονικής και αντίστροφης φάσης)	Εκλεκτική προσρόφηση/εκρόφηση των διαφόρων ενώσεων στη στατική φάση. Αλληλεπιδράσεις ηλεκτροστατικής φύσης.
Χρωματογραφία Κατανομής	Εκλεκτική κατανομή μεταξύ δύο μη μιγνυόμενων υγρών (κινητή και στατική φάση σε υγρή κατάσταση). (Σχήμα 4.2)
Χρωματογραφία Ιονανταλλαγής	Διαφορές σε ιονανταλλακτικές ιδιότητες, που οφείλονται σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, μεταξύ των προσδιοριζόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης.
Χρωματογραφία Ζεύγους Ιόντων	Σχηματισμός ζεύγους ιόντων και εκλεκτική κατανομή ή προσρόφηση.
Χρωματογραφία Συγγένειας (Χειρόμορφη χρωματογραφία)	Εκλεκτική δέσμευση των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε υποκαταστάτες συνδεδεμένους στην επιφάνεια της στατικής φάσης.
Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους/Διάχυσης Πηκτής	Διαχωρισμός με βάση το Σχήμα και το μέγεθος των προσδιοριζόμενων μορίων.



Σχήμα 4.2. Μηχανισμοί διαχωρισμού στην χρωματογραφία προσρόφησης και στην χρωματογραφία κατανομής. [194]

Ειδικότερα :

- Η χρωματογραφία προσρόφησης εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων
- Η χρωματογραφία κατανομής εφαρμόζεται για το διαχωρισμό μη ιοντικών πολικών ενώσεων
- Η χρωματογραφία ιονανταλλαγής εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ιοντικών ενώσεων
- Η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού εφαρμόζεται για το διαχωρισμό ενώσεων με μοριακό βάρος μεγαλύτερο από 10.000

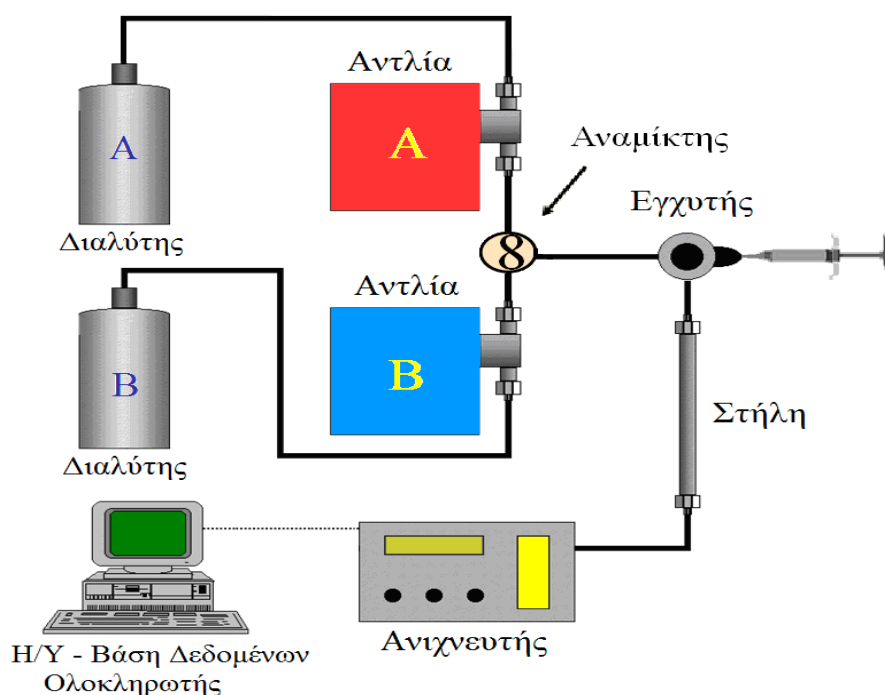
Τα πεδία εφαρμογών του κάθε είδους υγροχρωματογραφίας συχνά αλληλεπικαλύπτονται. [192]

4.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Μία απλή διάταξη ενός συστήματος HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη: α) τις φιάλες αποθήκευσης των διαλυτών (δοχεία που περιέχουν τους διαλύτες που αποτελούν την κινητή φάση, συχνά είναι εφοδιασμένα με μέσα απομάκρυνσης διαλυμένων αερίων, σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων), β) την αντλία υψηλής πίεσης, γ) το σύστημα εισαγωγής του δείγματος, δ) τη χρωματογραφική στήλη, ε) τον

ανιχνευτή και στ) τη μονάδα επεξεργασίας και καταγραφής των δεδομένων. Στο Σχήμα 4.3 δίνεται μια τυπική διάταξη ενός συστήματος HPLC. Επιπλέον μπορούν να προστεθούν και άλλα τμήματα βελτιώνοντας την απόδοση της τεχνικής.

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος μπορεί να αποτελείται από βαλβίδα σταθερού όγκου για έγχυση του δείγματος ή από αυτόματο δειγματολήπτη.
- Η χρωματογραφική στήλη μπορεί να βρίσκεται σε ειδικό θερμοστατούμενο φούρνο, εξασφαλίζοντας μεγαλύτερη επαναληψιμότητα στις μετρήσεις.
- Στον πρώτο ανιχνευτή μπορεί να συνδεθεί σε σειρά και δεύτερος ανιχνευτής.
- Με τη σύνδεση και δεύτερης χρωματογραφικής στήλης σε σειρά επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός, ενώ με μια προσθήκη αμέσως πριν τη χρωματογραφική στήλη αυξάνεται ο χρόνος ζωής της τελευταίας.
- Επίσης συνδέοντας μια δεύτερη αντλία και μαζί και ένα κατάλληλο σύστημα επιλογής διαλυτών μετατρέπεται ένα σύστημα χαμηλής πίεσης (Low Pressure) σε υψηλής πίεσης (High Pressure), εξασφαλίζοντας κυρίως πιο επαναλήψιμες ροές των διαλυτών. [190,195]



Σχήμα 4.3. Τυπική διάταξη συστήματος HPLC. [190]

4.3.1 Σύστημα διανομής διαλυτών

Η μικρή κοκκομετρική διάσταση των υλικών πλήρωσης των χρωματογραφικών στηλών δημιουργεί στο σύστημα υψηλή αντίσταση στη ροή της κινητής φάσης, η οποία υπερνικείται με τη χρήση αντλίας. Οι αντλίες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν χωρίζονται σε αυτές που εξασφαλίζουν σταθερή πίεση στο σύστημα και σε αυτές που εξασφαλίζουν σταθερή ροή των διαλυτών. Και στις δύο περιπτώσεις οι αντλίες θα πρέπει να αντέχουν σε πίεση μέχρι 7000 psi. Είναι κατασκευασμένες από υλικά ανθεκτικά στους οργανικούς διαλύτες και στα υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα, που συνήθως χρησιμοποιούνται ως κινητές φάσεις. Σε όλες τις εφαρμογές της HPLC χρησιμοποιούνται ευρέως οι αντλίες σταθερής ροής και από αυτές, οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες στα σύγχρονα όργανα, είναι οι αντλίες παλινδρόμησης. Πρόκειται για αντλίες δύο πιστονιών, τα οποία λειτουργούν με διαφορά φάσης 180° ώστε να αποσβένονται οι παλμοί. Όταν το πιστόνι κινείται προς τα πίσω, γίνεται αναρρόφηση διαλύματος από τα δοχεία των διαλυτών και όταν κινείται προς τα εμπρός η κινητή φάση εξαναγκάζεται να περάσει από τη στήλη. Συνήθως η κίνηση των πιστονιών μεταδίδεται υδραυλικά σε ειδικά διαφράγματα, ώστε να αποφεύγεται η άμεση επαφή τους με την κινητή φάση.

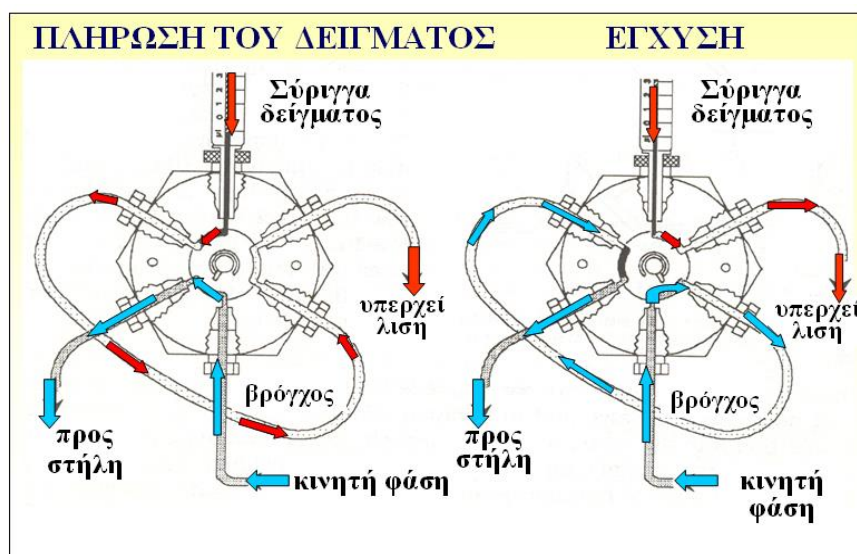
Στη βαθμωτή έκλυση, όπου η σύσταση της κινητής φάσης μεταβάλλεται με το χρόνο, απαιτείται η ανάμιξη των διαλυτών να γίνεται από ειδική διάταξη μίξης. Συστήματα ανάμιξης χρησιμοποιούν είτε μια αντλία, είτε συνδυασμό δύο αντλιών, όπου επιτρέπονται οι δραστικές αλλαγές της σύστασης του διαλύτη. Η βαθμωτή έκλυση είναι απαραίτητη για το διαχωρισμό ενώσεων με παρόμοια δομή και ιδιότητες. [190,195]

4.3.2 Μονάδα εισαγωγής δείγματος

Ο πιο απλός τρόπος εισαγωγής δείγματος στη στήλη είναι με τη βοήθεια βαλβίδας καθορισμένου όγκου, η οποία αποτελείται από έξι κανάλια δύο θέσεων. Το δείγμα με μια μικροσύριγγα εισάγεται στο βρόχο (loop). Στη συνέχεια με περιστροφή της βαλβίδας από τη θέση πλήρωσης, στη θέση έγχυσης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης το δείγμα οδηγείται στην κορυφή της αναλυτικής στήλης. Η διαδικασία αυτή φαίνεται στο σχήμα 4.4.

Στις πιο σύγχρονες διατάξεις χρησιμοποιούνται αυτόματα συστήματα δειγματοληψίας, εξασφαλίζοντας την πλήρη αυτοματοποίηση του συστήματος και τους

επαναλήψιμους όγκους δείγματος. Οι αυτόματοι δειγματολήπτες είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στις αναλύσεις ρουτίνας, για την ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων. [190,195]



Σχήμα 4.4. Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος με έξι κανάλια. [194]

Μεταβάλλοντας το μέγεθος του βρόχου ένεσης στον εισαγωγέα, το ποσό του δείγματος που εισάγεται στη στήλη μπορεί να αλλάξει. Ένεση/έγχυση υπερβολικών όγκων δείγματος θα προκαλέσει υπερφόρτωση, η οποία θα μείωσε σημαντικά την απόδοση του διαχωρισμού. Για παράδειγμα σε ακραίες περιπτώσεις, μία υπερφόρτωση όγκου μπορεί να δώσει επίπεδες κορυφές. [196]

4.3.3 Χρωματογραφική στήλη

Οι χρωματογραφικές στήλες που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι κυρίως οι προστήλες και οι αναλυτικές στήλες. Οι προστήλες χρησιμοποιούνται για την προστασία της αναλυτικής στήλης, είναι συνήθως μικρότερες σε διαστάσεις και τοποθετούνται πριν την αναλυτική στήλη. Ενώ η αναλυτική στήλη είναι η καρδιά του χρωματογραφικού συστήματος, αφού εκεί πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών. Η διαχωριστική ικανότητα της στήλης εξαρτάται από το υλικό πλήρωσης, το σχήμα και τις διαστάσεις των κόκκων, την ενεργή επιφάνεια και το ποσοστό πλήρωσής της. Ακόμη οι στήλες ποικίλουν ανάλογα με τα γεωμετρικά (π.χ. μήκος της στήλης) και τα ποιοτικά (π.χ. επιτρεπτή περιοχή pH λειτουργίας της στήλης) τους χαρακτηριστικά.

Οι παρασκευαστικές στήλες είναι στήλες μεγάλων διαστάσεων, με υλικά πλήρωσης παρόμοια με αυτά των αναλυτικών στηλών, που χρησιμοποιούνται για το

διαχωρισμό και την παραλαβή ενώσεων από ένα μίγμα, σε ποσότητες της τάξης των mg.

Τα υλικά πλήρωσης των στηλών που χρησιμοποιούνται στην HPLC βασίζονται είτε σε ανόργανα κεραμικά, είτε οργανικά πολυμερή υποστρώματα. Τα ανόργανα κεραμικά που συνήθως χρησιμοποιούνται είναι η πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου (silica gel) και το οξείδιο του αργιλίου (alumina). Τα ανόργανα υλικά πλήρωσης είναι αρκετά ανθεκτικά και δεν αλληλεπιδρούν με τους διαλύτες. Πολυμερή υλικά πλήρωσης καθαρότητας HPLC βασίζονται σε διασταυρούμενους δεσμούς στυρενίου - διβινυλοβενζολίου ή μεθακρυλικών. Τα πολυμερή υλικά πλήρωσης δε χαρακτηρίζονται από υψηλή ανθεκτικότητα και είναι περισσότερο συμπιεσμένα. Οι διαλύτες και οι προσδιοριζόμενες ενώσεις μπορεί να εισχωρήσουν στο πολυμερές υπόστρωμα οδηγώντας σε μικρότερες αποδόσεις της στήλης εξαιτίας της μειωμένης μάζας που μεταφέρεται.

Το συνηθέστερο υλικό που χρησιμοποιείται ως υλικό πλήρωσης στη στήλη HPLC είναι η πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου. Επιπλέον της υψηλής φυσικής σταθερότητας που τη χαρακτηρίζει, στην επιφάνεια της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου μπορεί εύκολα να προσαρτηθεί ένα μεγάλο εύρος υποκαταστατών-συναρμοτών (ligands). Με την τεχνική αυτή τροποποίηση της επιφάνειάς της παρασκευάζονται υλικά πλήρωσης στηλών για αντίστροφη χρωματογραφία, για χρωματογραφία ιονανταλλαγής, για υδροφιλικές ή υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, και για χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους. Υλικά πλήρωσης από πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου είναι συμβατά με μεγάλο εύρος διαλυτών από πολικούς μέχρι και μη πολικούς. Για αναλύσεις ρουτίνας που γίνονται σε στήλες με υλικό πλήρωσης που βασίζεται στην πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου το εύρος pH που ενδείκνυται είναι 2.0 - 8.0, γιατί έχει αποδειχθεί ότι μειονέκτημα της είναι η μειωμένη της σταθερότητα σε υδατικές αλκαλικές κινητές φάσεις. Ένα άλλο μειονέκτημα της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου είναι η παρουσία ελεύθερων σιλανολικών ομάδων, δίνοντας κορυφές με ουρά σε ουδέτερες συνθήκες (pH 7.0).

Η επιφάνεια της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου τροποποιείται εύκολα με χημικές αντιδράσεις με οργανοσιλανολικά αντιδραστήρια. Σκοπός είναι να δημιουργηθεί ομοιόμορφη μονομοριακή στιβάδα (δεσμευμένα υλικά πλήρωσης, bonded phase). Υπάρχουν διάφορα είδη σιλανίων που χρησιμοποιούνται για τις αντιδράσεις δέσμευσης, τα οποία χαρακτηρίζονται ως μονο-, δι- ή τρι-δραστικά

σιλάνια, ανάλογα με τον αριθμό των ομάδων πάνω στο σιλάνιο (συνήθως ομάδες χλωρίου) που αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια της πηκτής. [195,193]

Η επιλογή μιας κατάλληλης στήλης διαχωρισμού εξαρτάται κυρίως από τους αναλύτες που πρόκειται να διαχωριστούν. Η μήτρα του δείγματος παίζει επίσης ένα σημαντικό ρόλο σε αυτή την απόφαση. Η εκλεκτικότητα και η χωρητικότητα είναι τα δύο πιο σημαντικά χαρακτηριστικά για την επιλογή μιας στήλης. Από εκεί και πέρα σημαντική είναι η απόδοση της στήλης.

Η χωρητικότητα της στήλης είναι μία σημαντική παράμετρος μιας και καθορίζει τον ανηγμένο χρόνο κατακράτησης καθώς επίσης και την απαιτούμενη δύναμη-ισχύ έκλουσης της κινητής φάσης για να εκλούσει τους αναλύτες μέσα από τη στήλη. Εάν η χωρητικότητα είναι πολύ υψηλή, τότε απαιτείται μία κινητή φάση ισχυρότερη (εκλουστικά) από τη συνήθως αναγκαία, ενώ αν η χωρητικότητα είναι πολύ χαμηλή αρκεί μία κινητή φάση με μικρότερη ισχύ έκλουσης, καθώς η στήλη υπερφορτώνεται εύκολα. Στη HILIC το εμβαδό επιφάνειας του υλικού πλήρωσης και η ικανότητα της στατικής φάσης να δεσμεύει νερό επηρεάζουν τη χωρητικότητα της στήλης. Για φορτισμένες στατικές φάσεις, η πυκνότητα του φορτίου θα συμβάλει επίσης στη χωρητικότητα της στήλης.

Η εκλεκτικότητα της στήλης εξαρτάται από διάφορους παράγοντες, όπως για παράδειγμα το υλικό στήριξης της στατικής φάσης και τη χημική δομή της δραστικής ομάδας. Επομένως η εκλεκτικότητα βασίζεται στην αλληλεπίδραση των χαρακτηριστικών της στήλης και στις ιδιότητες των αναλυτών που πρόκειται να διαχωριστούν.

Σε μία αποδοτική στήλη, όλοι οι αναλύτες ενός συγκεκριμένου είδους εκλούνται όλοι μαζί σε έναν μικρό όγκο. Η αντίστοιχη κορυφή έχει ένα μικρό εύρος (φασματικής) ζώνης και είναι φυσικά πιο υψηλή και πιο διαχωρισμένη από μία κορυφή που προέρχεται από έκλυση σε έναν μεγάλο όγκο. Για να μπορέσουμε να συγκρίνουμε στήλες πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη και οι χρόνοι κατακράτησης των αναλυτών. [196]

4.3.4 Συστήματα ανίχνευσης

Στην HPLC χρησιμοποιούνται κυρίως ανιχνευτές συνεχούς παρακολούθησης του εκλούσματος από τη στήλη, μέσω μιας κυψελίδας συνεχούς ροής. Διάφοροι ανιχνευτές μπορούν να χρησιμοποιηθούν, η αρχή λειτουργίας των οποίων βασίζεται

είτε στη μέτρηση μιας συγκεκριμένης φυσικοχημικής ιδιότητας των προσδιοριζόμενων ενώσεων (π.χ. η απορρόφηση και ο φθορισμός), είτε στη μέτρηση κάποιας φυσικοχημικής ιδιότητας της κινητής φάσης (π.χ. ο δείκτης διάθλασης και η διηλεκτρική σταθερά, της οποίας η τιμή μεταβάλλεται κατά την έκλυση ουσιών). Τα κυριότερα χαρακτηριστικά ενός ανιχνευτή στην HPLC είναι ο θόρυβος, η ευαισθησία, ο χρόνος απόκρισης και η γραμμικότητα.

Ένας από τους πιο διαδεδομένους ανιχνευτές στην HPLC είναι ο ανιχνευτής υπεριώδους- ορατού. Ενώσεις που απορροφούν στο υπεριώδες-ορατό (190-600 nm) μπορούν να προσδιοριστούν με ανιχνευτές τέτοιου τύπου. Σύμφωνα με το νόμο Lambert-Beer, η απορρόφηση της ακτινοβολίας είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της ένωσης στην κυψελίδα και του μήκους της διαδρομής στην κυψελίδα:

$$A = -\log T = \log (P_0/P) = -\epsilon l C \quad (4.1)$$

όπου A είναι η απορρόφηση, T η διαπερατότητα, P₀ είναι η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, P είναι η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας, ε η μοριακή απορροφητικότητα του δείγματος, l είναι το μήκος της οπτικής διαδρομής της κυψελίδας σε cm και C είναι η συγκέντρωση του δείγματος σε mol/L. Η ανίχνευση βασίζεται στην απορρόφηση φωτονίων από κάποια χαρακτηριστική ομάδα της ένωσης.

Ο ανιχνευτής υπεριώδους μετράει την απορρόφηση σε ένα συγκεκριμένο προεπιλεγμένο μήκος κύματος κι έτσι για την ταυτοποίηση των ενώσεων χρησιμοποιείται μόνο ο χρόνος συγκράτησης, στοιχείο όχι πάντα ιδιαίτερα αξιόπιστο, αφού μπορεί στον ίδιο χρόνο να συνεκλούεται και κάποια παρεμπόδιση μαζί με την ένωση που εξετάζεται. Λύση στο πρόβλημα αυτό έδωσε ο ανιχνευτής διάταξης φωτοδιόδων (photodiode array detector, PDA) η λειτουργία του οποίου βασίζεται στη σάρωση του ολικού φάσματος απορρόφησης της προσδιοριζόμενης ένωσης στο ορατό και στο υπεριώδες. Η ουσιαστικότερη διαφορά με τον απλό ανιχνευτή UV-Vis είναι ότι στη θέση του μονοχρωμάτορα υπάρχει ένα ολογραφικό φράγμα.

Οι φθορισμομετρικοί ανιχνευτές (FLD) χρησιμοποιούνται για ενώσεις που φθορίζουν και δίνουν σήμα ανάλογο της συγκέντρωσης του συστατικού που φθορίζει. Ο φθορισμός στηρίζεται στην εκπομπή φωτονίων από ηλεκτρονικά διεγερμένα μόρια. Η ευαισθησία του φθορισμομετρικού ανιχνευτή είναι 10-100 φορές υψηλότερη έναντι του ανιχνευτή UV-Vis.

Οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές χωρίζονται στους αμπερομετρικούς, τους αγωγιμομετρικούς και τους ποτενσιομετρικούς. Εντούτοις στην HPLC έχει ταυτιστεί ο ηλεκτροχημικός (ECD) με τον αμπερομετρικό, ο οποίος αναφέρεται στη μέτρηση του ηλεκτρικού ρεύματος που παράγεται κατά την οξείδωση ή αναγωγή κάποιου συστατικού στην επιφάνεια ηλεκτροδίων μιας κυψελίδας συνεχούς ροής.

Αυτοί είναι οι πιο συνηθισμένοι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC, ενώ άλλοι πιο σπάνιοι είναι οι ανιχνευτές δείκτου διάθλασης, οι FT-IR (Fourier Transfer – Infrared Spectroscopy) και οι ανιχνευτές σκεδασμού φωτός μετά από εξάτμιση. Με την ανάπτυξη της φασματογραφίας μάζας αναπτύχθηκε σήμερα και η συνδυασμένη τεχνική LC-MS με σημαντικές εφαρμογές σε όλα τα πεδία της ανάλυσης. Η τεχνική αυτή εφαρμόζεται στον προσδιορισμό μεγάλου αριθμού ουσιών όπως οι πρωτεΐνες, οι υδατάνθρακες, τα φυτοπροστατευτικά, τα αντιβιοτικά, τα επιβραδυντικά φλόγας καθώς και άλλες κατηγορίες ενώσεων. [188,192,195]

Ο ιδανικός ανιχνευτής για την υγροχρωματογραφία πρέπει να διαθέτει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Ικανοποιητική ευαισθησία. Η ευαισθησία ενός οργάνου περιγράφει την ικανότητά του να διακρίνει μικρές διαφορές στη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας.
- Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα.
- Γραμμική απόκριση σε μεγάλη περιοχή συγκεντρώσεων.
- Ταχύτατους χρόνους απόκρισης, ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής.
- Μικρό εσωτερικό νεκρό όγκο, ώστε να περιορίζεται η διανυθείσα διαδρομή των προσδιοριζόμενων ουσιών και κατ' επέκταση η διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών. [192]

4.3.5 Σύστημα καταγραφής

Ο ολοκληρωτής-καταγραφικό καταγράφει το σήμα που λαμβάνει από τον ανιχνευτή, το ολοκληρώνει και δίνει το χρωματογράφημα. Δίνει επίσης το χρόνο συγκράτησης του κάθε συστατικού, το ύψος της κάθε κορυφής ή/και το εμβαδόν της. Το αναλογικό καταγραφικό σήμερα έχει αντικατασταθεί από τον ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος με ειδικό πρόγραμμα που συνοδεύει τις διατάξεις HPLC

μετατρέπει το αναλογικό σήμα σε ψηφιακό. Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση του H/Y είναι πολλά, όπως η αποθήκευση μεγάλου όγκου πληροφοριών, η εύκολη αναζήτηση αποθηκευμένων χρωματογραφημάτων, η δυνατότητα επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων και μετά την ανάλυση, η οικονομία κ.ά. [195]

4.4 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΟΣ

Ως χρωματογράφημα ορίζεται η γραφική απεικόνιση του συνεχόμενου σήματος που καταγράφεται από τον ανιχνευτή για τη σύσταση της κινητής φάσης, συμπεριλαμβανομένων και των προσδιοριζόμενων ενώσεων, που βγαίνουν κάθε στιγμή από την έξοδο της αναλυτικής στήλης σε σχέση με το χρόνο. Το προφίλ της συγκέντρωσης του κάθε συστατικού που εκλύεται έχει στο χρωματογράφημα την κατανομή κατά Gauss, αναπαριστώντας τη διασπορά των μορίων κατά το διαχωρισμό. Όσο περισσότερο χρόνο χρειάζεται μια ένωση για να κινηθεί και να εξέλθει από τη στήλη, τόσο πιο διευρυμένη είναι η κορυφή της. [190]

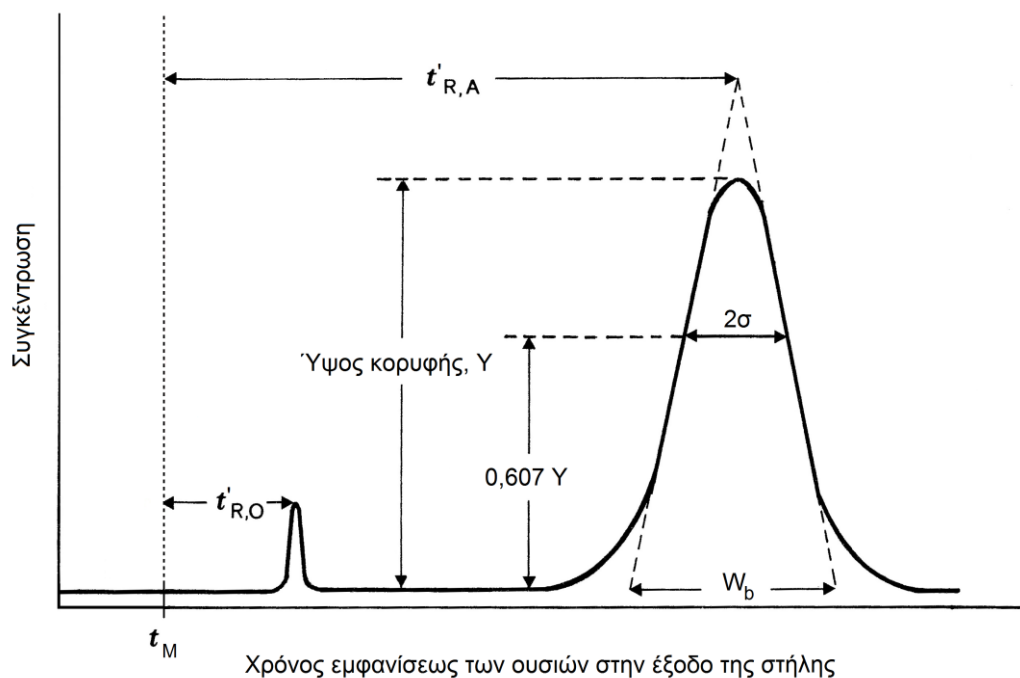
4.4.1 Χρόνος συγκράτησης

Με σταθερή ροή της κινητής φάσης ο χρόνος που χρειάζεται ένα συστατικό να διέλθει μέσα από τη στήλη και να φτάσει στον ανιχνευτή ονομάζεται χρόνος κατακράτησης t_R (retention time). Στο σχήμα 4.6 δίνεται το χρωματογράφημα του διαχωρισμού δύο ενώσεων Ο και Α, με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης $t_{R,O}$ και $t_{R,A}$. Ως t_M ορίζεται ο χρόνος που χρειάζεται η κινητή φάση για να διέλθει από τη στήλη. Ουσιαστικά ο χρόνος t_M ισοδυναμεί με το χρόνο που ένα συστατικό δε κατακρατείται (συγκρατείται) από τη στήλη και εκλύεται αμέσως. Ο χρόνος αυτός ονομάζεται νεκρός χρόνος. Ο χρόνος κατακράτησης (ή αλλιώς συγκράτησης) μετρίεται από τη στιγμή που το δείγμα εισάγεται στην αναλυτική στήλη και μέχρι τη στιγμή που φτάνει στον ανιχνευτή.

Η χρήση του χρόνου κατακράτησης ως γενικό χαρακτηριστικό απόδοσης ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού παρουσιάζει μειονεκτήματα, καθώς περιλαμβάνει το χρόνο που το συστατικό βρίσκεται στην κινητή φάση, αλλά και το χρόνο που βρίσκεται στη στατική φάση και είναι συνάρτηση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης. Ο παράγοντας κατακράτησης k (retention factor, ή αλλιώς παράγοντας χωρητικότητας) είναι πιο πρακτικό μέγεθος για την περιγραφή των χαρακτηριστικών χρόνων κατακράτησης των συστατικών. Ο παράγοντας κατακράτησης, k ενός αναλύτη

περιγράφει τη σχετική ταχύτητά του εντός της στήλης και ισούται με το λόγο του διορθωμένου χρόνου κατακράτησης του συστατικού ($t_R - t_M$) προς το νεκρό χρόνο. [190,196]

$$k = (t_R - t_M) / t_M \quad (4.2)$$



t_M νεκρός χρόνος

Y ύψος κορυφής

t_R χρόνος κατακράτησης

t'_R διορθωμένος χρόνος κατακράτησης

W_b εύρος στη βάση της κορυφής

Σχήμα 4.5. Χρωματογράφημα και διάγραμμα συγκεντρώσεων των ουσιών A και O κατά σειρά εξόδου από τη χρωματογραφική στήλη. [197]

4.4.2 Αριθμός θεωρητικών πλακών

Η απόδοση μιας αναλυτικής στήλης καθορίζεται από την ικανότητά της να δίνει οξείες και συμμετρικές κορυφές, ανεξάρτητα από το χρόνο κατακράτησης. Μέτρο της απόδοσής της και του χρωματογραφικού διαχωρισμού είναι ο αριθμός των θεωρητικών πλακών N , δηλαδή ο αριθμός των περιπτώσεων που ο αναλύτης θα αλληλεπιδράσει με το υλικό διαχωρισμού κατά την διάρκεια μεταφοράς του μέσα στη στήλη.

$$H = \sigma_L^2 / L \quad (4.3)$$

$$N = (L / H) \quad (4.4)$$

$$N = 16 (t_R / t_{wb})^2 = 5.54 (t_R / t_{wh})^2 \quad (4.5)$$

όπου H το ύψος της θεωρητικής πλάκας, σ_L^2 η διακύμανση της κορυφής του αναλύτη σε μονάδες μήκους και L το μήκος του πληρωμένου τμήματος της στήλης.

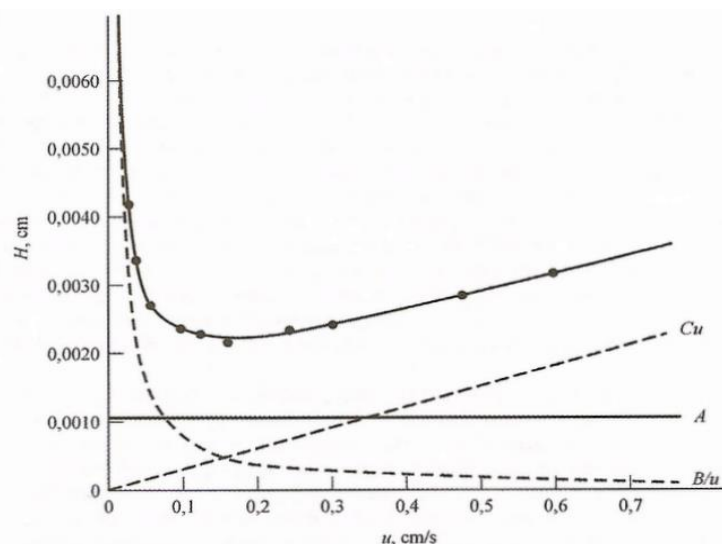
Η θεωρία της αποστακτικής στήλης (που χωρίζει τη χρωματογραφική στήλη σε θεωρητικές πλάκες) ερμήνευσε με επιτυχία το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών, ωστόσο απέτυχε να ερμηνεύσει τη διεύρυνσή τους κατά τη διαδρομή του αναλύτη στη στήλη. Έτσι, αντικαταστάθηκε από την κινητική θεωρία, η οποία ερμήνευσε με επιτυχία, τόσο τη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών, όσο και την επίδραση διαφόρων παραγόντων σε αυτή. Η κινητική θεωρία εκφράζεται κυρίως με την εξίσωση van Deemter. Η εξίσωση van Deemter για την αέριοχρωματογραφία είναι η εξής:

$$H = A + (B / u) + [(C_S + C_M) u] \quad (4.6)$$

Ο όρος A αντιπροσωπεύει την πολλαπλότητα διαδρομών κατά τη ροή στη στήλη, ο όρος B τη διαμήκη διάχυση των μορίων του αναλύτη, οι C_S και C_M τη μεταφορά μάζας στη στατική και την κινητή φάση αντίστοιχα και ο όρος u την ταχύτητα της κινητής φάσης. Για να περιγραφεί θεωρητικά η απόδοση μιας υγροχρωματογραφικής μεθόδου χρησιμοποιείται η εξίσωση van Deemter τροποποιημένη. Οι όροι διαμήκους διάχυσης και της πολλαπλότητας διαδρομών ροής μπορούν να θεωρηθούν αμελητέοι όταν η ροή της κινητής φάσης δεν είναι πολύ χαμηλή. Η τροποποιημένη εξίσωση van Deemter για την υγροχρωματογραφία είναι η εξής:

$$H = (C_S u + C_M u) \quad (4.7)$$

όπου C_S η μεταφορά μάζας μεταξύ στατικής και κινητής φάσης, C_M η μεταφορά μάζας στην κινητή φάση και u η ταχύτητα της κινητής φάσης. [188,190,196]



Σχήμα 4.6. Διάγραμμα van Deemter για μια πληρωμένη στήλη υγροχρωματογραφίας. Τα σημεία πάνω στην καμπύλη είναι πειραματικά. Η συνεισφορά των επιμέρους όρων δείχνεται στις κάτω καμπύλες. A: επίδραση πολλαπλότητας διαδρομών, B/u : διαμήκης διάχυση και Cu: μεταφορά μάζας στις δύο φάσεις. [192]

Το ελάχιστο της εξίσωσης van Deemter για την υγροχρωματογραφία εμφανίζεται σε τόσο χαμηλή ταχύτητα ροής που θα αύξανε υπερβολικά το χρόνο ανάλυσης. Ωστόσο το σημαντικό συμπέρασμα αφορά στη διεύρυνση των χρωματογραφικών κορυφών, η οποία αποδεικνύεται ότι προκύπτει ως αποτέλεσμα της πεπερασμένης ταχύτητας μεταφορά μάζας στο εσωτερικό της στήλης. [190,193]

4.4.3 Παράγοντας διαχωρισμού και διακριτική ικανότητα

Η ικανότητα της αναλυτικής στήλης να διαχωρίσει δύο συστατικά A και B, όπου B είναι το πιο ισχυρά συγκρατημένο συστατικό, προσδιορίζεται από τη σχετική τους κατανομή τους μέσα στη στήλη. Ο παράγοντας διαχωρισμού α (separation factor) είναι ο λόγος των παραγόντων κατακράτησης των δύο συστατικών A και B.

$$\alpha = k_A / k_B \quad (4.8)$$

όπου k_A και k_B είναι οι παράγοντες κατακράτησης των συστατικών A και B. Ο παράγοντας του διαχωρισμού εκτός από τη στατική φάση εξαρτάται και από τη σύσταση της κινητής φάσης.

Η διακριτική ικανότητα R_s (resolution) δύο κορυφών δίνεται από τη σχέση:

$$R_s = [(t_B - t_A) / (1/2 (t_{WBA} + t_{WBB}))] \quad (4.9)$$

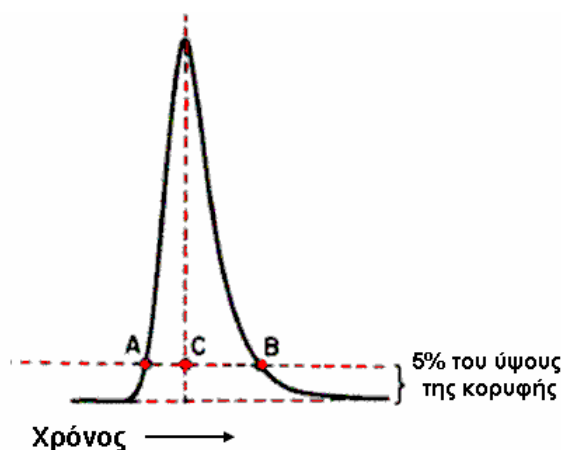
$$R_s = [(k / (k + 1)) ((\alpha - 1) / \alpha) (\sqrt{N} / 4)] \quad (4.10)$$

Όταν η τιμή της διακριτικής ικανότητας είναι μικρότερη από 1 τότε οι κορυφές αλληλεπικαλύπτονται, ενώ ικανοποιητική τιμή θεωρείται όταν είναι μεγαλύτερη του 1.5. [190,193]

4.4.4 Συμμετρία κορυφών

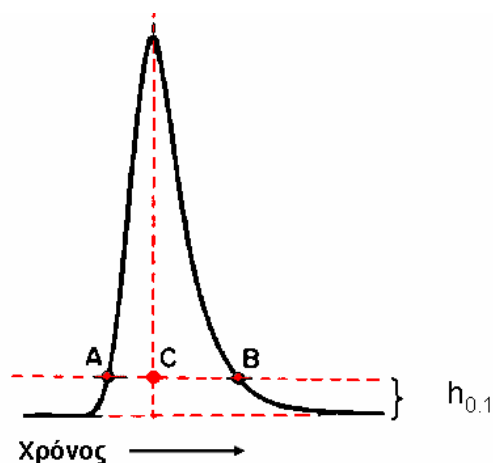
Οι κορυφές στα χρωματογραφήματα της HPLC πρέπει να είναι όσο το δυνατόν πιο συμμετρικές και να έχουν τη μορφή της κανονικής κατανομής Gauss. Συχνά όμως οι κορυφές έχουν μια μορφή ουράς. Η συμμετρία μιας κορυφής περιγράφεται με δύο τρόπους. Ο ένας είναι ο παράγοντας ουρά της κορυφής (tailing factor) και ο άλλος είναι ο παράγοντας ασυμμετρίας (asymmetry factor).

Ο παράγοντας «ουρά» υπολογίζεται στο 5% του ύψους της κορυφής όπως φαίνεται στο σχήμα 4.8 και δίνεται από τη σχέση $T_f = AB/2AC$.



Σχήμα 4.7. Παράγοντας «ουράς» κορυφής. [257]

Η ασυμμετρία (asymmetry) μιας κορυφής υπολογίζεται στο 10% του ύψους της κορυφής όπως φαίνεται στο σχήμα 4.9 και δίνεται από τη σχέση $S_{10} = CB/AC = a/b$. Η τιμή της παραμέτρου S_{10} πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0,8 και 1,2.

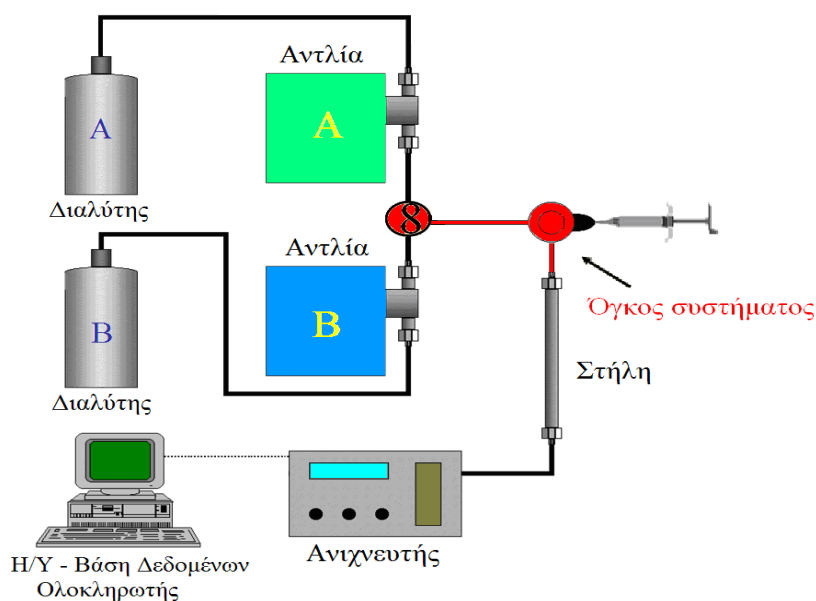


Σχήμα 4.8. Παράγοντας ασυμμετρίας κορυφής. [257]

Συνήθως οι κορυφές που εκλούνται αργότερα από τη στήλη έχουν μεγαλύτερη ουρά, με αποτέλεσμα το ύψος τους να είναι μικρότερο. Αυτό σημαίνει πως τα όρια ανίχνευσης τέτοιων κορυφών είναι υψηλότερα. [190,193]

4.4.5 Όγκος συστήματος

Μια σημαντική παράμετρος που χαρακτηρίζει το κάθε σύστημα HPLC είναι ο όγκος συστήματος (όγκος υστέρησης βαθμιδωτής έκλουσης, dwell volume ή gradient delay volume). Ο όρος αυτός αναφέρεται στον όγκο κινητής φάσης που μεσολαβεί από τη στιγμή της ανάμιξης των διαλυτών της κινητής φάσης μέχρι και τη στιγμή που η κινητή φάση φτάνει στη στήλη. Ο όγκος αυτός περιλαμβάνει τη στιγμή της ανάμιξης, τις σωληνώσεις που μεταφέρουν την κινητή φάση και οποιοδήποτε άλλο όγκο (συμπεριλαμβανομένης και της διαδρομής μέσα στο βρόχο εισαγωγής του δείγματος) στο σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Στο σχήμα 4.10 φαίνεται σχηματικά ο νεκρός όγκος μιας διάταξης υψηλής πίεσης HPLC. [195]



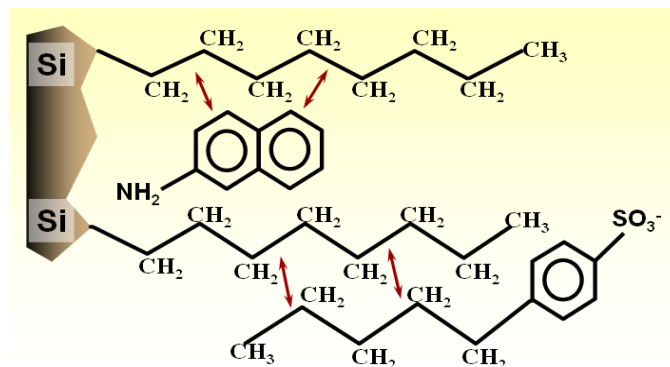
Σχήμα 4.9. Σχηματική παράσταση του όγκου συστήματος σε διάταξη υψηλής πίεσης HPLC. [190]

4.5 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΑΝΤΙΣΤΡΟΦΗΣ ΦΑΣΗΣ

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη τεχνική, αφού σ' αυτή βρίσκουν εφαρμογή πάνω από το 80% των αναλύσεων με HPLC. Η στατική φάση είναι λιγότερη πολική της κινητής. Μεταξύ των μορίων του προσδιοριζόμενου συστατικού και της στατικής φάσης αναπτύσσονται κυρίως ασθενείς μη εκλεκτικές αλληλεπιδράσεις van der Waals (Σχήμα 4.11). Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις διαχωρίζονται με βάση το βαθμό της υδρόφοβης αλληλεπίδρασής τους με τη στατική φάση, και έτσι όσο πιο πολικό είναι κάποιο μόριο, τόσο πιο γρήγορα εκλύεται από τη χρωματογραφική στήλη (Σχήμα 4.13).

Τα συνηθέστερα υλικά πλήρωσης στη Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reversed-Phase, RP) έχουν ως βάση την πηκτή του διοξειδίου του πυριτίου, με ελεύθερες σιλανολικές (-SiOH) και σιλοξανικές ομάδες (-Si-O-Si). Η κατεργασία της πηκτής του διοξειδίου του πυριτίου με οργανοχλωροσιλάνια και οργανο-αλκοξυσιλάνια οδηγεί στην εισαγωγή διαφόρων ομάδων, όπως όκτυλο (-C8), δεκαόκτυλο (-C18), φαίνυλο (-Ph), κύανο (-CN) και άλλων αλκυλοάζωτο ομάδων (R-N+(CH₃)). Στη δεσμευμένη πηκτή του SiO₂ επιτυγχάνεται μεγαλύτερη προσρόφηση των ενώσεων και συνήθως καλύτερος διαχωρισμός. Συχνά ακολουθεί επιπλέον αντίδραση (σιλανοποίηση) με χλώροτριμέθυλοσιλάνιο για την κάλυψη των ελεύθερων ομάδων

σιλανόλης (endcapping), οι οποίες δεν αντέδρασαν λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από την ομάδα R, και οι ποίες αποδίδουν ανεπιθύμητη πολικότητα στην επιφάνεια της στατικής φάσης.



Σχήμα 4.10. Σχηματική απεικόνιση των αλληλεπιδράσεων *van der Waals* μεταξύ των μορίων του αναλύτη και της μη πολικής στατικής φάσης. [194]

Η κινητή φάση στην RP-HPLC είναι περισσότερο πολική. Πρόκειται για μίγματα νερού ή υδατικών ρυθμιστικών διαλυμάτων με οργανικούς τροποποιητές, συνήθως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, ισοπροπανόλη, τετραϋδροφουράνιο κ.ά. Σημαντική παράμετρος για τη συγκράτηση των ιονικών ενώσεων είναι η τιμή του pH της κινητής φάσης. Γενικότερα, για έναν οποιονδήποτε αναλύτη, οι κρίσιμοι παράγοντες σε ένα διαχωρισμό είναι η χημεία της στατικής φάσης, η σύνθεση και η σύσταση της κινητής φάσης, η θερμοκρασία και το pH.

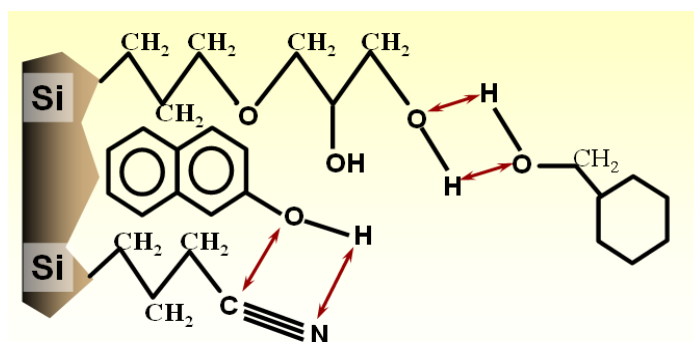
Η πολικότητα της κινητής φάσης καθορίζει τη σειρά έκλουσης των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Οι πιο πολικοί αναλύτες αλληλεπιδρούν λιγότερο με τη χαμηλής πολικότητας στατική φάση με αποτέλεσμα λιγότερους μερισμούς και άρα μικρότερη κατακράτηση από τη στήλη, ενώ λιγότερο πολικοί αναλύτες αλληλεπιδρούν περισσότερο με τη στατική φάση με αποτέλεσμα την αυξημένη κατακράτηση. [188,190,193]

4.6 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΝΟΝΙΚΗΣ ΦΑΣΗΣ

Στην υγροχρωματογραφία κανονικής φάσης (Normal-Phase, NP) το χρωματογραφικό σύστημα αποτελείται από μία κινητή φάση η οποία είναι λιγότερο πολική από τη στατική φάση. Η στατική φάση μπορεί να είναι το ίδιο το SiO₂ είτε τροποποιημένο με μία πολική ομάδα ομοιοπολικά συνδεδεμένη στην επιφάνειά του. Η

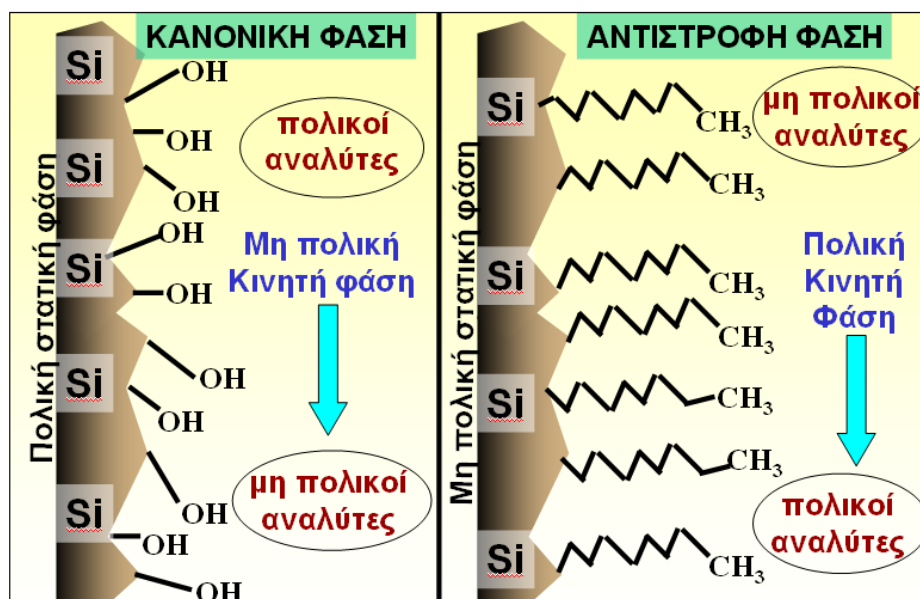
κατακράτηση των αναλυτών αυξάνεται με μείωση της πολικότητας της κινητής φάσης (Σχήμα 4.13). Μεταξύ των μορίων του αναλύτη και των πολικών μορίων της στατικής φάσης αναπτύσσονται διπολικές αλληλεπιδράσεις ή δεσμοί υδρογόνου (Σχήμα 4.12). Η υγροχρωματογραφία κανονικής φάσης έχει χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό ιοντισμένων αναλυτών, χρησιμοποιείται όμως κυρίως για τον προσδιορισμό ουδέτερων αναλυτών.

Στην κανονική φάση, η προσρόφηση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στη φύση της κατακράτησης του αναλύτη. Τα μόρια του διαλύτη βρίσκονται προσροφημένα στη στατική φάση και εκτοπίζονται από τα μόρια του αναλύτη τα οποία με αυτόν τον τρόπο κατακρατούνται. Εκτός αυτού, οι αλληλεπιδράσεις αναλύτη-στατικής φάσης και κινητής-στατικής φάσης είναι στη χρωματογραφία κανονικής φάσης πολύ πιο έντονες σε σχέση με αυτές της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης, γεγονός που σημαίνει ότι οι δυνατότητες ελέγχου της εκλεκτικότητας είναι αυξημένες.



Σχήμα 4.11. Σχηματική απεικόνιση των διπολικών αλληλεπιδράσεων και των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων των προσδιοριζόμενων συστατικών και της μη πολικής στατικής φάσης. [194]

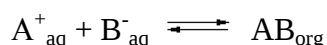
Η οργανολογία της κανονικής φάσης είναι ίδια με αυτή της αντίστροφης φάσης. Τα δύο είδη χρησιμοποιούνται στα ίδια επιστημονικά πεδία, διαφέρουν όμως ως προς την πολικότητα των αναλυτών τους, αφού η χρωματογραφία κανονικής φάσης προσδιορίζει πιο πολικούς αναλύτες σε σύγκριση με αυτούς της αντίστροφης φάσης. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό πολικών αναλυτών σε τρόφιμα, βιολογικά δείγματα και στην περιβαλλοντική ανάλυση. [190,193,198,199,200,201]



Σχήμα 4.12. Γραφική απεικόνιση υγρής χρωματογραφίας κανονικής και αντίστροφης φάσης. Οι κύκλοι παριστάνουν το είδος των διαχωριζόμενων ουσιών. [194]

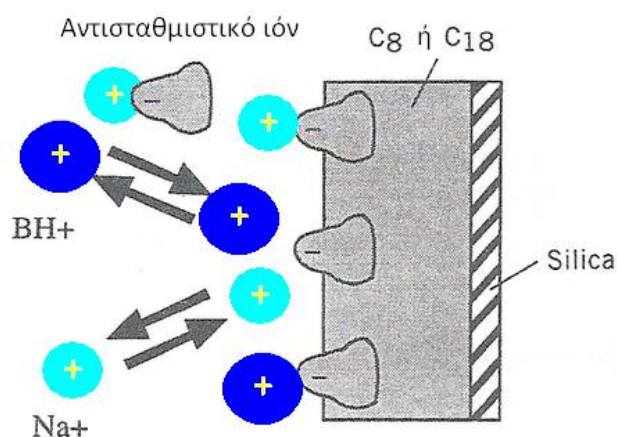
4.7 ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΖΕΥΓΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

Η χρωματογραφία ζευγών ιόντων ή συζευγμένων ιόντων (ion pair ή paired ion chromatography, IPC) αποτελεί παραλλαγή της χρωματογραφίας αντίστροφης φάσης. Συνήθως επιλέγεται όταν ο αναλύτης κατακρατείται ανεπαρκώς στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης λόγω αυξημένης πολικότητας. Για να ελαττωθεί η πολικότητα του αναλύτη προστίθεται στην κινητή φάση ένα αντισταθμιστικό ιόν (ion pair reagent), ώστε να δημιουργηθεί ένα ζεύγος ιόντων που θα παρουσιάζει ελαττωμένη πολικότητα και θα κατακρατείται περισσότερο από μία στήλη αντίστροφης φάσης.



όπου A^+_{aq} ο αναλύτης, B^-_{aq} το αντισταθμιστικό ιόν και AB_{org} το ζεύγος ιόντων.

Υπάρχουν δύο μηχανισμοί βάσει των οποίων προκύπτει η κατακράτηση σε αυτό το είδος χρωματογραφίας. Ο πρώτος περιλαμβάνει την προσρόφηση του αντισταθμιστικού ιόντος στη στατική φάση της στήλης και ακολούθως την κατακράτηση του αναλύτη με ένα μηχανισμό ο οποίος προσομοιάζει αυτόν της ιονανταλλαγής (σχήμα 4.14).



Σχήμα 4.13. Μηχανισμός κατακράτησης της χρωματογραφίας ζεύγους ιόντων μέσω προσρόφησης του αντισταθμιστικού ιόντος στη στατική φάση. Κατακράτηση μιας πρωτονιωμένης βάσης (BH^+), το Na^+ είναι το κατιόν της κινητής φάσης και το αντισταθμιστικό ιόν είναι το σουλφονικό εξάνιο. [193]

Ο δεύτερος μηχανισμός συνίσταται στη δημιουργία του ζεύγους ιόντων στη μάζα της κινητής φάσης και ακολούθως την κατακράτησή του από τη στατική φάση. Αυτός ο μηχανισμός διαφέρει από τον πρώτο στο γεγονός ότι το χρησιμοποιούμενο αντιδραστήριο δεν προσροφάται στη στατική φάση, δηλαδή το ζεύγος ιόντων σχηματίζεται κατά κύριο λόγο στη μάζα της κινητής φάσης και έπειτα κατακρατείται από τη χαμηλής πολικότητας στατική φάση. [193,202]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5ο ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

5.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η φασματομετρία μαζών είναι ίσως η τεχνική που μπορεί να βρει την μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, σε σχέση με τις άλλες αναλυτικές τεχνικές που είναι διαθέσιμες. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνική αυτή μας παρέχει πληροφορίες σχετικά με: (1) τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος, (2) τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων, (3) την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μιγμάτων, (4) τη δομή και σύσταση στερεών επιφανειών και (5) την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα. [192]

Η φασματομετρία μάζας βασίζεται στον ιοντισμό των μορίων και την παραγωγή μοριακών και/ή θυγατρικών ιόντων, τον διαχωρισμό των μαζών των ιόντων σύμφωνα με τον λόγο μάζας m προς το φορτίο τους z (mass to charge ratio m/z) με την βοήθεια κατάλληλης διάταξης και τέλος την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιονικού ρεύματος και την εύρεση της αντιστοιχίας των μαζών των λαμβανομένων ιόντων με την δομή της πρόδρομης ένωσης. Το φάσμα μαζών που λαμβάνεται από ένα φασματογράφο μαζών είναι η γραφική απεικόνιση της έντασης (αφθονίας) των ιόντων συναρτήσει του λόγου τους m/z . Οι κορυφές μαζών αντιστοιχούν σε συγκεκριμένο m/z ενώ το ύψος τους (ένταση-intensity ή αφθονία-abundance) εκφράζει το σχετικό ποσοστό του ιόντος σε σχέση με τα υπόλοιπα ιόντα που παράγονται κατά τον ιοντισμό. Η κορυφή με την μεγαλύτερη ένταση καλείται βασική κορυφή (base peak). Το φάσμα κανονικοποιείται σε σχέση με την ένταση της βασικής κορυφής η οποία παρουσιάζεται με ένταση 100% και συνεπώς καταγράφεται το φάσμα των σχετικών εντάσεων. Με τον ιοντισμό του μορίου και ανάλογα με την μέθοδο ιοντισμού παράγεται το μητρικό ή μοριακό ιόν και άλλα ιόντα – θραύσματα (fragment ions) τα οποία δημιουργούνται από την διάσπαση του μοριακού ιόντος με διάφορους μηχανισμούς που είναι χαρακτηριστικοί της αναλυόμενης ένωσης και επιτρέπουν την ταυτοποίηση της. Η έκταση με την οποία λαμβάνει χώρα η θραυσματοποίηση εξαρτάται από την ποσότητα της ενέργειας που προσδίδεται από την πηγή ιοντισμού στην ένωση και από την δομή της.

Τα πλεονεκτήματα της φασματομετρίας μαζών όπως η μεγάλη εκλεκτικότητα, η δυνατότητα χρήσης της ως ένας καθολικός ανιχνευτής (απόκριση σε όλες τις ενώσεις ανεξάρτητα της δομής τους), και η πολύ υψηλή ευαισθησία της σε συνδυασμό με την εξέλιξη της μικροηλεκτρονικής και των συστημάτων σύζευξης με αέρια και υγρή

χρωματογραφία (συνδυάζοντας έτσι την μεγάλη διαχωριστική ικανότητα των χρωματογραφικών μεθόδων με την σημαντική ικανότητα ταυτοποίησης και προσδιορισμού της ένωσης) την καθιστούν μία τεχνολογία αιχμής στην χημική ανάλυση με ικανότητα προσδιορισμού συγκεντρώσεων σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Συνεπώς εφαρμόζεται αναλυτικά σε μεγάλο εύρος ποιοτικών και ποσοτικών προσδιορισμών χημικών ενώσεων όλων των κατηγοριών. [192]

5.2 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΔΟΧΙΚΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Η σύζευξη της υγροχρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) συνδυάζει την ικανότητα της υγροχρωματογραφίας να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μίγματος και την ικανότητα της φασματομετρίας μαζών να τα ταυτοποιεί και να τα προσδιορίζει ποσοτικά. Κατά τον υγροχρωματογραφικό διαχωρισμό ενός μίγματος ουσιών με ανιχνευτές όπως ο ανιχνευτής απορρόφησης και φθορισμού, η ταυτοποίηση των κορυφών βασίζεται στη σύγκριση των χρόνων ανάλυσης των διαχωριζόμενων ουσιών με τους χρόνους ανάλυσης προτύπων αναφοράς, υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Όμως, λόγω της ύπαρξης μεγάλου αριθμού ουσιών με παρόμοιους χρόνους ανάλυσης, δεν είναι εφικτή η ταυτοποίηση μιας άγνωστης ουσίας με απόλυτη βεβαιότητα. Επιπρόσθετα, η υγροχρωματογραφία συχνά παρουσιάζει αδυναμία πλήρους διαχωρισμού των συστατικών πολύπλοκων δειγμάτων με αποτέλεσμα να αλληλεπικαλύπτονται οι κορυφές και ο ποσοτικός προσδιορισμός να καθίσταται δυσχερής.

Η φασματομετρία μαζών διαθέτει την ικανότητα ταυτοποίησης ουσιών με υψηλό βαθμό αξιοπιστίας, καθώς πολλές ενώσεις διαθέτουν μοναδικά φάσματα μαζών. Όμως εάν μία προσδιοριζόμενη ουσία αποτελεί συστατικό ενός μίγματος που εισάγεται στο φασματόμετρο μαζών, χωρίς να έχει προηγηθεί διαχωρισμός, το φάσμα μαζών θα περιέχει ιόντα και από τα υπόλοιπα συστατικά, με αποτέλεσμα η ταυτοποίηση να μην μπορεί να γίνει αξιόπιστα, ειδικά εάν η προσδιοριζόμενη ουσία περιέχεται σε χαμηλή συγκέντρωση στο μίγμα. Συνεπώς, ο συνδυασμός των δύο παραπάνω τεχνικών επιτρέπει την εισαγωγή διαχωρισμένων ουσιών μίγματος στο φασματόμετρο μαζών, προσφέροντας αξιόπιστη ταυτοποίηση, ακόμα και εάν ο διαχωρισμός δεν είναι πλήρης, διότι ουσίες με παρόμοιους χρόνους ανάλυσης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μαζών. [203,204]

Αρχικά, περίπου έως το 2000 ο διαχωρισμός των μειγμάτων και η απόλυτη ταυτοποίηση των συστατικών του γινόταν κυρίως με την τεχνική της αεριοχρωματογραφίας σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μαζών (GC – MS). Ωστόσο η χρήση αυτής της τεχνικής περιορίζεται από τρεις σημαντικούς παράγοντες:

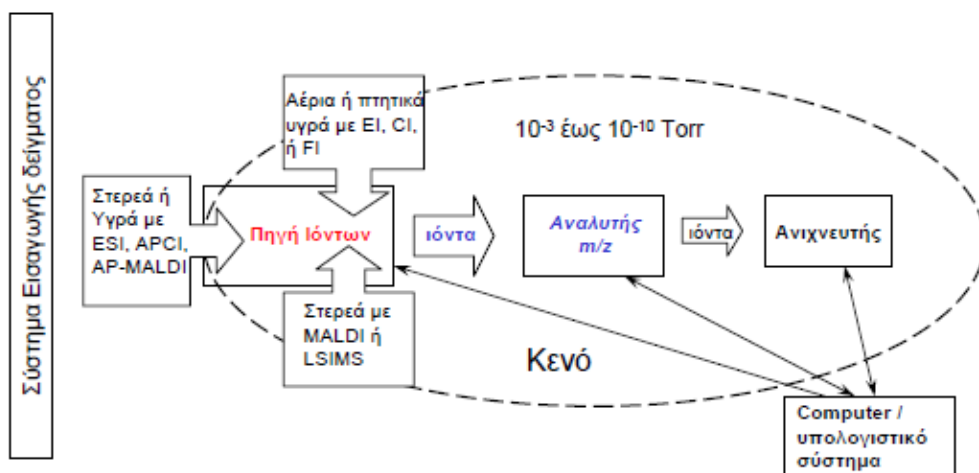
1. Την πτητικότητα δείγματος διότι δεν είναι όλες οι ουσίες αρκετά πτητικές για να εισαχθούν ή να εκλυσθούν από τη στήλη της αεριοχρωματογραφίας.
2. Τα υδατικά δείγματα πρέπει απαραίτητως να εκχυλισθούν πριν την εισαγωγή τους στο σύστημα, κάτι που αυξάνει σημαντικά το κόστος και το χρόνο ανάλυσης όπως και την πιθανότητα σφάλματος στον ποιοτικό διαχωρισμό των κορυφών.
3. Τη θερμική αποικοδόμηση των δειγμάτων στο φούρνο του GC ή στον εισαγωγέα δειγμάτων (injector). Όπως είναι γνωστό αναπτύσσονται αρκετά υψηλές θερμοκρασίες στην αεριοχρωματογραφία για να επιτευχθεί ο διαχωρισμός των μειγμάτων. Αυτό όμως έχει ως αποτέλεσμα, οι θερμοευαίσθητες ενώσεις να αποικοδομούνται και κατά συνέπεια να μην μπορούν να προσδιορισθούν. Τα προβλήματα αυτά επιλύθηκαν με την χρήση της υγροχρωματογραφίας σε σύζευξη με την φασματομετρία μαζών (LC-MS). [192,203,204]

5.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ

Ο φασματογράφος μαζών αποτελείται από τα ακόλουθα βασικά τμήματα:

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος
2. Πηγή ιόντων
3. Αναλυτής μαζών
4. Σύστημα ανίχνευσης των ιόντων
5. Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων

Επιπλέον, η πηγή ιοντισμού, ο αναλυτής μαζών και ο ανιχνευτής των ιόντων βρίσκονται υπό συνθήκες κενού που δημιουργείται από διαφραγματικές (10^{-3} - 10^{-4} Torr) και στροβιλομοριακές (έως 10^{-9} Torr) αντλίες κενού.



Σχήμα 5.1: Βασικά τμήματα οργανολογίας φασματομετρίας μαζών. [205]

Το εξεταζόμενο δείγμα εισέρχεται, από το στόμιο εισαγωγής, στην πηγή ιόντων όπου οι ενώσεις του δείγματος μετατρέπονται σε αεριώδη ιόντα μετά από βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, φωτόνια, ιόντα ή μόρια. Εναλλακτικά, ο ιοντισμός μπορεί να επιτευχθεί με θερμική ή ηλεκτρική ενέργεια. Από την πηγή ιόντων εξέρχεται ένα ρεύμα θετικών ή αρνητικών ιόντων σε αέρια κατάσταση, τα οποία επιταχύνονται προς τον αναλυτή μαζών. Ο διαχωρισμός των ιόντων στον αναλυτή μαζών βασίζεται στις διαφορετικές τιμές του λόγου μάζας προς φορτίο (m/z) των διαφορετικών σωματιδίων. Τελικά, τα διαχωριζόμενα ιόντα κατευθύνονται στον ανιχνευτή, ο οποίος συλλαμβάνει τα προσπίπτοντα ιόντα και ενισχύει το λαμβανόμενο ασθενές ηλεκτρικό σήμα που οδηγείται στο κεντρικό σύστημα ελέγχου και καταγραφής δεδομένων. [192]

5.3.1 Συστήματα εισαγωγής δείγματος

Το σύστημα εισαγωγής δείγματος χρησιμοποιείται για την εισαγωγή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος στην πηγή ιόντων με ελάχιστη απώλεια κενού. Ο σκοπός του συστήματος εισαγωγής δείγματος είναι η προετοιμασία του δείγματος για την εισαγωγή του στο χώρο ιοντισμού (πηγή ιόντων), κάτω από συνθήκες σταθερής ροής και σε αέρια πάντοτε κατάσταση. Η εξαέρωση δειγμάτων που περιέχουν ενώσεις με περιορισμένη πτητικότητα ή στερεών δειγμάτων, διευκολύνεται με θέρμανση σε συνθήκες υψηλού κενού. [192,197]

Στη συνδυασμένη τεχνική LC-MS, το υγρό που εκλούεται από τη χρωματογραφική στήλη οδηγείται στην πηγή ιόντων, αφού προηγουμένως απαλλαγεί

από τη μεγαλύτερη ποσότητα διαλύτη. Η εισαγωγή του δείγματος με υγρή χρωματογραφία απαιτεί την παρουσία ενός διασυνδετή (interface) της εξόδου της αναλυτικής στήλης με την πηγή ιόντων προκειμένου ο ιονισμός να γίνει στην υγρή ή στην αέρια φάση ανάλογα με τον τύπο της πηγής ιόντων. Οι πιο σημαντικές παράμετροι σε αυτά τα συστήματα εισαγωγής είναι η ροή της κινητής φάσης, η θερμοκρασία που εφαρμόζεται και το αέριο εκνέφωσης. [206]

5.3.2 Πηγές ιόντων

Ο σχηματισμός των ιόντων του αέριου αναλύτη αποτελεί καθοριστική διαδικασία για τους στόχους της μέτρησης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η μορφή του φάσματος μαζών μίας ουσίας εξαρτάται πάρα πολύ από την τεχνική παραγωγής ιόντων. Οι πηγές ιόντων χωρίζονται σε δύο πολύ μεγάλες κατηγορίες: *α.* τις πηγές αέριας φάσης (gas-phase sources) όπου το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται και *β.* τις πηγές εκρόφησης (desorption sources) όπου το δείγμα από στερεή ή υγρή κατάσταση μετατρέπεται απευθείας σε αεριώδη ιόντα. Βασικό πλεονέκτημα των πηγών εκρόφησης είναι το ότι μπορούν να εφαρμοσθούν σε μη πτητικά ή θερμικώς ασταθή δείγματα. Αναλυτικότερα οι πηγές ιόντων είναι οι εξής:

Πηγές Αέριας Φάσης

- Χημικός Ιοντισμός (Chemical Ionization, CI)
- Πρόσκρουσης Ηλεκτρονίων (Electron Impact, EI)
- Ιοντισμός Πεδίου (Field Ionization, FI)

Πηγές Εκρόφησης

- Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Ionization, API) με ηλεκτροψεκασμό (ElectroSpray Ionization, ESI)
- Ιοντισμός σε ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Ionization, API) με θερμοψεκασμό (ThermoSpray ionization, TS)
- Χημικός ιοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση (Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI)
- Φωτοϊοντισμός (PhotoIonization, PI) ή APPI (Atmospheric Pressure PhotoIonization)
- Ιοντισμός πεδίου εκρόφησης (Field Desorption, FD)

- Ιοντισμός εκρόφησης λέιζερ με τη βοήθεια υλικού μήτρας (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)
- Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (Fast Atom Bombardment, FAB)
- Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (Secondary Ion Mass Spectroscopy, SIMS)
- Ιοντισμός εκρόφησης πλάσματος (Plasma Desorption, PD)
- Ιοντισμός εκρόφησης σε επιφάνεια πυριτίου (Desorption Ionization on Silicon, DIOS)

Οι πηγές αέριας φάσης συνήθως περιορίζονται σε θερμικά σταθερές ενώσεις, με σημεία ζέσεως μικρότερα περίπου από 500°C. Η προϋπόθεση αυτή περιορίζει την εφαρμογή των πηγών αυτών σε ενώσεις με μοριακά βάρη μικρότερα από ~ 103 Da. Οι πηγές εκρόφησης δεν απαιτούν εξάτμιση των μορίων του αναλύτη και μπορούν να εφαρμοσθούν σε ενώσεις με μοριακά βάρη έως και 105 Da.

Οι πηγές ιόντων επίσης διακρίνονται σε μαλακές ή ήπιες (soft) και σκληρές (hard) ανάλογα με την ενέργεια ιοντισμού και την έκταση της διάσπασης του μορίου σε μικρότερα θραύσματα. Σκληρές καλούνται οι τεχνικές που χρησιμοποιείται υψηλή ενέργεια και έχουν ως αποτέλεσμα την θραυσματοποίηση της ένωσης κατά τον ιοντισμό ενώ μαλακές ή ήπιες καλούνται οι τεχνικές που επιτυγχάνουν τον ιοντισμό με μικρή ή αμελητέα θραύση. [192,207]

Πίνακας 5.1. Κύριες τεχνικές ιοντισμού και δυνατοί συνδυασμοί μεθόδων. [203,206]

Τεχνική Ιοντισμού	Κύρια Ιόντα	Αναλυτές Μαζών	Τάξεις ενώσεων
Ιοντισμός ηλεκτρονίων (EI)	M^+ Θυγατρικά ιόντα	B, Q, TRAP	Μη πολικές, κάποιες πολικές, Mr <1000 dalton
Χημικός Ιοντισμός (CI)	$[M+H]^+$ M^- , $[M-H]^-$, M^+	B, Q, TRAP	Μη πολικές, κάποιες πολικές, Mr <1000 dalton
Βομβαρδισμός με άτομα (FAB)	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	B, Q	Πολικές οργανικές, πρωτεΐνες, οργανομεταλλικές, Mr <10000 dalton
Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (TS)	$[M+H]^+$ $[M+NH_4]^+$	B, Q	Πολικές, κάποιες μη πολικές οργανικές, Mr <1000 dalton
MALDI	$[M+H]^+$ $[M-H]^-$	TOF	Πολικές, κάποιες μη πολικές, βιοπολυμερή, συνθετικά πολυμερή, Mr <10 ⁶ dalton
Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)	$[M+H]^+$ $[M+NH_4]^+$ $[M-H]^-$	B, Q, TOF, ORBITRAP, QTOF, TRAP, FTMS	Πολικές, κάποιες μη πολικές οργανικές, πρωτεΐνες, Mr <200000 dalton

B : Magnetic Sector

Q : Quadrupole

TRAP : Ion Trap

TOF : Time of Flight

FTMS : Fourier Transform Mass Spectrometer

ORBITRAP: Τροχιακός Αναλυτής Μαζών

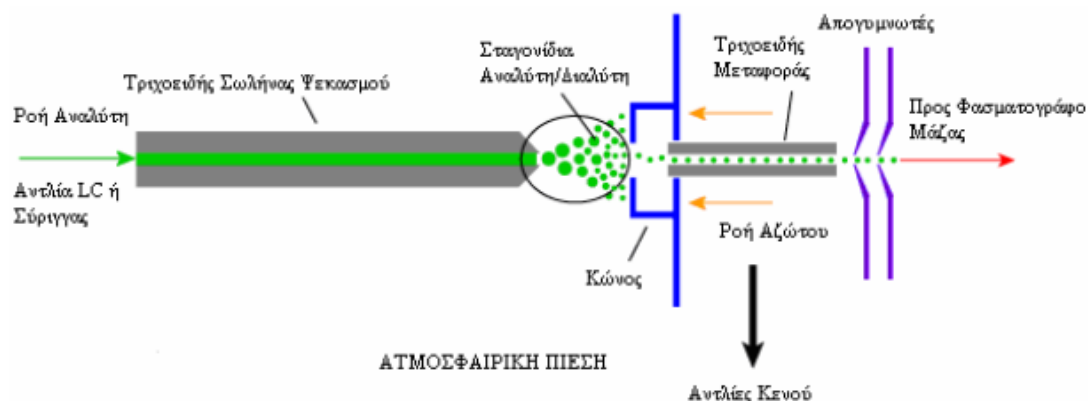
Αυτά τα μέρη (πηγές ιόντων, φασματογράφοι μάζας κλπ) μπορούν να συνδυαστούν σε διάφορες διατάξεις για να δημιουργήσουν φασματομέτρα μάζας με διαφορετικά χαρακτηριστικά γνωρίσματα από άποψη ταχύτητας, ανάλυσης, ευαισθησίας, ακρίβειας, μεγέθους μάζας και κόστους. Στην MS ανάλυση τα μόρια ιονίζονται στην αέρια φάση. Το ESI χρησιμοποιείται για να ιονίσει μόρια που είναι παρόντα στην υγρή φάση, ενώ με MALDI τα μόρια κρυσταλλώνονται με το υπόστρωμα (matrix) και ιονίζονται έπειτα με παλμούς λέιζερ. Κατόπιν τα ιόντα εισάγονται στο φασματογράφο μάζας, στον οποίο διαχωρίζονται σύμφωνα με το m/z τους. Οι φασματογράφοι μάζας που χρησιμοποιούνται συνηθέστερα είναι οι τετραπολικοί (Q), οι χρόνου πτήσης (TOF), παγίδας ιόντων (Ion Trap, IT) και το κύκλοτρο μετασχηματισμού κατά Fourier (FT-ICR-MS). Τα ακριβέστερα όργανα FT-ICR-MS (θεωρητικά ο καλύτερος ανιχνευτής μαζών) μπορούν να φτάσουν σε διαχωριστική ικανότητα >1000000 , δηλαδή το διαχωρισμό m/z 1000001 από 1000000. Από τον αναλυτή μάζας τα ιόντα εισάγονται στον ανιχνευτή, ο οποίος μετρά την ποσότητα κάθε ιόντος με συγκεκριμένο m/z . [192,205,208,209,210]

5.3.2.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ElectronSpray Ionization, ESI)

Η φασματομετρία μαζών με ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1984 και σήμερα αποτελεί μια από της σημαντικότερες τεχνικές για μετρήσεις βιομορίων όπως πολυπεπίδια, πρωτεΐνες και ολιγονουκλεοτίδια με μοριακά βάρη ≥ 100.000 Da. Λόγω της μεγάλης εφαρμογής της στον ιοντισμό βιομορίων ένας από τους ερευνητές που εξέλιξαν την τεχνική, ο John Fenn, βραβεύτηκε με Nobel Χημείας το 2002. Επίσης εφαρμόζεται στον χαρακτηρισμό ανόργανων ουσιών και συνθετικών πολυμερών. Η έλευση της πηγής ιοντισμού ESI επέκτεινε τις δυνατότητες του LC-MS. Στις μέρες μας είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιείται ως πηγή ιοντισμού στο LC-MS λόγω του ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε θερμο-ευαίσθητες και μεγάλου εύρους πολιτικότητας ουσίες, τόσο χαμηλών όσο και υψηλών μοριακών βαρών. Επίσης είναι συμβατή σε μεγάλο ποσοστό με τις συνθήκες που εφαρμόζονται στην HPLC. [192,203]

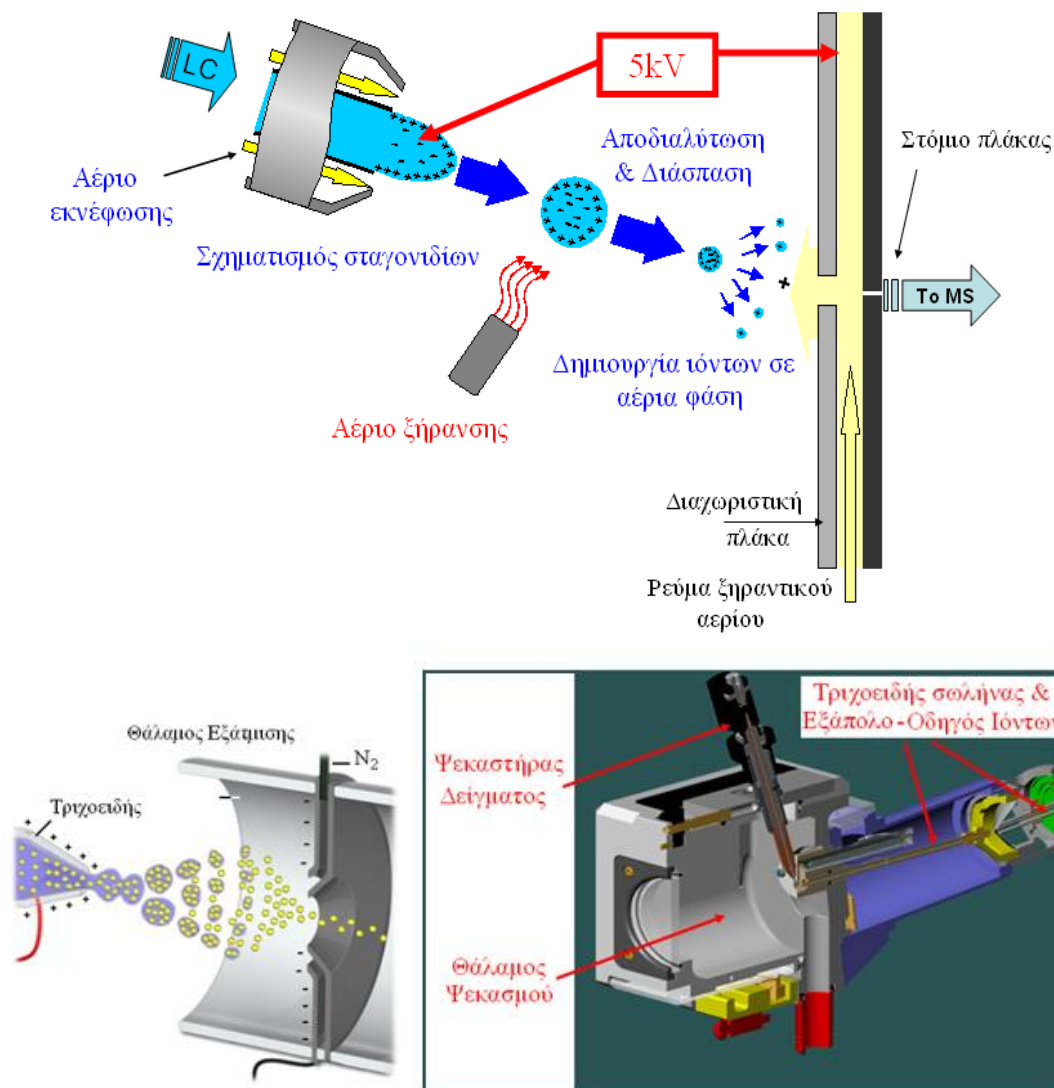
Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) είναι ήπιος τρόπος ιοντισμού που μετατρέπει τα ιόντα που υπάρχουν στην υγρή φάση σε ιόντα αέριας φάσεως. Η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να παράγει πολλαπλώς φορτισμένα ιόντα. Συνεπώς το

m/z ενώσεων μεγάλου μοριακού βάρους γίνεται μικρότερο με αποτέλεσμα να είναι μέσα στο εύρος μαζών που μπορεί να μετρήσει ο αναλυτής μαζών. [203,206]



Σχήμα 5.2. Σχηματική διάταξη ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο. [211]

Γενικά, η διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται στο ακροφύσιο του ESI βοηθάει στην αντιστάθμιση των διαφόρων ειδικών αγωγιμοτήτων που παρουσιάζουν οι κινητές φάσεις και σταθεροποιεί τη γραμμή βάσεως του χρωματογραφήματος κατά την βαθμιδωτή έκλυση. Το αέριο άζωτο είναι το αέριο εκνέφωσης που βοηθάει στην απομάκρυνση του εκάστοτε διαλύτη. Στον αισθητήρα του ESI εισάγονται δύο αέρια. Το αέριο εκνέφωσης (sheath gas) και το αέριο ξήρανσης ή βοηθητικό αέριο (auxillary gas). Το πρώτο διαρρέει το κεντρικό τμήμα του ακροφυσίου αλλά εξωτερικά από τη βελόνα. Το δείγμα έρχεται σε επαφή με το αέριο στο άκρο - τέρμα της μεταλλικής βελόνας. Το δεύτερο αέριο ρέει στον εξωτερικό δακτύλιο του ακροφυσίου σε πορείες πάντα παράλληλες προς το επίπεδό του. [206]

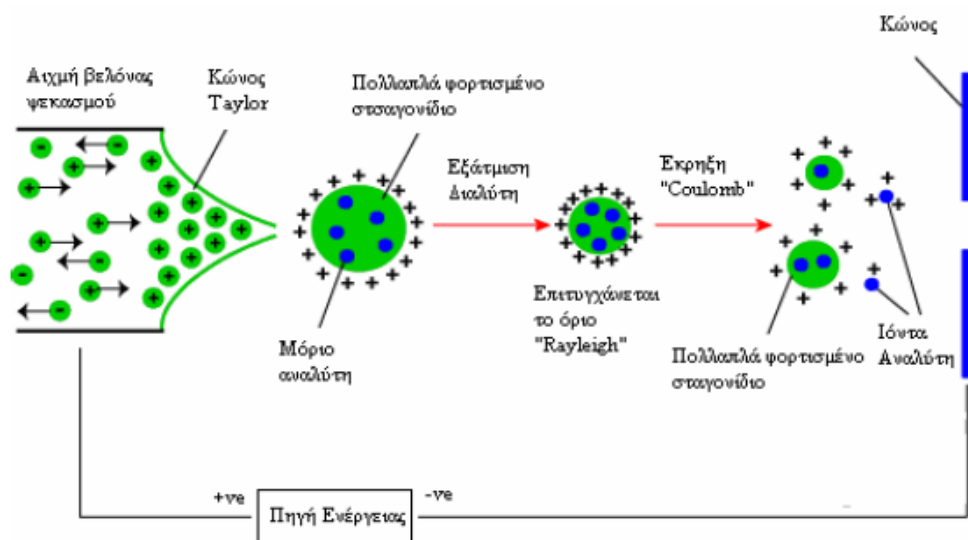


Σχήμα 5.3: Η πηγή ιοντισμού του ESI [212,213]

Ο ιοντισμός με ESI πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρική πίεση και θερμοκρασία. Το υγρό διάλυμα του περιέχει τους αναλύτες διέρχεται μέσα από μία ανοξεϊδωτή τριχοειδή βελόνα (ακροφύσιο) στην οποία εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό (3-5 kV). Το υγρό ψεκάζεται από την άκρη της βελόνας. Ο ψεκασμός υποβοηθείται από έναν εξωτερικό σωλήνα (εκνεφωτή) που διαβιβάζει αέριο, το αέριο εκνέφωσης. Η υψηλή τάση που εφαρμόζεται προκαλεί τα ιόντα όμοιας πολικότητας να έρθουν στην υγρή φάση σχηματίζοντας τον κώνο του Taylor. Έτσι, σχηματίζονται φορτισμένα σταγονίδια (αερόλυμα) που αποτελούνται από ιόντα και των δύο πολικότητων, αλλά κυρίως ιόντα της ίδια πολικότητας με αυτή της τάσης. Στη συνέχεια γίνεται απομάκρυνση του διαλύτη με την βοήθεια του αερίου ξήρανσης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να

προκύπτουν τα φορτισμένα μόρια του αναλύτη τα οποία εισέρχονται στην συνέχεια στον κώνο εισαγωγής του φασματομέτρου μαζών. Στο σχήμα 5.3 αναπαριστάται ο τρόπος σχηματισμού ιόντων με ηλεκτροψεκάσμο. [192,203]

Υπάρχουν δύο θεωρίες για το πως πραγματοποιείται η απομάκρυνση του διαλύτη από τα φορτισμένα σταγονίδια. Η πρωτότυπη ιδέα αναφέρεται συνήθως ως “μοντέλο υπολειμματικού φορτίου” (charge – residue model). Αυτό το μοντέλο υποστηρίζει ότι οι φορτισμένες σταγόνες που σχηματίζονται από την πνευματική εκνέφωση, δηλαδή από την πίεση να διέλθει το διάλυμα του αναλύτη από την άκρη της βελόνας με το δυναμικό, είναι δυνατόν να μετατραπεί σε εκνέφωμα από φορτισμένες σταγόνες ίδιας πολικότητας. Ο διαλύτης εξατμίζεται, μειώνοντας αισθητά το μέγεθος της σταγόνας και ταυτόχρονα αυξάνοντας τη συγκέντρωση φορτίου στην επιφάνειά της. Πλησιάζοντας στο όριο του Rayleigh, οι ηλεκτροστατικές απώσεις των φορτίων υπερνικούν την τάση συγκράτησής τους, με συνέπεια την έκρηξη της σταγόνας (διάσπαση Coulomb). Η έκρηξη αυτή δημιουργεί μια σειρά μικρότερων (~10% σε σχέση με την αρχική σταγόνα) και λιγότερο φορτισμένων σταγονιδίων. Οι διασπάσεις Coulomb (συρρίκνωση και έκρηξη σταγόνας) επαναλαμβάνονται μέχρις ότου σχηματιστούν “γυμνά” φορτισμένα ιόντα του αναλύτη στην αέρια φάση.



Σχήμα 5.4: Αναπαράσταση του σχηματισμού ιόντων με ESI. [211,214]

Εναλλακτική θεωρία είναι το “μοντέλο της εξάτμισης των ιόντων” (ion – evaporation model). Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, λόγω της εξάτμισης του διαλύτη τα σταγονίδια υφίστανται σχάση μέχρι του σημείου που οι απωστικές δυνάμεις των ιόντων στην επιφάνεια της σταγόνας αυξάνουν τόσο ώστε τα ιόντα να απελευθερώνονται στην αέρια φάση. Ο σχηματισμός του ιόντος στην αέρια φάση είναι ακόμη υπό μελέτη. Παρόλο που η θεωρία της εξάτμισης του ιόντος είναι περισσότερο αποδεκτή, ο μηχανισμός που σχετίζεται με το “μοντέλο υπολειμματικού φορτίου” χρησιμοποιείται περισσότερο. [192,203]

Τα ιόντα που παράγονται στην αέρια φάση συνήθως προϋπάρχουν στο διάλυμα και μέσω του διαχωρισμού των φορτίων στην επιφάνεια του διαλύματος καταλήγουν στην αέρια φάση. Όταν ο αναλύτης είναι φορτισμένος τότε μπορεί να αποτελεί μέρος

του φορτίου που διαχωρίζεται κατά τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού και κατά αυτόν τον τρόπο να φτάνει στην αέρια φάση.

Όταν ο αναλύτης είναι πολικός και δε φέρει κάποια βασική ή όξινη λειτουργική ομάδα, τότε μπορεί να φορτιστεί μέσω σχηματισμού παραγώγων με κάποιο άλλο ιόν. Στην ουσία, αυτός ο τρόπος ιοντισμού του αναλύτη είναι μια ειδική περίπτωση μεθόδου διαχωρισμού φορτίου, εφόσον αυτό που γίνεται είναι η φόρτιση του αναλύτη μέσω σχηματισμού παραγώγων στο διάλυμα και έπειτα η μεταφορά αυτών των παραγώγων στην αέρια φάση μέσω της διαδικασίας διαχωρισμού φορτίου. Στην περίπτωση που ο αναλύτης είναι πολικός και ουδέτερος ή ασθενής βάση και επιδιώκεται να φορτιστεί θετικά, τότε αυτό γίνεται με σχηματισμό παραγώγων του αναλύτη με θετικά ιόντα, όπως πρωτόνια, νάτριο ή κάλιο, τα οποία προέρχονται από την εισαγωγή μικρής ποσότητας των αντίστοιχων αλάτων στο διάλυμα (ή από προσμίξεις), παράγοντας ιόντα της μορφής, για παράδειγμα $[M+Na]^+$.

Επειδή κατά τον ηλεκτροψεκασμό εκτός από τα ιόντα του αναλύτη παράγεται και ένα πλήθος άλλων ειδών όπως συσσωματώματα μορίων, ουδέτερα μόρια του διαλύτη και του αναλύτη, είναι δυνατόν να συμβούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των ειδών, αφού ο ηλεκτροψεκασμός γίνεται σε ατμοσφαιρική πίεση, και να επηρεάσουν το σήμα του αναλύτη. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις είναι κατά κύριο λόγο αντιδράσεις μεταφοράς πρωτονίων μεταξύ των ειδών που καταλήγουν στην αέρια φάση. Έτσι μόρια τα οποία είναι πρωτονιωμένα -και συνεπώς φορτισμένα- στο διάλυμα, όταν εισέλθουν στην αέρια φάση μπορούν να παρέχουν πρωτόνια, δηλαδή το φορτίο τους, σε μόρια του αναλύτη ή του διαλύτη τα οποία δεν είναι φορτισμένα στο διάλυμα και έχουν μεγαλύτερη βασικότητα στην αέρια φάση. Κατά αυτόν τον τρόπο, ουδέτερα μόρια του αναλύτη που παράγονται από σταγονίδια μπορούν να φορτιστούν, αποσπώντας πρωτόνιο από κάποιο άλλο είδος, παραγόμενο από τη διαδικασία του ηλεκτροψεκασμού και το οποίο είναι φορτισμένο, φέροντας ως φορτίο πρωτόνιο. Για να συμβεί κάτι τέτοιο θα πρέπει να παρατηρηθεί μια αντιστροφή στη βασικότητα των ενώσεων στην αέρια φάση και αυτό μπορεί να γίνει διότι η βασικότητα των χημικών ενώσεων στην υγρή φάση και στην αέρια φάση δεν είναι η ίδια. Έτσι, ενώσεις με αυξημένη συγγένεια για πρωτόνια στην αέρια φάση μπορεί να έχουν χαμηλή βασικότητα στην υγρή φάση.

Αυτό το φαινόμενο, αφενός μπορεί να βοηθήσει τον ιοντισμό του αναλύτη όταν αυτός έχει μεγαλύτερη συγγένεια για πρωτόνια στην αέρια φάση από το διαλύτη,

αφετέρου να παρεμποδίσει τον ιοντισμό του όταν ο αναλύτης έχει μικρότερη συγγένεια για πρωτόνια από το διαλύτη και συνεπώς ο διαλύτης να αποσπά τα πρωτόνια από τον αναλύτη. Επίσης θα πρέπει να διευκρινισθεί ότι η αντίδραση μεταφοράς πρωτονίου μπορεί να λάβει χώρα όχι μόνο μεταξύ των μορίων διαλύτη-αναλύτη, αλλά και μεταξύ όλων των ειδών των συσσωματωμάτων που παράγονται με μόρια του αναλύτη και με μόρια του διαλύτη. [208,215,216]

Πλεονεκτήματα

1. Ο ιοντισμός γίνεται απευθείας από το διάλυμα με αποτέλεσμα να είναι εφικτή η μελέτη ιοντικών και θερμο-ευαίσθητων ενώσεων.
2. Είναι συμβατό με ροές κινητής φάσης από nl/min μέχρι και πάνω από 1 ml/min με την χρήση κατάλληλου εξοπλισμού (hardware). Συνεπώς, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο στήλες μικρής διατομής (microbore) όσο και συμβατικές στήλες.
3. Σε αντίθεση με της άλλες πηγές ιόντων, παράγει κυρίως πολλαπλά φορτισμένα ιόντα χωρίς όμως να διασπά το αρχικό μόριο. Με αυτό τον τρόπο επεκτείνεται αποτελεσματικά το εύρος μαζών του φασματογράφου και επιτρέπει την μελέτη μορίων με μοριακά βάρη που υπερβαίνουν το κανονικό εύρος μαζών.
4. Για τα μεγάλου μοριακού βάρους υλικά, το φάσμα με ιοντισμό ESI παρέχει από μόνο του πολλές πληροφορίες για τα ανεξάρτητα μοριακά βάρη που προσδιορίζονται με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ακρίβεια του.

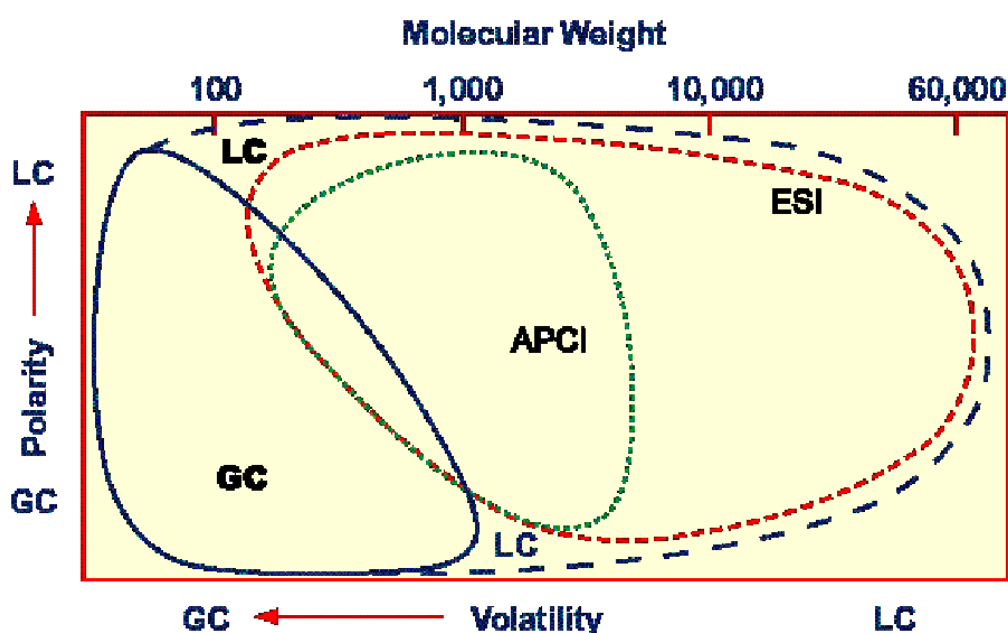
Μειονεκτήματα

1. Το ESI δεν μπορεί να ιοντίσει μη-πολικές ή μικρής πολικότητας ενώσεις
2. Το φάσμα μαζών που προκύπτει από έναν αναλύτη, εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες. Άρα, αν αλλαχθούν οι πειραματικές συνθήκες θα υπάρχει δραματική αλλαγή και στην εικόνα του φάσματος μαζών.
3. Παρατηρούνται φαινόμενα καταστολής σήματος (suppression effects) με αποτέλεσμα να δυσχεραίνει την απευθείας ανάλυση δειγμάτων. Αυτό μπορεί να έχει επιπτώσεις και στην περίπτωση συνεκλουόμενων ουσιών στο LC-MS.
4. Το ESI είναι ήπια πηγή ιοντισμού με αποτέλεσμα να παράγει ανέπαφα μοριακά ιόντα χωρίς να τα θραυσματοποιεί. Συνεπώς, δεν μπορούν να εξαχθούν δομικές

πληροφορίες για την ένωση. Για να γίνει κάτι τέτοιο εφικτό πρέπει να χρησιμοποιηθεί με MS/MS του οποίου το κόστος είναι υψηλό. [203,214]

5.3.2.2 ESI ή APCI

Όπως έχει προαναφερθεί οι τεχνικές ESI και APCI αλληλοσυμπληρώνονται. Το APCI χρησιμοποιείται για μικρής έως μέτριας πολικότητας αναλύτες, ενώ το ESI για μέτριας έως υψηλής πολικότητας αναλύτες. Κατά συνέπεια είναι πολλές ενώσεις για τις οποίες η καλύτερη τεχνική ιοντισμού δεν είναι προφανής και πρέπει να μελετηθούν περαιτέρω τα σχετικά τους προτερήματα. Στο σχήμα 5.5 φαίνεται το εύρος των αναλυτών που μπορούν να εφαρμοσθούν οι δύο πηγές. [203]



Σχήμα 5.5. Σύγκριση των μεθόδων ιοντισμού ESI και APCI ανάλογα με την πολικότητα και το μοριακό βάρος των μορίων που αναλύονται. [213]

5.3.2.3 Επίδραση Μήτρας (Matrix Effect)

Το φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος σχετίζεται με τη διαδικασία παραγωγής φορτισμένων σωματιδίων και γίνεται αντιληπτό μέσω της ενίσχυσης ή μείωσης του αναλυτικού σήματος λόγω των συνεκλούμενων συστατικών της μήτρας, τα οποία επηρεάζουν το βαθμό ιοντισμού των ενώσεων στόχων. Η επίδραση μήτρας εξαρτάται από τον τύπο του υποστρώματος, τη φύση και το χρόνο έκλουσης των ενώσεων, τη μέθοδο προκατεργασίας/καθαρισμού του δείγματος και τη τεχνική ιοντισμού των ενώσεων.

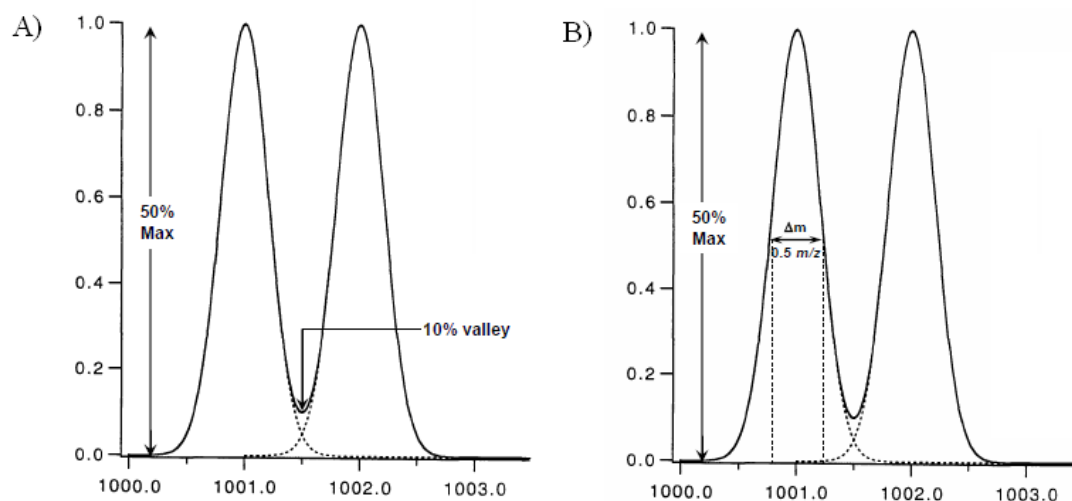
Έχει παρατηρηθεί ότι τα συστατικά τα οποία εκκλύονται αργά σε ένα χρωματογράφημα, παρουσιάζουν πιο έντονη επίδραση υποστρώματος από αυτά που εκκλύονται στην αρχή του χρωματογραφήματος. Ο συνηθέστερος τρόπος για να μειωθεί η έκταση του φαινομένου είναι η χρήση καμπυλών βαθμονόμησης προσαρμοσμένων στη μήτρα. Μέσω της σύγκρισης των καμπυλών βαθμονόμησης προσαρμοσμένων στη μήτρα με αυτές των καμπυλών αναφοράς, η επίδραση του υποστρώματος μπορεί να εκμηδενιστεί. Επίσης, ο έλεγχος της επίδρασης υποστρώματος μπορεί να γίνει με χρήση εσωτερικών προτύπων (κυρίως ισοτοπικών αναλόγων των ενώσεων στόχων. Όμως, εξαιτίας του μεγάλου κόστους και της περιορισμένης διαθεσιμότητας, η προσθήκη ισοτοπικών εσωτερικών προτύπων δεν ενδείκνυται. [203]

5.3.3 Αναλυτές μαζών

Τα ιόντα που δημιουργούνται στην πηγή ιόντων διαχωρίζονται σύμφωνα με το λόγο της μάζας τους (m) προς το φορτίο (z) m/z στον αναλυτή μαζών. Ο ιδανικός αναλυτής μαζών πρέπει να διαχωρίζει της μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους. Επιπλέον, πρέπει να επιτρέπει την διέλευση αρκετών ιόντων, ώστε να παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό ενός αναλυτή μαζών είναι η διαχωριστική ή διακριτική ικανότητα (Resolving power, R), δηλαδή η ικανότητά του να διαχωρίζει μάζες, και δίνεται από τη σχέση:

$$R = m / \Delta m \quad (4.1)$$

όπου Δm η διαφορά μαζών μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών (σε Da) και m η τιμή της μάζας της πρώτης κορυφής (ή η μέση τιμή της μάζας των δύο κορυφών). Δύο κορυφές ίσης έντασης θεωρείται ότι διαχωρίζονται, όταν η επικάλυψη τους δεν υπερβαίνει ένα δεδομένο κλάσμα του ύψους τους (συνήθως 10%). Για παράδειγμα, $R=1000$ σε μάζα 100.0 σημαίνει ότι το φασματομέτρο μπορεί να διαχωρίσει τη μάζα 100 από τη μάζα 100.1 ($\Delta m=0.1$). Διαφορετικά, η διαφορά μαζών (Δm) μπορεί να εκφραστεί ως το εύρος της κορυφής στο μισό του ύψους της κορυφής (Full Width at Half Maximum, FWHM), δηλαδή $FWHM = \Delta m$.



Σχήμα 5.6. Διαχωριστική ικανότητα στην Φασματομετρία Μαζών. Α) Δύο κορυφές (m/z) ίσης έντασης θεωρείται ότι διαχωρίζονται, όταν η επικάλυψη τους δεν υπερβαίνει το 10% του ύψους τους (συνήθως), έτσι $R = 1001/(1002-1001) = 1001$. Β) Αφού $FWHM = \Delta m$, $R = 1001/(2*0.5) = 1001$. [205]

Το αντίστροφο της διαχωριστικής ικανότητας ονομάζεται διακρισιμότητα (Resolution) του αναλύτη μαζών. Δηλαδή, ως διακρισιμότητα ορίζεται η διαφορά δύο γειτονικών τιμών ιόντων m/z ($m_2 - m_1$) προς την μάζα του πρώτου ιόντος (m_1) [δηλαδή $(m_2 - m_1)/m_1 = \Delta m/m_1$], εκφράζεται σε ppm και πολλές φορές αναφέρεται και ως ακρίβεια (accuracy). Για παράδειγμα αν έχουμε N_2^+ : 28.0061 και CO^+ : 27.9949, $\Delta m/m_1 = 0,0004$ ή 400 ppm. [192,205,210]

Ένα άλλο χαρακτηριστικό του αναλύτη μαζών είναι η ταχύτητα σάρωσης (scan rate) που αναφέρεται στην ταχύτητα με την οποία σαρώνεται ένα φάσμα μαζών. Είναι ιδιαίτερα σημαντική παράμετρος για φασματογράφους σε σύζευξη με χρωματογραφικές τεχνικές όπου η ταχύτητα σάρωσης πρέπει να είναι πολύ πιο γρήγορη από τον χρόνο έκλουσης μίας χρωματογραφικής κορυφής.

Τα φασματόμετρα μαζών διακρίνονται σε φασματόμετρα χαμηλής και υψηλής διαχωριστικής ικανότητας. Με τα πρώτα που έχουν διαχωριστική ικανότητα από 100 έως 1000, τα διάφορα ιόντα διακρίνονται με βάση την ονομαστική μάζα (nominal mass) που αντιστοιχεί στην πλησιέστερη ακέραιη τιμή προς τη μοριακή μάζα. Με ένα φασματόμετρο, δε διακρίνεται το CO από το N_2 , γιατί και τα δύο έχουν τον ίδιο αριθμό ακέραιων μονάδων μοριακής μάζας (28). Με τα φασματόμετρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας όμως ($R = 10^4 - 10^6$) μπορούν να διαχωριστούν ιόντα με ίδια ονομαστική

μάζα, αλλά με διαφορετικές τιμές ακριβούς μάζας (exact mass) που διαφέρουν στο τρίτο ή και στο τέταρτο δεκαδικό ψηφίο. Για παράδειγμα με φασματομέτρα υψηλής διαχωριστικής ικανότητας μπορούν να διακριθούν οι κορυφές, που αντιστοιχούν στα ιόντα CO^+ , N_2^+ , CH_2N^+ και C_2H_4^+ , με ονομαστική μάζα 28 και ακριβείς μάζες 27,995, 28,006, 28,019 και 28,031. Στο συγκεκριμένο παράδειγμα, η απαιτούμενη διαχωριστική ικανότητα είναι $R = 28/0,011 \approx 2500$. [197]

Οι συνηθέστεροι τύποι αναλυτών μαζών (όπως προαναφέρθηκαν) που έχουν αναπτυχθεί και εφαρμόζονται είναι:

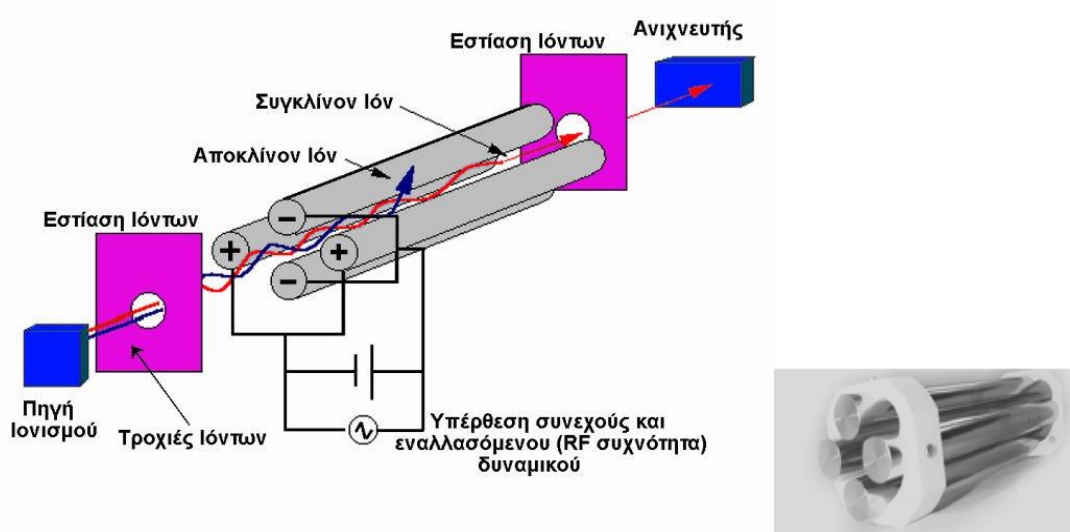
1. οι αναλυτές μαγνητικού τομέα (magnetic sector analyzers) μονής και διπλής εστίασης,
2. οι αναλυτές απλού τετραπόλου (single quadrupole, Q) ή τριπλού τετραπόλου (triple quadrupole, QQQ),
3. οι αναλυτές παγίδας ιόντων (ion trap),
4. οι αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης (time of flight, TOF) και
5. οι αναλυτές κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR). [192,210]

5.3.3.1 Αναλυτής Τετραπόλου (Quadrupole)

Η λειτουργία του ηλεκτροψεκασμού πραγματοποιείται σε ατμοσφαιρικές συνθήκες. Αντιθέτως, κάθε αναλυτής ιόντων, όπως είναι το σύστημα τριπλού τετραπόλου, λειτουργεί σε συνθήκες υψηλού κενού με συνέπεια να απαιτείται ένα σύστημα που να συνδέει αυτά τα τμήματα του οργάνου και να μεταφέρει αποδοτικά τα ιόντα που παράγονται από τη πηγή του ηλεκτροψεκασμού στο σύστημα τριπλού τετραπόλου όπου και αναλύονται. Οι τετραπολικοί αναλυτές είναι οι πιο διαδεδομένοι αναλυτές μαζών διότι παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα, όπως συμπαγή κατασκευή, μεγάλη ανθεκτικότητα, ταχεία σάρωση (<100 ms) και τέλος άμεση συμβατότητα με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές.

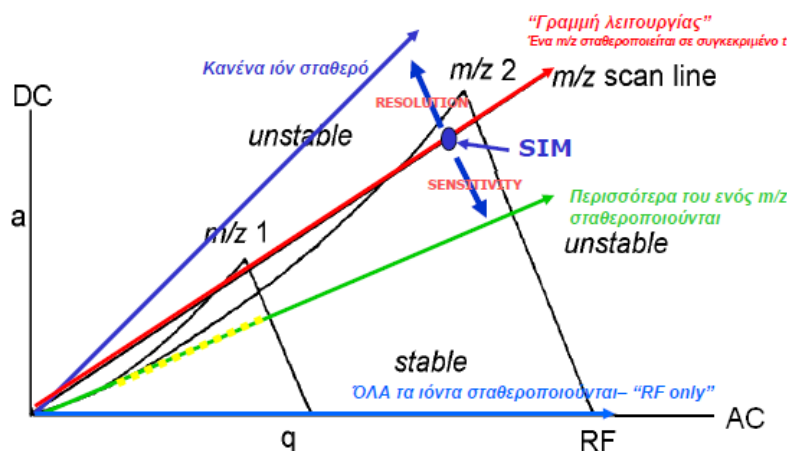
Όπως υποδηλώνεται από το όνομα του αποτελείται από τέσσερις παράλληλες ράβδους (ή ηλεκτρόδια με κυκλική ή υπερβολική διατομή) που είναι τοποθετημένες απέναντι η μία από την άλλη και είναι συνδεδεμένες κατά ζεύγη. Το ένα ζεύγος των ράβδων τροφοδοτείται με θετική τάση συνεχούς ρεύματος (+DC) και το άλλο με αρνητική (-DC) ενώ εφαρμόζεται και εναλλασσόμενη τάση ραδιοσυχνοτήτων (RF) με διαφορά φάσης 180° μεταξύ των δύο ζευγών. Έτσι δημιουργείται ένα ταλαντευόμενο

ηλεκτρικό πεδίο στο χώρο μεταξύ των ράβδων. Λόγω της εφαρμογής ενός χαμηλού δυναμικού (10-20 V) η δέσμη των ιόντων που εισέρχονται στο τετράπολο κινούνται κατά μήκος των αξόνων, με τροχιά σαν τρισδιάστατο κύμα. Ο διαχωρισμός των μαζών επιτυγχάνεται με τη μεταβολή της τάσης στις ράβδους (σάρωση 0 - ± 250 V DC, 0 - ± 1500 V RF) ενώ ο λόγος RF/DC διατηρείται σταθερός (~ 6). Σε δεδομένες συνθήκες σάρωσης μαζών μόνο ένα συγκεκριμένο ιόν m/z μπορεί να διανύσει όλη την διαδρομή του φίλτρου και να φτάσει στον ανιχνευτή. Όλα τα υπόλοιπα ιόντα θα ακολουθήσουν μία παλλόμενη διαδρομή με αποτέλεσμα να προσκρουσθούν στις ράβδους, να εκφορτιστούν και να μην ανιχνευθούν. [188,203]



Σχήμα 5.7. Σχηματική αναπαράσταση τετραπολικού αναλυτή μαζών. [217]

Η λειτουργία του τετραπόλου εξαρτάται από τη σχέση των δυναμικών DC και AC, η οποία δίνεται από το διάγραμμα σταθερότητας ιόντων (ion stability diagram) (σχήμα 5.8). Πρόκειται για ένα διάγραμμα του συνεχούς ρεύματος ως προς το εναλλασσόμενο. Στη γραμμή λειτουργίας (operating line), ένα m/z σταθεροποιείται σε συγκεκριμένο χρόνο. Όλα τα ιόντα πάνω από τη γραμμή λειτουργίας είναι ασταθή, ενώ κάτω από αυτή είναι όλα σταθερά. Αν ο λόγος DC/AC προσαρμοστεί έτσι ώστε να αυξηθεί η γραμμή λειτουργίας, η διακριτική ικανότητα θα αυξηθεί, αλλά η ευαισθησία θα μειωθεί, καθώς ολοένα και λιγότερα ιόντα θα έχουν σταθερή πορεία προς τον ανιχνευτή. Το δεύτερο σημείο αναφοράς είναι η “RF-only” λειτουργία ενός τετραπόλου. Στην RF λειτουργία μόνο, δεν υπάρχει πεδίο DC και ως εκ τούτου, η γραμμή λειτουργίας βρίσκεται σε οριζόντια θέση κατά μήκος του άξονα των



Σχήμα 5.8. Διάγραμμα σταθερότητας ιόντων στο τετράπολο (Ion Stability Diagram).
[205]

Η ένταση όλων των κορυφών στο φάσμα συνοψίζονται και δίνουν την ολική ένταση του σήματος και σχεδιάζεται έναντι του χρόνου δίνοντας το ολικό ρεύμα των ιόντων (Total Ion Current, TIC), το οποίο έχει την εμφάνιση ενός χρωματογραφήματος. Η ένταση του TIC ρυθμίζεται από την ταχύτητα σάρωσης του οργάνου. Όσο πιο γρήγορη είναι η σάρωση τόσο πιο πολλά δεδομένα λαμβάνονται και αυξάνεται η ένταση του TIC. Ωστόσο, από ένα κρίσιμο σημείο και μετά αυξάνεται ταυτόχρονα και ο θόρυβος. [206]

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών είναι ένας ιδανικός ανιχνευτής για τη χρωματογραφία εφόσον επιτρέπει γρήγορη σάρωση ακόμη και σε χαμηλά δυναμικά λαμβάνοντας υπόψη τις υψηλές πιέσεις που ασκούνται στο LC-MS. Το τετράπολο ανήκει στην κατηγορία των συσκευών με χαμηλή διακριτική ικανότητα (1 amu), δηλαδή μπορεί να μετρήσει το m/z ενός ιόντος στην κοντινότερη ακέραιη τιμή και να δώσει πληροφορίες για τη στοιχειακή του σύνθεση. [188,203]

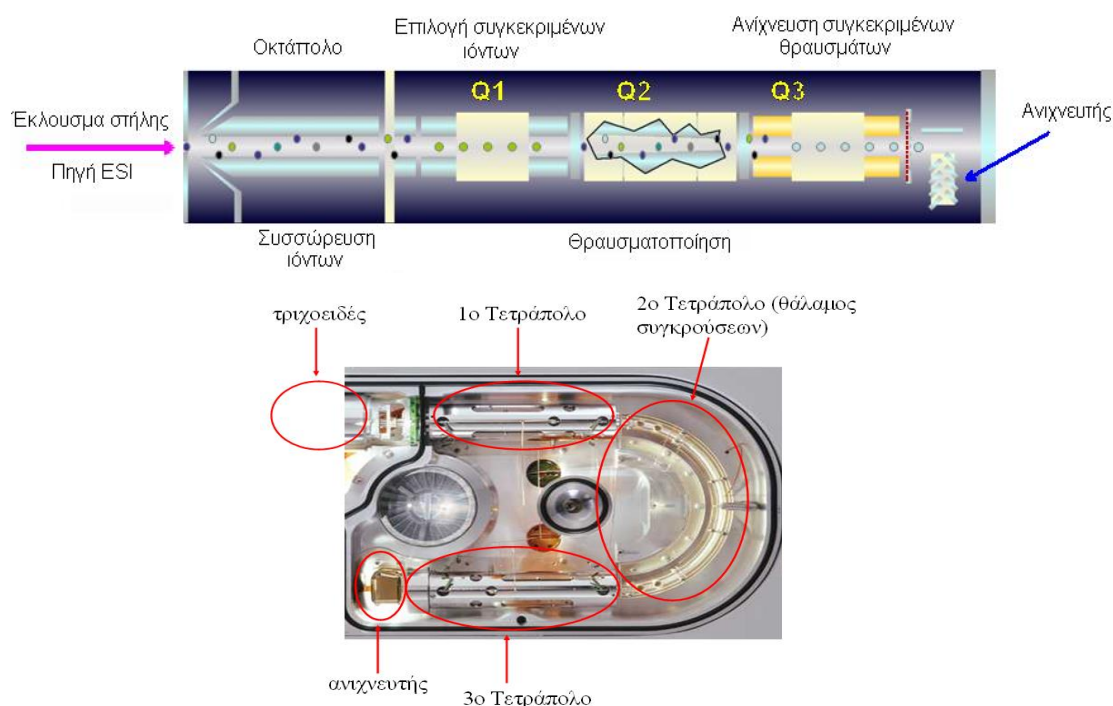
5.3.3.2 Συζευγμένη φασματομετρία μαζών (Tandem Mass Spectrometry, MS/MS)

Ο όρος συζευγμένη φασματομετρία μαζών - MS/MS, αναφέρεται στις τεχνικές κατά τις οποίες το ένα στάδιο φασματομετρίας μαζών (όχι απαραίτητα το πρώτο) εφαρμόζεται για την απομόνωση του ιόντος που μας ενδιαφέρει. Στο δεύτερο στάδιο διερευνάται η σχέση αυτού του ιόντος με άλλα, από τα οποία μπορεί να έχει παραχθεί ή

μπορεί να έχει παράγει λόγω διάσπασης. Τα δύο στάδια της φασματομετρίας μαζών συσχετίζονται με συγκεκριμένους τρόπους ώστε να δώσουν την επιθυμητή αναλυτική πληροφορία. Στην συνέχεια αναφέρεται η συστοιχία τριπλού τετραπόλου καθώς και οι τέσσερις πιο διαδεδομένες τεχνικές σάρωσης MS/MS. [188,203]

5.3.3.3 Τριπλό Τετράπολο (Triple Quadrupole)

Το τριπλό τετράπολο είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο όργανο MS/MS. Αποτελείται από τρία τετράπολα σε σειρά. Το δεύτερο από τα τρία τετράπολα δεν λειτουργεί σαν συσκευή διαχωρισμού μαζών αλλά σαν κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell), όπου γίνεται η θραυσματοποίηση των ιόντων που αναλύθηκαν από το πρώτο τετράπολο και η εστίαση τους για να εισέλθουν στο τρίτο τετράπολο. Από το τρίτο τετράπολο μόνο συγκεκριμένα από αυτά τα παραγόμενα ιόντα διέρχονται και φτάνουν στον ανιχνευτή. Όλα τα ζεύγη των ράβδων μπορούν να ελεγχθούν ως προς την εκπομπή τους έτσι ώστε να επιτρέπουν τη διέλευση καθορισμένων τιμών m/z . [188,203]



Σχήμα 5.9. Σχηματική αναπαράσταση και εικόνα φασματογράφου μαζών MS/MS τριπλό τετράπολο. [213]

Το σύστημα τριπλού τετραπόλου παρουσιάζει τα καλύτερα χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλους αναλυτές μάζας σε επίπεδο γραμμικότητας (3 τάξεις μεγέθους) και ακρίβειας (η επαναληψιμότητα των κορυφών είναι χαμηλότερη του 10 %). Η

δυνατότητα εναλλαγής της πολικότητας του ηλεκτροψεκασμού κατά τη διάρκεια του χρωματογραφήματος επιτρέπει τον προσδιορισμό συστατικών με διαφορετική χημική δομή. [218]

5.3.3.4 Τεχνικές σάρωσης

Το τριπλό τετράπολο είναι ένας συνδυασμός τριών τετραπόλων, όπως φαίνεται στο σχήμα 5.7. Τρία τετράπολα απαντώνται συχνότατα, για την εκμετάλλευση των θετικών στοιχείων του τετραπόλου (ταχεία σάρωση, δυνατότητα εφαρμογής φασματομετρίας μαζών σε σειρά/tandem MS). Όταν το τρίτο τετράπολο λειτουργεί ως απλός αναλυτής ρυθμίζεται, ώστε δύο τετράπολα να συνεισφέρουν μόνο στον εστιασμό της δέσμης των ιόντων (Q2 και Q3, ή Q1 και Q2, αντίστοιχα) και ο διαχωρισμός να γίνεται στο τρίτο τετράπολο (στον τύπο σάρωσης Q1MS, το Q1 χρησιμοποιείται ως ο αναλυτής μαζών, ενώ στον τύπο σάρωσης Q3MS, το Q3 χρησιμοποιείται ως ο αναλυτής μαζών).

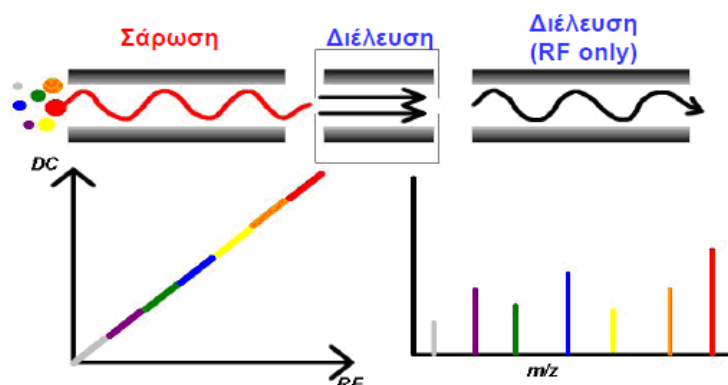
Η μεγάλη χρησιμότητα του συστήματος έγκειται στη δυνατότητα της διαδοχικής φασματομετρίας μαζών MS- MS. Αρχικά επιλέγεται στο πρώτο τετράπολο (Q1) μόνο ένα ιόν. Στη συνέχεια το μητρικό ιόν οδηγείται στο δεύτερο τετράπολο (Q2), όπου συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (αργό ή ήλιο) και διασπάται παράγοντας θυγατρικά ιόντα. Το δεύτερο τετράπολο (Q2) αποτελεί την κυψελίδα συγκρούσεων (collision cell) και λειτουργεί ως χώρος θραυσματοποίησης του μητρικού ιόντος. Ο διαχωρισμός και η μέτρηση των θυγατρικών ιόντων πραγματοποιείται στο τρίτο τετράπολο (Q3).

Η παρακολούθηση των ιόντων μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορους τύπους σάρωσης: την πλήρη σάρωση (Full Scan), την παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring-SIM), την παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring-SRM ή πολλαπλών αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring-MRM), τη σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning) και τη σάρωση μητρικού ιόντος (Precursor Ion Scanning). [203,214]

5.3.3.4.1 Φασματομετρία Μαζών Πλήρους Σάρωσης (Full Scan Mass Spectrometry)

Ο τύπος πλήρους σάρωσης παρέχει ένα φάσμα πλήρους σάρωσης για κάθε ουσία. Η πλήρης σάρωση βοηθάει τον προσδιορισμό της ταυτότητας μιας άγνωστης

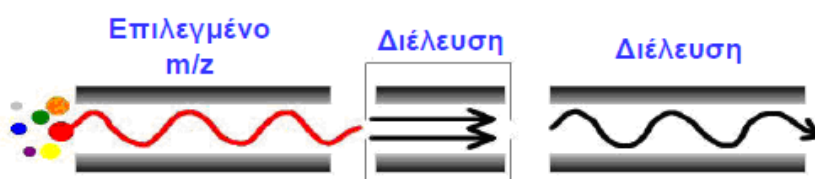
ουσίας (προσδιορισμό μοριακού βάρους). Μπορεί να δώσει περισσότερες πληροφορίες από άλλους τύπους σάρωσης, αλλά υστερεί σε ευαισθησία και δεν ευνοεί την ποσοτικοποίηση της ουσίας. [188]



Σχήμα 5.10. Σχηματική απεικόνιση Φασματομετρίας Μαζών Πλήρους Σάρωσης. [214]

5.3.3.4.2 Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring-SIM)

Στον τύπο SIM παρακολουθείται ένα συγκεκριμένο ιόν ή ομάδα ιόντων. Είναι αποτελεσματικός στην ανίχνευση μικρών ποσοτήτων (σε ίχνη) μιας γνωστής ουσίας σε πολύπλοκα μίγματα, όταν το φάσμα μαζών της ουσίας είναι γνωστό. Επειδή παρακολουθούνται συγκεκριμένα ιόντα, μπορούν να επιτευχθούν χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και μεγαλύτερες ταχύτητες σάρωσης από τον τύπο της πλήρους σάρωσης. Όμως ενδέχεται να μειωθεί η εκλεκτικότητα, διότι οποιαδήποτε ουσία δίνει το συγκεκριμένο ιόν θα εμφανιστεί ως η ουσία στόχος οδηγώντας σε ψευδώς θετικά αποτελέσματα. [188]



Σχήμα 5.11. Σχηματική απεικόνιση παρακολούθησης επιλεγμένου ιόντος. [214]

5.3.3.4.3 Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring-SRM) ή πολλαπλών αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring-MRM)

Στον τύπο SRM (ή MRM) παρακολουθείται μία συγκεκριμένη αντίδραση ή ομάδα αντιδράσεων, όπως η αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ιόντος. Πρόκειται για μια πολύ εκλεκτική μέθοδο κατά την οποία μπορούν να καταγραφούν οι χαρακτηριστικές αντιδράσεις θραυσματοποίησης των μορίων που παρατηρούνται. Πιο

συγκεκριμένα, στο πρώτο τετράπολο Q1 επιλέγεται να παρατηρεί ένα συγκεκριμένο μοριακό ιόν. Ακολούθως λαμβάνει χώρα θραυσματοποίηση του μοριακού ιόντος στη κυψελίδα πρόσκρουσης. Το τρίτο τετράπολο ρυθμίζεται έτσι ώστε να καταγράφει συγκεκριμένο προϊόν διάσπασης και έτσι καταγράφεται μια συγκεκριμένη αντίδραση. Υπάρχει η δυνατότητα καταγραφής ομάδας αντιδράσεων για κάθε αναλυόμενη ένωση, γι' αυτό και η μέθοδος αυτή λέγεται και μέθοδος σάρωσης πολλαπλών αντιδράσεων (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Η δυνατότητα επιλογής ζεύγους ιόντων σε κάθε ένωση που μελετάται, καθιστά τη μέθοδο αυτή ιδιαίτερα αποτελεσματική στην ανάλυση λόγω της εξαιρετικά μεγάλης ακρίβειάς της.

Στην περίπτωση της SRM (ή της MRM) παρακολουθείται συγκεκριμένος αριθμός μητρικών/θυγατρικών ιόντων, επιτρέποντας γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα. Οποιαδήποτε παρεμποδίζουσα ουσία θα πρέπει να σχηματίζει όχι μόνο ένα μητρικό ιόν του ίδιου λόγου m/z με την ουσία στόχο, αλλά θα πρέπει να διασπαστεί και να σχηματίσει και τα ίδια θυγατρικά ιόντα. Επίσης το υπόβαθρο θορύβου είναι πολύ χαμηλό, άρα ένα συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε πολύ υψηλότερη ανιχνευσιμότητα, αυξάνοντας ιδιαίτερα την ευαισθησία της μεθόδου. [203,214]



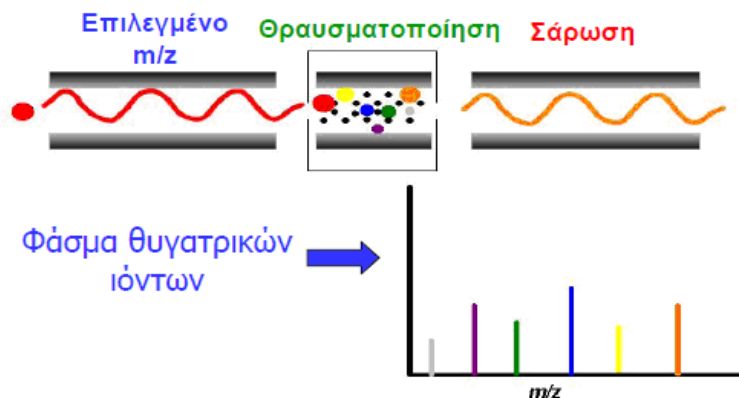
Σχήμα 5.12. Σχηματική απεικόνιση παρακολούθησης επιλεγμένης αντίδρασης ή πολλαπλών αντιδράσεων. [214]

Η λειτουργία παρακολούθησης πολλαπλών αντιδράσεων MRM (multiple-reaction monitoring) προσφέρει εξαιρετική εκλεκτικότητα στην ανάλυση υπολειμμάτων, ελαχιστοποιώντας την πιθανή παρεμπόδιση από ανεπιθύμητα συστατικά και επιτρέποντας με αυτόν τον τρόπο την ταυτοποίηση (σε πολλές περιπτώσεις ακόμα και ισοβαρών ειδών) συνήθως με τον έλεγχο δύο μεταπτώσεων του συστατικού-στόχου: μια για ποσοτική ανάλυση και μια δεύτερη για ταυτοποίηση. Κατά κύριο λόγο επιλέγονται τα ιόντα θραυσματοποίησης που βρίσκονται σε μεγαλύτερη αφθονία, τα οποία προκύπτουν κυρίως από πρόδρομα πρωτονιωμένα μόρια. Σε

ορισμένες περιπτώσεις επιλέγονται ιόντα υποκατάστασης (πχ $[M+NH_4]^+$) ως πρόδρομα μόρια, λόγω του μεγαλύτερου βαθμού ιοντισμού τους σε σχέση με τα πρωτονιωμένα ($[M+H]^+$). [215,216]

5.3.3.4.4 Σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning)

Η σάρωση θυγατρικών ιόντων πραγματοποιείται σε δύο στάδια ανάλυσης. Στο πρώτο στάδιο, ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z εισέρχονται στο τετράπολο Q1. Στη συνέχεια τα επιλεγμένα ιόντα m/z εισέρχονται στο τετράπολο Q2, όπου υπόκεινται σε διάσπαση σχηματίζοντας θυγατρικά ιόντα. Τα θυγατρικά ιόντα μπορούν να παραχθούν με αποσύνθεση μετασταθών ιόντων ή με αλληλεπιδράσεις με αέριο αργό. Τα σχηματιζόμενα ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο Q3 για το δεύτερο στάδιο ανάλυσης. Το φάσμα μαζών που προκύπτει δείχνει τα θυγατρικά ιόντα που παρήχθησαν από θραυσματοποίηση του επιλεγμένου μητρικού ιόντος. Ο τύπος αυτός σάρωσης παρέχει πληροφορίες για τη δομή μιας ουσίας και χρησιμοποιείται για την εξέταση πολύπλοκων οργανικών δειγμάτων (π.χ. βιολογικά δείγματα), υστερεί όμως λόγω της αργής σάρωσης με αποτέλεσμα να μην ευνοείται η εφαρμογή τους σε ποσοτικές αναλύσεις. [203]

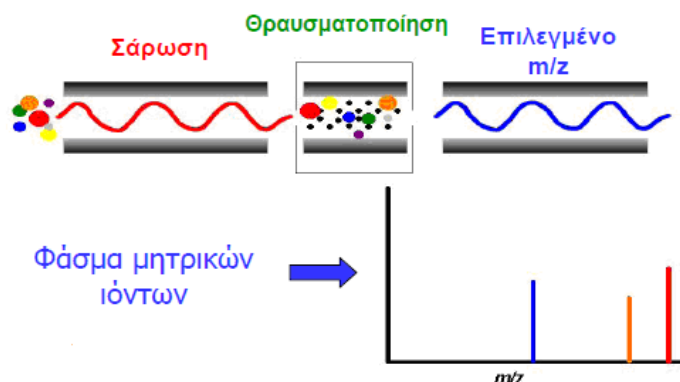


Σχήμα 5.13. Σχηματική απεικόνιση σάρωσης θυγατρικών ιόντων. [214]

5.3.3.4.5 Σάρωση μητρικού ιόντος (Precursor Ion Scanning)

Σε αυτό το είδος σάρωσης, ρυθμίζεται το τρίτο τετράπολο Q3 έτσι ώστε να εκπέμπει ιόντα με μία μόνο τιμή m/z , δηλαδή αυτή του παραγόμενου ιόντος (προϊόν θραύσματος) ενώ το πρώτο τετράπολο Q1 σαρώνει μία περιοχή m/z συγκεκριμένου εύρους ανοχής. Στο δεύτερο τετράπολο Q2 διέρχονται μόνο τα ιόντα που πέρασαν από το Q1 και λειτουργώντας σαν κυψελίδα συγκρούσεων δημιουργεί πολλαπλά θραύσματα. Ο ανιχνευτής δίνει σήμα μόνο όταν ιόντα εκπέμπονται και από τα δύο, Q1

και Q3. Με αυτόν τον τρόπο το ιόν που εκπέμπεται από το Q1 θραυσματοποιείται και δίνει τα επιθυμητά προϊόντα. Το φάσμα μαζών που προκύπτει δείχνει τα μητρικά ιόντα που διασπάστηκαν για την παραγωγή του επιλεγμένου θυγατρικού ιόντος. Ο τύπος αυτός σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σχετικά με τη δομή και τη θραυσματοποίηση μιας ουσίας. [203]



Σχήμα 5.14. Σχηματική απεικόνιση σάρωσης μητρικού ιόντος. [214]

5.3.4 Σύστημα ανίχνευσης των ιόντων

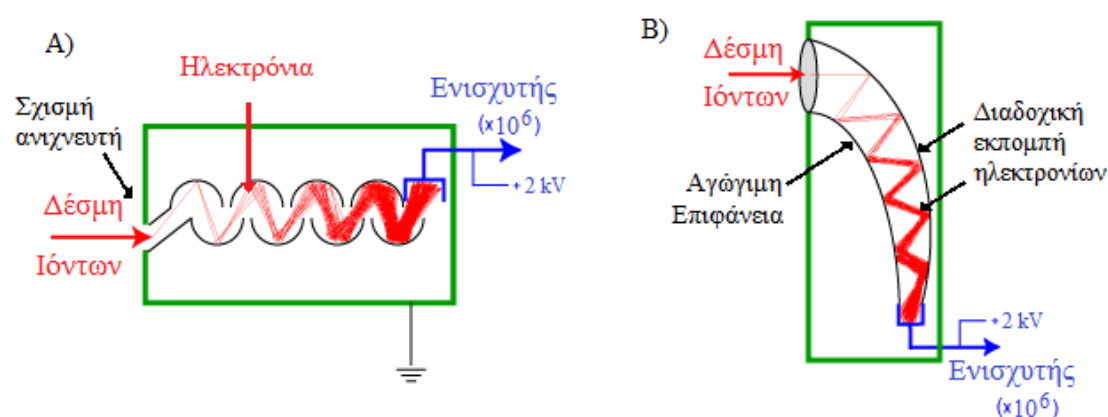
Ο ανιχνευτής παράγει στην έξοδό του ηλεκτρικό σήμα (συνήθως ηλεκτρικό ρεύμα) ανάλογο του αριθμού ιόντων και του φορτίου τους που δέχεται στην είσοδό του στη χρονική μονάδα. Τύποι ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στη φασματομετρία μαζών είναι:

5.3.4.1 Φαρανταϊκό κύπελλο (Faraday cup)

Αποτελείται από μία μεταλλική κοιλότητα που συνδέεται μέσω μιας αντίστασης υψηλής τιμής με τη γείωση του οργάνου. Τα ιόντα που προσπίπτουν στο κύπελλο, εκφορτίζονται και το ρεύμα που διέρχεται από την αντίσταση (ιοντικό ρεύμα), προκαλεί την ανάπτυξη ωμικής πτώσης τάσης στα άκρα της ή (για πολύ μικρά ρεύματα) οδηγείται σε κατάλληλο κύκλωμα μετατροπέα i/V . Η τάση ενισχύεται και καταγράφεται σε ποτενσιομετρικό καταγραφέα. Βασικά πλεονεκτήματα του φαρανταϊκού κυπέλλου είναι η απλή κατασκευή και η αξιοπιστία του, ενώ το κύριο μειονέκτημά του είναι η ανάγκη χρησιμοποίησης ενός ενισχυτή υψηλής εμπέδισης, γεγονός που περιορίζει την ταχύτητα με την οποία μπορεί να σαρωθεί ένα φάσμα μαζών (μετρώντας ρεύματα 10^{-15} A ή μεγαλύτερα). [197]

5.3.4.2 Ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής (Electron multiplier)

Είναι η πιο συχνά απαντώμενη διάταξη ανίχνευσης στο φασματομέτρο μαζών. Η κατασκευή ουσιαστικά αποτελείται από γυάλινο ή μεταλλικό σωλήνα με μεταλλική επίστρωση που παρουσιάζει χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα. Η διαφορά δυναμικού εφαρμόζεται στα δύο άκρα με τρόπο, ώστε να εμφανίζει γραμμική μεταβολή του δυναμικού κατά μήκος του σωλήνα. Η κάθοδος καλύπτεται από επιφάνεια Cu/Be από όπου με τη σύγκρουση ιόντος ακολουθεί εκπομπή ηλεκτρονίων. Ανάλογα με το σχεδιασμό του ανιχνευτή μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση σήματος έως και 10^7 . Στο σχήμα 5.15 δίνεται η βασική σχεδίαση ενός πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων (σχήμα 5.15 A) κι ενός πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων σχήματος τρομπέτας (σχήμα 5.15 B). Στο συγκεκριμένο ανιχνευτή εφαρμόζεται δυναμικό 1.8-2 kV κατά μήκος του. Ακολουθώντας την αρχική σύγκρουση των ιόντων η δέσμη των ηλεκτρονίων που έχει διαφύγει, προσπίπτει στην απέναντι εσωτερική πλευρά του σωλήνα κι εκπέμπει περισσότερα ηλεκτρόνια με κάθε κρούση. Τέτοιες διατάξεις επιτυγχάνουν πολλαπλασιασμό της δέσμης (άρα και της έντασης του σήματος) κατά 10^5 - 10^8 . [197,206]



Σχήμα 5.15. A) Σχηματικό διάγραμμα λειτουργίας πολλαπλασιαστή ηλεκτρονίων (Electron multiplier), B) Διάταξη πολλαπλασιαστή σχήματος τρομπέτας. [219]

5.3.5 Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων

Η ερμηνεία των φασμάτων διευκολύνεται σημαντικά με τη χρησιμοποίηση Η/Υ, ο οποίος εκτός από το σύστημα καταχώρησης και παρουσίασης δεδομένων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τα εξής:

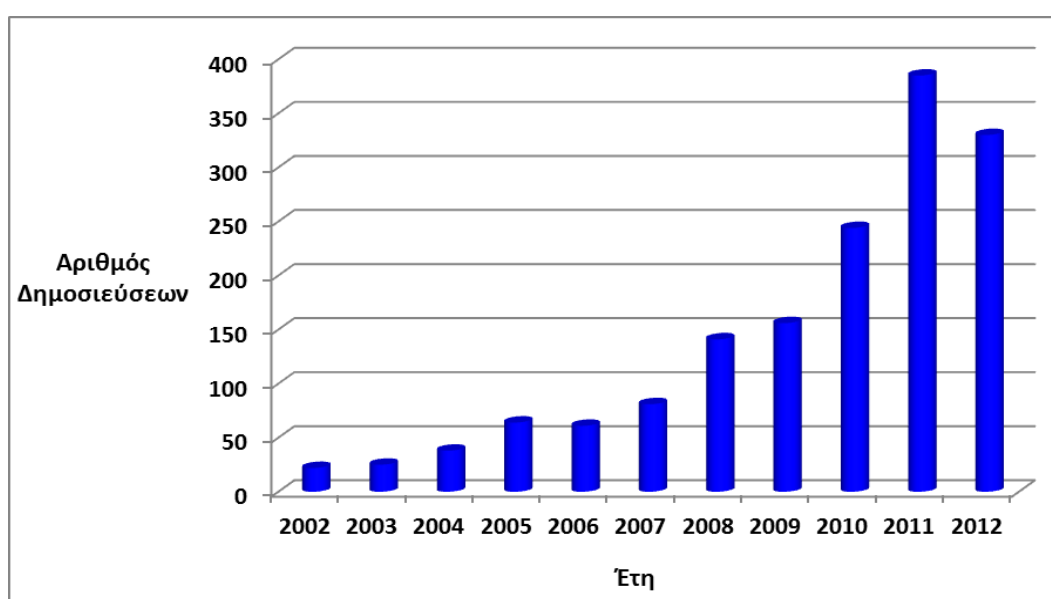
1. Ταχύτατη βαθμονόμηση του φασματομέτρου, ως προς τις ακριβείς τιμές.

2. Ταυτοποίηση των ιονικών θραυσμάτων από την ακριβή τιμή m/z ή από τις σχετικές τιμές των ισοτοπικών κορυφών.
3. Με εφαρμογή κατάλληλου λογισμικού, ο υπολογιστής μπορεί, από τα φασματικά δεδομένα, να κάνει προκαταρκτικές υποδείξεις στο χρήστη για την ταυτότητα της εξεταζόμενης ένωσης.
4. Ο χρήστης μπορεί να τροφοδοτήσει τον υπολογιστή με πολλά φάσματα μαζών μιας κατηγορίας ενώσεων, η οποία τον απασχολεί αναλυτικά. Ο υπολογιστής μπορεί να συγκρίνει το φάσμα μαζών με το αποθηκευμένο στη μνήμη του αρχείο φασμάτων και να αποφανθεί ως προς το αν το εξεταζόμενο φάσμα μπορεί να αποδοθεί σε μία ένωση ή σε μίγμα ενώσεων και ποιων.
5. Με τη βοήθεια του υπολογιστή μπορούν να επιλυθούν ταχύτατα συστήματα πολλών εξισώσεων με πολλούς αγνώστους που η επίλυσή τους απαιτείται για την ποσοτική ανάλυση μιγμάτων ενώσεων με τη φασματομετρία μαζών. [197]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6ο HILIC

6.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ – ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Πρόσφατα μετά την αυξημένη ανάγκη για συμπληρωματικές μεθόδους και την αυξανόμενη σημασία της ανάλυσης πολικών ενώσεων σε φαρμακευτικές, κλινικές και άλλες εφαρμογές, άρχισε να χρησιμοποιείται η τεχνική της Υδροχρωματογραφίας Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (Hydrophilic Interaction LIquid Chromatography, HILIC). Αυτό αποδεικνύεται από το μεγάλο και συνεχώς αυξανόμενο αριθμό δημοσιεύσεων (πάνω στην τεχνική HILIC) που έχουν καταγραφεί κατά την τελευταία δεκαετία (σχήμα 6.1). [220,221]

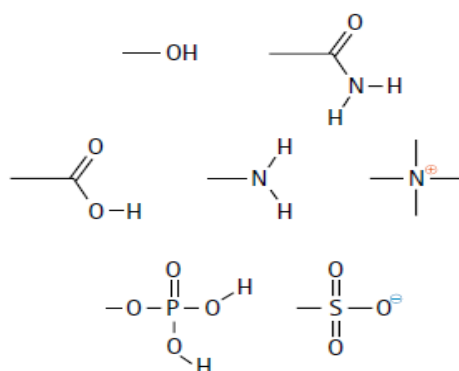


Σχήμα 6.1 Εξέλιξη του αριθμού των δημοσιεύσεων που αφορούν την τεχνική HILIC κατά την τελευταία δεκαετία, ανά έτος. Η πηγή των δεδομένων ήταν η βάση δεδομένων του Scopus. Η έρευνα έγινε χρησιμοποιώντας σαν λέξεις κλειδιά τις λέξεις HILIC OR hydrophilic interaction liquid chromatography (οι κύλινδροι με το μπλε χρώμα) σε Abstract, Abstract title και Keywords. Για το έτος 2012 τα δεδομένα αφορούν τον αριθμό των δημοσιεύσεων έως τις 30/10/2012. [222]

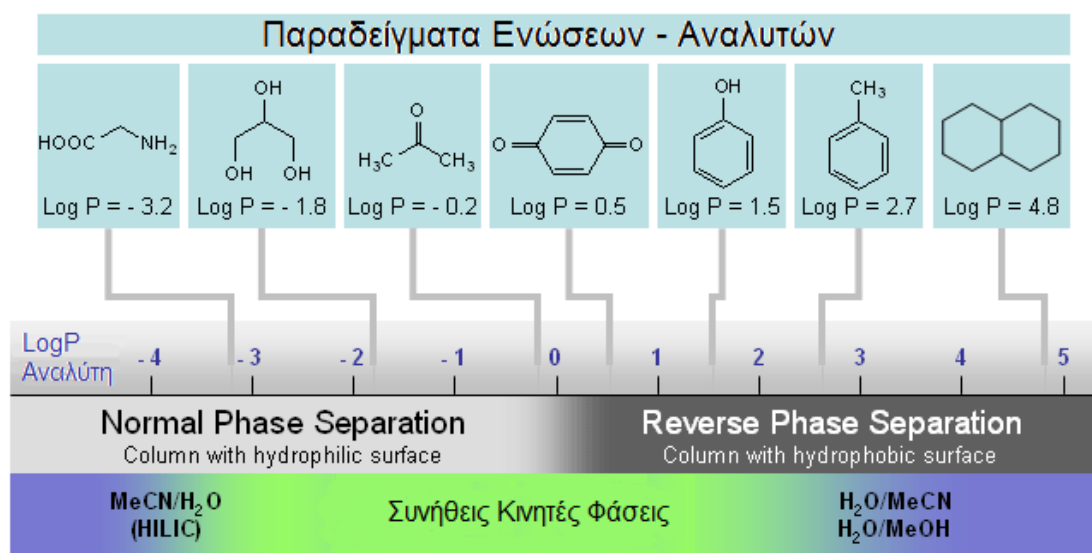
Η HILIC δεν είναι μία νέα τεχνική. Ο ορισμός έχει εισαχθεί από τον Alpert το 1990 για μία χρωματογραφική τεχνική η οποία θα μπορούσε να περιγραφεί και ως «αντίστροφη αντίστροφης φάσης υδροχρωματογραφία. Παρ' όλα αυτά η τεχνική αυτή είχε χρησιμοποιηθεί και σε άλλες εφαρμογές δεκαετίες πριν. [223]

Η πρώτη γενιά του HILIC διαχωρισμού άρχισε το 1975 με την ανάλυση υδατανθράκων σε αμινο στατική φάση, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μεθανόλη και νερό (75:25). Η ανάλυση των υδατανθράκων πριν γινόταν με χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Το μειονέκτημα της χρωματογραφία ιονανταλλαγής είναι οι υψηλές συγκεντρώσεις μη πτητικών ανόργανων αλάτων, οι οποίες καθιστούν δύσκολη τη χρήση φασματομετρίας μαζών. Η επόμενη γενιά χρησιμοποιούσε στατικές φάσεις διόλης και αμιδίου συνδεδεμένες σε πυριτία, κυρίως για το διαχωρισμό πρωτεϊνών. Πρόσφατα έχουν κατασκευαστεί πολικές στατικές φάσεις συνδεδεμένες σε πυριτία ή σε πολυμερές, όπως επίσης και μονολιθικές στήλες. [220,224]

Η Υγρή Χρωματογραφία Υδρόφιλων Αλληλεπιδράσεων (HILIC) είναι μία τεχνική κατάλληλη για τον διαχωρισμό πολικών και υδρόφιλων ενώσεων, αλλά και ενώσεων με ιονιζόμενες δραστικές ομάδες (σχήμα 6.2). Περιλαμβάνονται ενώσεις, όπως υδατάνθρακες, μεταβολίτες, οξέα και βάσεις, οργανικά και ανόργανα ιόντα, σύμπλοκα μετάλλων, αμινοξέα, πεπτίδια, πρωτεΐνες, εκχυλίσματα φυτών, τοξίνες, ολιγοσακχαρίτες και ουδέτεροι πολικοί αναλύτες. Αυτές οι ενώσεις χαρακτηρίζονται από μικρή ή αρνητική τιμή $\log P$ ($k_{ow} < 1$, αφού είναι πολικές) (σχήμα 6.3) κι έχουν μικρή κατακράτηση στις στήλες αντίστροφης φάσης. Ο $\log P$ είναι ο παράγοντας που αντιπροσωπεύει τις πολικές ιδιότητες των μορίων. Επιπλέον ορίζεται σαν ένας λογάριθμος του συντελεστή κατανομής (k_{ow}) της ένωσης σε σύστημα υγρής/υγρής εκχύλισης οκτανόλης/νερού. Όσο πιο υψηλή είναι η τιμή του $\log P$ μιας ένωσης, τόσο πιο υδρόφοβη είναι η ένωση. [224,225,226,227,228,229]



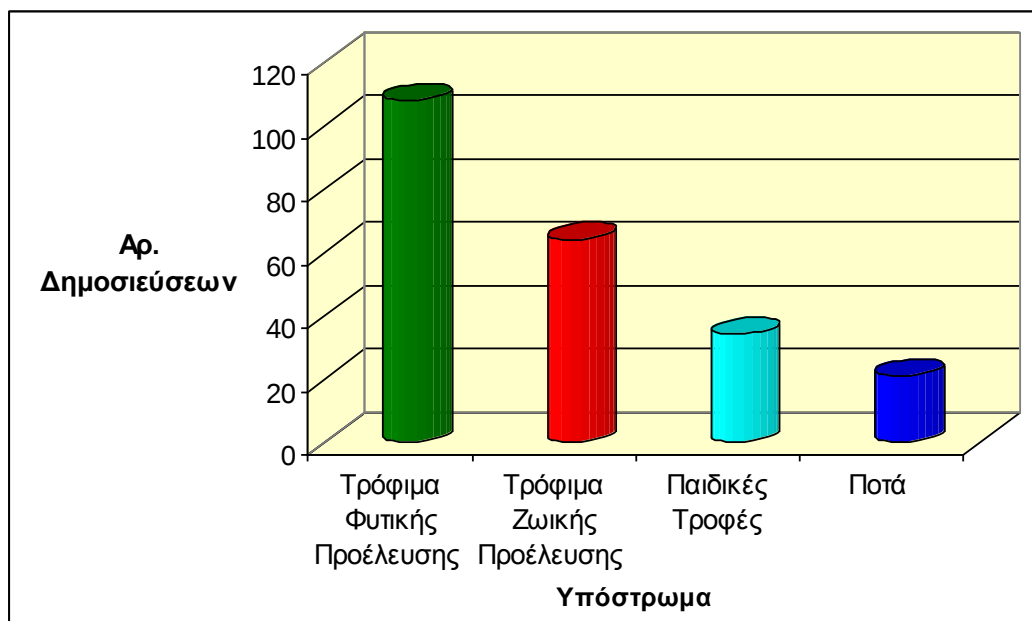
Σχήμα 6.2 Παραδείγματα υδρόφιλων δραστικών ομάδων. [230]



Σχήμα 6.3 Σχηματική απεικόνιση διαφόρων χρωματογραφικών τεχνικών και των εφαρμογών τους για τον διαχωρισμό μορίων διαφορετικής πολικότητας. [229]

6.2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Οι στήλες HILIC βρίσκουν μεγάλη ποικιλία εφαρμογών, όπως στην ανάλυση φαρμάκων [231,232], στην φαρμακοκινητική [233], στην ανάλυση κτηνιατρικών φαρμάκων [234,235,236,237,238], στην πρωτεομική [239], στη γενετική, στην ανάλυση φυτοπροστατευτικών προϊόντων και μεταβολιτών τους [240,241,242], στην ανάλυση προϊόντων μεταβολισμού των μυκήτων (π.χ. μυκοτοξίνες) [243], στην ανάλυση φυσικών προϊόντων (για ανακάλυψη νέων φαρμάκων) [221], στην ανάλυση βιομορίων [244], σε μελέτες μεταβολισμού [245] στην ανάλυση τροφίμων [224,227], σε τοξικολογικές μελέτες [245] και στην περιβαλλοντική ανάλυση [224,246]. Οι HILIC στατικές φάσεις μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) [196]. Ενδεικτικά στο σχήμα 6.4 παρουσιάζεται ο αριθμός των δημοσιεύσεων για την τεχνική HILIC με υποστρώματα τρόφιμα και ποτά.

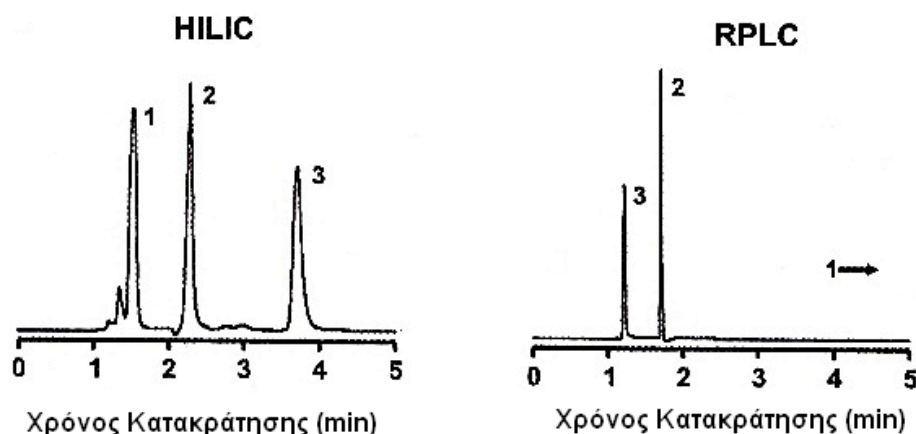


Σχήμα 6.4 Ο αριθμός των δημοσιεύσεων που αφορούν την τεχνική HILIC ανά υπόστρωμα τροφίμου-ποτών, για τα έτη 2009-30/4/2012. Η πηγή των δεδομένων ήταν η βάση δεδομένων του Science Direct. [222]

6.3 ΣΥΤΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HILIC ΜΕ ΤΗΝ RPLC ΚΑΙ ΤΗΝ NPLC

Παρά το γεγονός ότι η Αντίστροφης Φάσης Υγροχρωματογραφία (RPLC) είναι η συνολικά πιο εφαρμοσμένη τεχνική διαχωρισμού κι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μία ποικιλία εφαρμογών σε συνδυασμό με τους πιο συνηθισμένους ανιχνευτές, συγκεκριμένοι αναλύτες, ιδιαιτέρως οι πολικές και οι υδρόφιλες ενώσεις, δεν κατακρατούνται από την RPLC. Για μια μακρά περίοδο η πιο διαδεδομένη τεχνική που χρησιμοποιούνταν για το σκοπό αυτό (δηλαδή για το διαχωρισμό πολικών και υδρόφιλων ενώσεων) ήταν η Κανονικής Φάσης Υγροχρωματογραφία (NPLC), στην οποία χρησιμοποιούνταν μη υδατικές κινητές φάσεις (όχι και τόσο φιλικές προς το περιβάλλον). Ωστόσο κάτω από τέτοιες πειραματικές συνθήκες είναι δύσκολο να διαλυτοποιηθούν πολικές και υδρόφιλες ενώσεις. Στη θέση της NPLC, η HILIC είναι μία εναλλακτική λύση καθώς η σειρά έκλουσης των αναλυτών παραμένει αντίστροφη της RPLC, όπως συμβαίνει και στην NPLC (σχήμα 6.5). Με άλλα λόγια ουσίες που έχουν μικρή ή καθόλου κατακράτηση σε RPLC στήλες (και εκλούνται σε ή πολύ κοντά στον κενό (νεκρό) όγκο) γενικά παρουσιάζουν ισχυρή κατακράτηση σε στήλες HILIC. Αυτό συμβαίνει γιατί οι πολικές και υδρόφιλες ενώσεις έχουν μεγαλύτερη

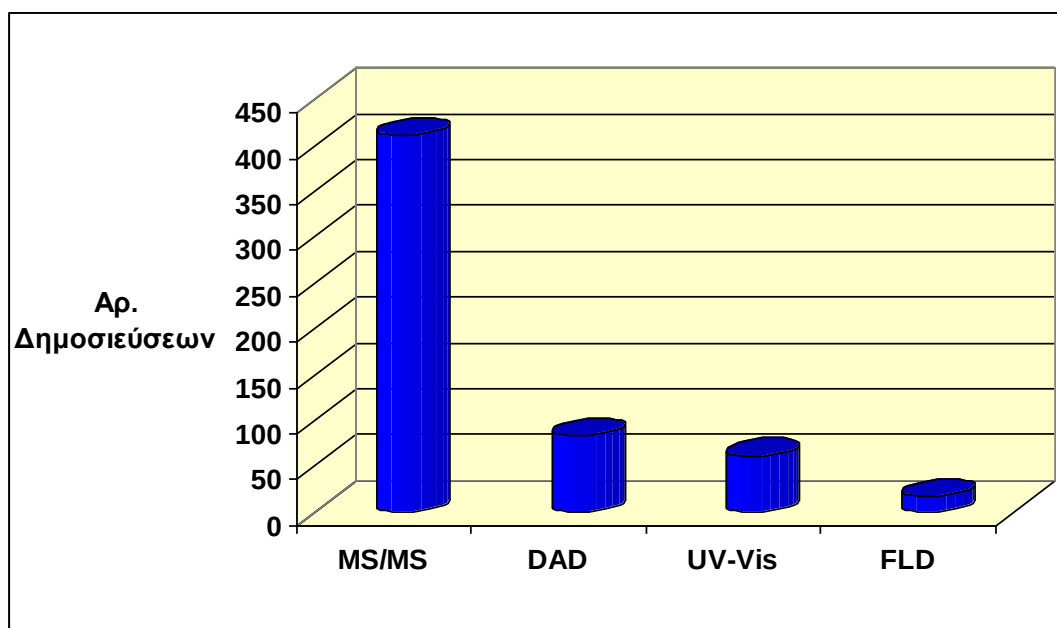
συγγένεια με τη στατική φάση, κι έτσι εκλούνται αργότερα από τις μη πολικές. Έτσι ο διαχωρισμός βασίζεται κυρίως στην πολικότητα των ουσιών. [196,225,247]



Σχήμα 6.5 Διαχωρισμός πεπτιδίων υπό HILIC και RPLC συνθήκες. Κινητές Φάσεις: HILIC: 60:40 Ακετονιτρίλιο/10 mM Οξικού αμμωνίου και RPLC: 5:95 Ακετονιτρίλιο/10 mM Οξικού αμμωνίου. Πεπτίδια: (1)Phe-Gly-Gly-Phe, (2)Leu-Gly-Gly, (3)Gly -Gly-Gly. [196]

Σύμφωνα με τα παραπάνω η τεχνική HILIC έχει πολλές ομοιότητες με την παραδοσιακή NPLC, αλλά με τη σημαντική διαφορά ότι η HILIC αφορά ημι-υδατικές κινητές φάσεις. Επομένως σε ότι αφορά στη διαλυτότητα του αναλύτη στην κινητή φάση και στη συμβατότητα της μήτρας, η HILIC υπερτερεί, καθώς οι συνθέσεις που χρησιμοποιούνται στην κινητή φάση είναι ανάλογες με εκείνες στους διαχωρισμούς με την RPLC). Τα τυπικά διαλύματα έκλουσης της HILIC αποτελούνται από 40-95% ακετονιτρίλιο σε νερό ή ένα πτητικό ρυθμιστικό διάλυμα. Επομένως η HILIC είναι μία τεχνική πολύ φιλική ως προς την φασματομετρία μαζών (Mass Spectrometry). Όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.6, η τεχνική HILIC συνδυάζεται κυρίως με την φασματομετρία μαζών.

Αλλάζοντας δε από RPLC σε HILIC, συχνά παρατηρείται μια πολλαπλασιαστική αύξηση της ευαισθησίας (από 10 έως 100 φορές) για υδρόφιλους αναλύτες. Αυτό συμβαίνει γιατί το ακετονιτρίλιο (οργανικός διαλύτης) εξαναγκάζει τον αναλύτη να χωριστεί από το διάλυμα έκλουσης μέσα στην υγρή στατική φάση. Επίσης αντιδραστήρια ιοντικού ζεύγους αποφεύγονται εντελώς, πράγμα ιδιαίτερος θετικό για παρασκευαστική χρωματογραφία. [196,221,225,246,248]



Σχήμα 6.6 Ο αριθμός των δημοσιεύσεων που αφορούν την τεχνική HILIC (με υπόστρωμα τρόφιμα) ανά τεχνική ανίχνευσης, για τα έτη 2009-30/4/2012. Η πηγή των δεδομένων ήταν η βάση δεδομένων του Science Direct. [222]

Ένα σύστημα διαχωρισμού HILIC είναι κατά βάση το ίδιο οργανολογικά με τα συστήματα RPLC. Οι στήλες HILIC περιέχουν μία στατική φάση η οποία είναι υδρόφιλη κι επίσης πολύ συχνά φορτισμένη, τουλάχιστον σε κάποια περιοχή της κλίμακας του pH. Οι ενώσεις που διαχωρίζονται στη στήλη αλληλεπιδρούν με τη στατική φάση και γενικά όσο πιο υδρόφιλη είναι μία ένωση τόσο πιο δυνατά κατακρατείται. Αντίθετα με τις περισσότερες χρωματογραφικές τεχνικές, μέρος της κινητής φάσης είναι ένα αναπόσπαστο τμήμα της στατικής φάσης (η υδατική στιβάδα που δημιουργείται πάνω στη στατική φάση). Για το λόγο αυτό είναι κρίσιμο το να κρατείται η συγκέντρωση του νερού στην κινητή φάση εντός συγκεκριμένων ορίων. Τυπικά το κλάσμα του νερού θα πρέπει να είναι ~ 3-60%. [196,246,249]

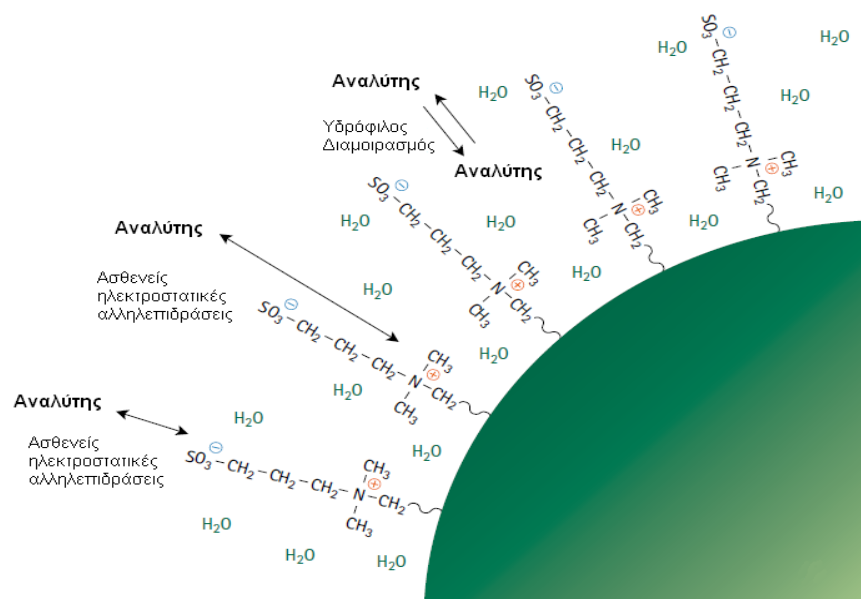
6.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ ΤΗΣ HILIC

Ο μηχανισμός της τεχνικής HILIC συνήθως αλλάζει ανάλογα με τη σύσταση της κινητής φάσης, τη φύση της στατικής φάσης και τη φύση των αναλυτών. Κατά τις συνθήκες του HILIC διαχωρισμού, μία στιβάδα εμπλουτισμένη με νερό (από την κινητή φάση) εγκαθίσταται μέσα στη στατική φάση (όπως προαναφέρθηκε), έτσι δημιουργείται ένα υγρό-υγρό σύστημα. Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται μέσω του

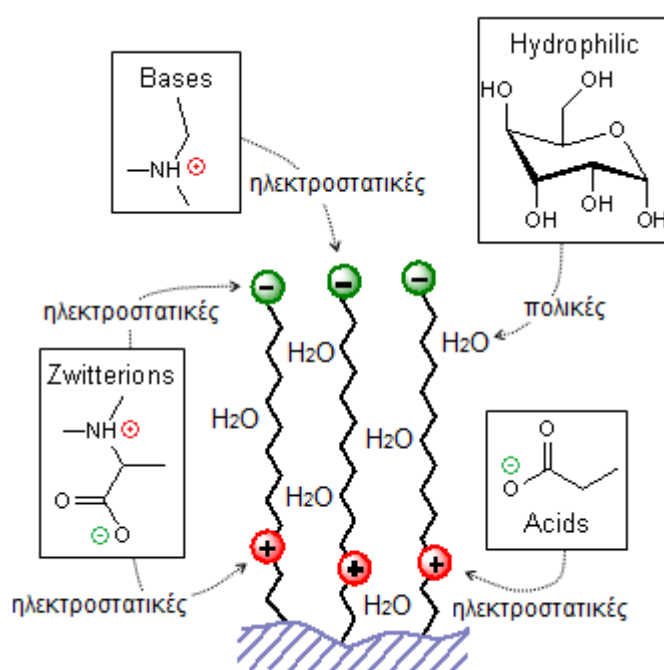
«χωρισμού» των αναλυτών από το διάλυμα έκλουσης (κινητή φάση) μέσα σε αυτό το υδρόφιλο περιβάλλον (σχήμα 6.7), δηλαδή ο αναλύτης κατανέμεται (διαμοιράζεται) μεταξύ της στατικής φάσης (όπου υπάρχει νερό) και της κινητής φάσης. Οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου είναι επομένως οι κυρίαρχοι μηχανισμοί κατακράτησης. Έτσι η πρωταρχική (βασική) λειτουργία των στατικών φάσεων της τεχνικής HILIC είναι να δεσμεύουν νερό στην επιφάνεια. Γι' αυτό το λόγο και οι δύο: οι δεσμοί υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις διπόλου-διπόλου, είναι παράγοντες που επηρεάζουν την κατακράτηση. Η πρωταρχική λειτουργία των HILIC στατικών φάσεων επομένως είναι το να δεσμεύσουν το νερό. Ωστόσο, ακόμη και με οποιαδήποτε από τις φορτισμένες HILIC στατικές φάσεις διαθέσιμη, η κατακράτηση και πάλι θα επηρεαστεί από ηλεκτροστατικές (ιοντικές) αλληλεπιδράσεις, όπως φαίνεται και στο σχήμα 6.7 για τη στατική φάση διπολικού ιόντος. [196,224,226,227]

Συνολικά ο μηχανισμός της HILIC περιλαμβάνει τις εξής αλληλεπιδράσεις:

- κατανομή του αναλύτη μεταξύ της οργανικής φάσης και της στιβάδας νερού, η οποία είναι ακινητοποιημένη στη στατική φάση,
- δεσμοί υδρογόνου μεταξύ των αναλυτών και της στατικής φάσης, αλλά και μεταξύ των αναλυτών και της κινητής φάσης, οι οποίοι εξαρτώνται από τη βασικότητα ή την οξύτητα των αναλυτών,
- δυνάμεις διπόλου-διπόλου, οι οποίες εξαρτώνται από τη διπολική ροπή και την πολικότητα των μορίων και
- ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ φορτισμένων μορίων και της φορτισμένης στατικής φάσης (σχήμα 6.8). [221,233,250]



Σχήμα 6.7 Σχηματική απεικόνιση των διαδικασιών κατακράτησης στην τεχνική HILIC: Υδρόφιλος διαμοιρασμός (κατανομή) και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είτε με θετικά ή αρνητικά φορτία. [230]



Σχήμα 6.8 Σχηματική απεικόνιση των διαφόρων τύπων αλληλεπιδράσεων στην τεχνική HILIC (zwitterion: διπολικό ιόν, hydrophilic: υδρόφιλες ενώσεις). [251]

6.5 ΔΕΥΤΕΡΕΥΟΥΣΕΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ

Αν και περιορισμένης σημασίας για τον πρωταρχικό μηχανισμό κατακράτησης της HILIC, οι φορτισμένες στατικές φάσεις έχουν μία δεύτερη, πολύ σημαντική

διάσταση εκλεκτικότητας εξαιτίας των ηλεκτροστατικών (ιοντικών) αλληλεπιδράσεων με τους αναλύτες. Το μειονέκτημα των ιοντικών αλληλεπιδράσεων είναι τα άλατα ή τα ρυθμιστικά διαλύματα που απαιτούνται να προστεθούν στην κινητή φάση ώστε να διαλυθούν αυτές οι αλληλεπιδράσεις για αποτελεσματικότερη έκλυση του αναλύτη. Εκτός αυτού οι υψηλές συγκεντρώσεις ρυθμιστικών διαλυμάτων επιδρούν αρνητικά στην ευαισθησία του MS. Όμως, με τις στατικές φάσεις διπολικών ιόντων, οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις από κάθε φορτίο, μερικώς αντισταθμίζονται (λόγω της εγγύτητας ενός ιόντος με ένα αντίθετο φορτίο) και το τελικό αποτέλεσμα είναι πιο αδύναμες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις.

Οι αδύναμες ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις οδηγούν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση, το οποίο είναι προτιμότερο για υψηλή ευαισθησία σε ανίχνευση με τη φασματομετρία μαζών. Ουδέτερες στατικές φάσεις HILIC τυπικά απαιτούν επίσης χαμηλότερες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος, ωστόσο στερούνται των πλεονεκτημάτων της εκλεκτικότητας φορτισμένων στατικών φάσεων.

Η πυκνότητα του φορτίου αδύναμων ιονανταλλακτών που χρησιμοποιούνται ως HILIC στατικές φάσεις (π.χ. silica και αμινο-φάσεις) εξαρτάται από το pH. Γι' αυτό το λόγο, η δύναμη της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης ενός αναλύτη με τέτοια υλικά θα έχει μια σύνθετη εξάρτηση τόσο στον ιοντισμό του αναλύτη όσο και της στατικής φάσης. Σε υλικά «ανεξάρτητα του pH», όπως οι μόνιμες στατικές φάσεις διπολικού ιόντος, η βελτιστοποίηση του pH της κινητής φάσης υπαγορεύεται μόνο από τους αναλύτες.

Οι διαχωρισμοί κάποιων ομάδων ενώσεων μπορεί να ευνοούνται από ένα υψηλό pH στην κινητή φάση. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι οι φαινολικές ενώσεις. Για να χρησιμοποιηθεί αυτός ο τρόπος λειτουργίας, είναι απαραίτητη μία στήλη βασισμένη σε ένα πολυμερές (όπως αυτή που χρησιμοποιήθηκε), εξαιτίας της περιορισμένης σταθερότητας της silica σε pH πάνω από 7.5. [196,226]

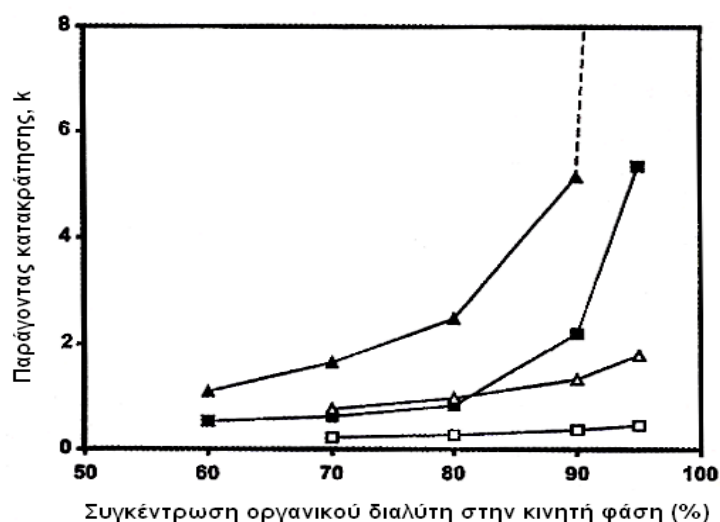
6.6 ΚΙΝΗΤΗ ΦΑΣΗ

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι τυπικές κινητές φάσεις για HILIC αποτελούνται από 40-97% ακετονιτρίλιο σε νερό ή ένα πτητικό ρυθμιστικό διάλυμα. Για να εξασφαλιστούν αναπαραγώγιμα αποτελέσματα, θα πρέπει να διατηρηθεί τουλάχιστον το 3% του νερού στη κινητή φάση. Αυτό το ποσό νερού είναι απαραίτητο

ώστε να εξασφαλιστεί επαρκής ενυδάτωση των σωματιδίων της στατικής φάσης. Επιπλέον μια υψηλότερη συγκέντρωση οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση, θα αυξήσει την κατακράτηση των αναλυτών.

Στη HILIC μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφοροι πολικοί, αναμίξιμοι με το νερό οργανικοί διαλύτες, αν και το ακετονιτρίλιο είναι μακράν το πιο δημοφιλές. Η «αντοχή» του διαλύτη αντιστρέφεται από αυτό που παρατηρείται στους RPLC διαχωρισμούς και η σχετική αντοχή του διαλύτη μπορεί να σχηματιστεί ως εξής (από τον πιο ισχυρό διαλύτη προς τον πιο ασθενή για την τεχνική HILIC): τετραϋδροφουράνιο < ακετόνη < ακετονιτρίλιο < ισοπροπανόλη < αιθανόλη < μεθανόλη < νερό.

Το σχήμα 6.9 απεικονίζει πως η επιλογή ενός οργανικού τροποποιητή επηρεάζει την κατακράτηση. Το ακετονιτρίλιο, ένας από τους πιο αδύναμους διαλύτες στη HILIC, παρέχει μία κατά πολύ υψηλότερη αύξηση στην κατακράτηση σε σύγκριση με τη μεθανόλη. Η μεθανόλη είναι ωστόσο μία χρήσιμη εναλλακτική και μπορεί πιθανώς να εξασφαλίσει μία υψηλότερη διαλυτότητα για συγκεκριμένες ενώσεις, αν και θα δώσει (όπως αναφέρθηκε πριν) χαμηλότερη κατακράτηση. Από άποψη απόδοσης το ακετονιτρίλιο είναι τυπικά η καλύτερη επιλογή. [196,225,248]



Σχήμα 6.9 Ο παράγοντας κατακράτησης k σαν συνάρτηση της συγκέντρωσης του ακετονιτριλίου (μαύρα σύμβολα) ή της μεθανόλης (λευκά σύμβολα) ως οργανικός τροποποιητής στην κινητή φάση. Στήλη ZIC-HILIC 150 x 4.6 mm. Τρίγωνα: κυτοσίνη και τετράγωνα: αδερίνη. Η κινητή φάση περιείχε 10 mM φορμικό οξύ συνολικά. [196]

Στη HILIC ο όρος υδρόφιλος αναφέρεται στη συγγένεια των μορίων με το νερό. Όμως, κατά μία ευρύτερη έννοια μπορεί να καλύψει τη συγγένεια των πολικών διαλυτών πολικών ομάδων γενικώς. Στη HILIC μπορούμε να έχουμε και τη χρήση πολικών μη υδατικών (Non Aqueous) κινητών φάσεων. [252]

Στη HILIC το ισχυρό εκλουστικό μέσο είναι το υδατικό μέρος, διότι είναι και το πιο πολικό. Αν χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά μεθανόλη, χρειάζονται περίπου οι διπλάσιες ποσότητες για να επιτευχθεί η ίδια κατακράτηση που επιτυγχάνεται με τη χρήση νερού ως διαλύτη. Επίσης υπάρχει και η πιθανότητα να παρουσιαστεί ουρά (tailing) στην κορυφή με τη χρήση της μεθανόλης ως ισχυρού διαλύτη. [233,253]

Στη HILIC χρησιμοποιείται για ισχυρό εκλουστικό μέσο είτε σκέτο νερό, είτε ρυθμιστικά διαλύματα, κυρίως οξικού αμμωνίου, μυρμηκικού αμμωνίου, ανάλογα με την εφαρμογή. Οι οργανικοί διαλύτες στην κινητή φάση χωρίζονται σε πολικούς απρωτικούς και πρωτικούς διαλύτες. Η μεθανόλη, η αιθανόλη, η ισοπροπανόλη και το οξικό οξύ είναι οι πιο αντιπροσωπευτικοί πολικοί πρωτικοί διαλύτες. Οι πιο αντιπροσωπευτικοί πολικοί απρωτικοί διαλύτες είναι το ακετονιτρίλιο και το τετραϋδροφουράνιο. Στη HILIC χρησιμοποιούνται κυρίως το ακετονιτρίλιο και η μεθανόλη. Οι πολικοί πρωτικοί διαλύτες είναι ταυτόχρονα δότες και δέκτες δεσμού υδρογόνου και οι απρωτικοί διαλύτες είναι μόνο δέκτες. Λόγω της ικανότητάς τους για δεσμό υδρογόνου, οι πολικοί πρωτικοί διαλύτες, μπορούν να ανταγωνίζονται πιο αποτελεσματικά για πολικά ενεργά κέντρα στην επιφάνεια της HILIC στατικής φάσης, διαταράσσοντας το σχηματισμό στιβάδων νερού στην επιφάνεια της στατικής φάσης, αντικαθιστώντας τα μόρια νερού, παράγοντας μια πιο υδρόφοβη στατική φάση. Οπότε οι αναλύτες με δυνατότητα δεσμού υδρογόνου κατακρατούνται λιγότερο σε κινητή φάση αποτελούμενη από πρωτικούς διαλύτες. [254]

6.7 ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα για HILIC είναι άλατα οξικού και φορμικού (μυρμηκικού) αμμωνίου, αλλά επίσης συστήνονται και φορμικά ή οξικά οξέα, όλα εξαιτίας της άριστης διαλυτότητας ακόμη και σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις οργανικού διαλύτη. Φωσφορικά άλατα και άλλα χαμηλής διαλυτότητας ρυθμιστικά διαλύματα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται με προσοχή ή να αποφεύγονται, ώστε να αποτραπεί ο σχηματισμός αλάτων, γιατί αλλιώς θα έχουμε καταστολή σήματος του ανιχνευτή και πιθανώς προβλήματα στο MS. Το υδροξείδιο του αμμωνίου και το

ανθρακικό αμμώνιο είναι κατάλληλες εναλλακτικές, όταν επιθυμούμε ένα υψηλό pH. Μία συγκέντρωση ρυθμιστικού διαλύματος στην περιοχή 5-20 mM είναι επαρκής για τους περισσότερους αναλύτες με ανώτερο όριο 200-300 mM, ανάλογα με τη διαλυτότητα στον «εκλουστή». Αρνητικά ή θετικά φορτισμένες στατικές φάσεις τυπικά απαιτούν υψηλότερες συγκεντρώσεις ρυθμιστικού διαλύματος από ότι ουδέτερες στατικές φάσεις ή στατικές φάσεις διπολικού ιόντος. Το TFA (trifluoroacetic acid, τριφθόρο-οξικό οξύ) και άλλα αντιδραστήρια ιοντικών ζευγών θα πρέπει να αποφεύγονται, καθώς και τα δύο επηρεάζουν αρνητικά το μηχανισμό HILIC, αλλά επίσης μειώνουν το σήμα στο MS. [196,226]

6.8 ΙΣΟΚΡΑΤΙΚΗ ΚΑΙ ΒΑΘΜΙΔΩΤΗ ΕΚΛΟΥΣΗ

Στην υγρή χρωματογραφία ο πιο συνηθισμένος τύπος έκλουσης είναι η ισοκρατική, όπου ο εκλουστής έχει μία σταθερή συγκέντρωση και σύνθεση κατά τη διάρκεια ολόκληρου του «τρεξίματος».

Η βαθμιδωτή έκλουση στη HILIC πραγματοποιείται αυξάνοντας την πολικότητα της κινητής φάσης, μειώνοντας τη συγκέντρωση του οργανικού διαλύτη (στην «αντίθετη» κατεύθυνση σε σύγκριση με τους διαχωρισμούς της RPLC. Με φορτισμένες στατικές φάσεις HILIC υπάρχει επίσης η πιθανότητα αύξησης της συγκέντρωσης του άλατος ή του ρυθμιστικού διαλύματος κατά τη διάρκεια μιας βαθμίδωσης, ώστε να διασπαστούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τους αναλύτες.

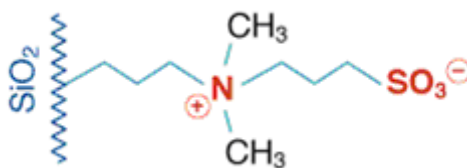
Η βαθμιδωτή έκλουση βασικά χρησιμοποιείται για να διαχωριστούν οι αναλύτες με πολύ διαφορετικούς παράγοντες κατακράτησης κατά τη διάρκεια του ίδιου «τρεξίματος» με καλή απόδοση διαχωρισμού και ανεκτούς χρόνους κατακράτησης. Μετά από ένα γύρο βαθμίδωσης η στήλης πρέπει να εξισορροπείται με την αρχική συγκέντρωση της κινητής φάσης πριν εμβολιαστεί το επόμενο δείγμα.

Πρέπει να δοθεί έμφαση στο ότι οι στατικές φάσεις HILIC είναι λιγότερο ανεκτές σε γρήγορες βαθμιδώσεις και μικρούς χρόνους ισορροπίας συγκρινόμενες με φάσεις της RPLC. Αυτό συμβαίνει επειδή το νερό στην υδατική στιβάδα μέσα στη στατική φάση προέρχεται από τον εκλουστή κι επομένως εξαρτάται από τη σύνθεσή του. Μία βαθμίδωση HILIC δεν θα πρέπει να τρέξει από 100% οργανική σε 100% υδατική για τους ίδιους λόγους.

Αποτυχία στο να εξισορροπηθούν κατάλληλα οι στήλες HILIC θα προκαλέσει ολίσθηση χρόνων κατακράτησης και φτωχή αναπαραγωγιμότητα. Σε κάποιες περιπτώσεις όμως, είναι πιθανόν να επιτευχθεί μία δυναμική εξισορρόπηση με σταθερούς χρόνους κατακράτησης, εάν γρήγορες βαθμιδώσεις τρέξουν επανειλημμένα για μια μακρύτερη περίοδο χρόνου αλλά αυτή η κατάσταση είναι δύσκολο να έχει αναπαραγωγιμότητα. [196,224]

6.9 ΣΤΑΤΙΚΗ ΦΑΣΗ

Η στατική φάση της ZIC - HILIC βασίζεται σε πορώδη silica που συνδέεται με ομοιοπολικό δεσμό με ένα (μόνιμο) διπολικό ιόν (δραστική ομάδα του τύπου της σουλφοβεταΐνης) (σχήμα 6.10). Στη ZIC – HILIC το υλικό της στήλης βασίζεται σε ανοξείδωτο ατσάλι. Η βασισμένη σε πολυμερές ZIC – pHILIC στήλη (αυτή που χρησιμοποιήθηκε) αποτελείται από την ίδια δραστική ομάδα διπολικού ιόντος τύπου σουλφοβεταΐνης.



Σχήμα 6.10 Η δραστική ομάδα των ZIC - HILIC και ZIC – pHILIC στατικών φάσεων. [196]

Το μονίμως φορτισμένο κι όμως συνολικά ουδέτερο (επειδή περιλαμβάνει δύο αντίθετα φορτισμένες δραστικές ομάδες), υψηλά πολικό υλικό των ZIC - HILIC και ZIC – pHILIC στηλών διπολικό ιόν, παρέχει ένα μοναδικό περιβάλλον, όχι μόνο ιδιαίτερος ικανό για επιδιалύτωση πολικών και φορτισμένων ενώσεων, αλλά και ικανό να προσφέρει την πιθανότητα αδύναμων ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με αναλύτες που μεταφέρουν είτε θετικό είτε αρνητικό φορτίο. Έτσι η κατακράτηση γενικά αυξάνει με την υδροφιλικότητα και με το φορτίο του αναλύτη, και η εκλεκτικότητα μπορεί να ρυθμιστεί διατηρώντας μία χαμηλή ιοντική ισχύ. Αυτές οι ιδιότητες καθιστούν το υλικό των ZIC - HILIC και ZIC – pHILIC στηλών άριστο για διαχωρισμούς ενός ευρέως φάσματος πολικών και υδρόφιλων ενώσεων και μία ιδανική επιλογή για LC-MS ανάλυση.

Η εκλεκτικότητα των στηλών HILIC μπορεί να ρυθμιστεί μεταβάλλοντας την ποσότητα του οργανικού τροποποιητή, το pH και την χαμηλή ιοντική ισχύ της κινητής

φάσης, όπου μια αύξηση του περιεχόμενου οργανικού διαλύτη ή μια μείωση της ιοντικής ισχύος προωθεί την κατακράτηση. Εκτός των άλλων η εκλεκτικότητα μπορεί να ρυθμιστεί (συνήθως σε μικρότερο βαθμό) και από τη θερμοκρασία της στήλης (εξαρτώμενη βέβαια από τη φύση των κατακρατούμενων αναλυτών).

Τόσο η στατική φάση της ZIC – HILIC όσο και της ZIC – pHILIC είναι σχεδιασμένες για αποδοτικό διαχωρισμό ουδέτερων, ιοντικών, όξινων και βασικών υδρόφιλων ενώσεων. Στο σχεδιασμό αυτών των HILIC φάσεων, έχει ληφθεί ειδική φροντίδα για μικρή απώλεια (φθορά) της στατικής φάσης και μεγάλο χρόνο ζωής της στήλης. Επίσης οι ZIC - HILIC στατικές φάσεις επιδεικνύουν μαζική ικανότητα φόρτισης, έτσι θα μπορούσαν με τις ανάλογες προσαρμογές να χρησιμοποιηθούν σε παρασκευαστικές στήλες. [196,224,227,230,255,256]

6.10 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΤΕΧΝΙΚΗΣ HILIC

Πλεονεκτήματα

Η HILIC είναι κατάλληλη για ένα φάσμα ενώσεων διότι:

- Η ευαισθησία με ESI-MS ενισχύεται λόγω του μεγάλου ποσοστού του οργανικού διαλύτη στην κινητή φάση και της μεγάλης αποτελεσματικότητας των τεχνικών ψεκασμού και αποδιαλύτωσης,
- Μπορεί να γίνει απευθείας ένεση από εκχυλίσματα με C₁₈ στήλες SPE, με διαλύτες υψηλής συγκέντρωσης οργανικού διαλύτη,
- Η σειρά έκλουσης είναι γενικώς αντίθετη από την RPLC, παρέχοντας εναλλακτική εκλεκτικότητα,
- Επιτυγχάνεται ικανοποιητική κατακράτηση πολικών ενώσεων, εκεί που υστερεί η RPLC και
- Χρησιμοποιούνται υψηλότερες ταχύτητες ροής λόγω της υψηλότερης συγκέντρωσης των οργανικών διαλυτών (μικρότερο ιξώδες της κινητής φάσης), οπότε έχουμε και σημαντική μείωση του χρόνου ανάλυσης. [220,252]

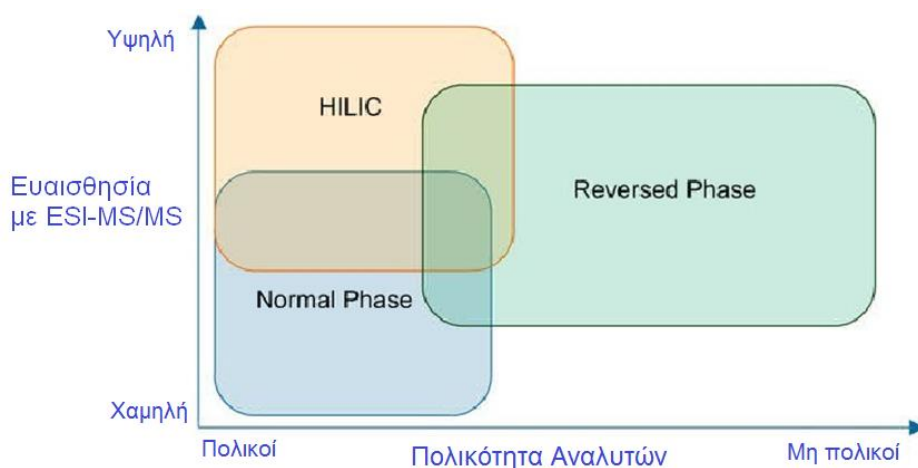
Μειονεκτήματα

- Προβλήματα διαλυτότητας της κινητής φάσης και του δείγματος
- Όχι πολύ καλά κατανοητό μηχανισμό κατακράτησης
- Όχι ευρέως εφαρμοστέα [226,251]

6.11 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΤΗΣ ΣΥΖΕΥΞΗΣ ΤΗΣ NPLC ΚΑΙ ΤΗΣ HILIC ΜΕ ΤΗΝ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ

Υπάρχουν σοβαροί περιορισμοί στη σύζευξη της NPLC με την Φασματομετρία Μαζών εκτός του ότι οι υδρόφιλοι αναλύτες μπορεί να μην είναι διαλυτοί στα συστήματα διαλυτών της NPLC. Επιπλέον ελαττώνεται η αποτελεσματικότητα του ιοντισμού από τους πλήρως οργανικούς και μη πολικούς διαλύτες, οπότε και η ευαισθησία. Το πρόβλημα αυτό μπορεί να λυθεί τροποποιώντας τις συνθήκες του ιοντισμού μέσω απευθείας ή μετά τη στήλη προσθήκη πολικών διαλυτών και τροποποιητών. Παρ' όλα αυτά, οι τεχνικές αυτές τροποποιήσεις απαιτούν επιπλέον ρυθμίσεις, όπως αντλίες ή δεξαμενές ανάμιξης, οι οποίες είναι ακατάλληλες για αναλύσεις ρουτίνας. Η αποτελεσματικότητα του ιοντισμού είναι πιθανό να μην είναι βέλτιστη και η εισαγωγή επιπλέον νεκρού όγκου μειώνει την αποτελεσματικότητα του διαχωρισμού. Η σύζευξη της HILIC με την Φασματομετρία Μαζών υπερκαλύπτει τα προβλήματα που παρουσιάζονται στην NPLC. [224]

Ακόμη ενώ ένα εκλουστικό σύστημα, στην HILIC, φαίνεται όμοιο με αυτό της υγροχρωματογραφίας κανονικής φάσης (NPLC), μπορεί να υπάρξει σαφής διαχωρισμός από την αντικατάσταση των άπολων, συνήθως αλκανίων, διαλυτών με υδροοργανικές κινητές φάσεις, οι οποίες φέρουν σημαντικά πλεονεκτήματα σε πολλά πεδία εφαρμογών, όπως η συμβατότητα με τη φασματομετρία μαζών μέσω ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) (σχήμα 6.11). [221,227,248]



Σχήμα 6.11 HILIC, NPLC και RPLC χρωματογραφία σε σχέση με τη πολικότητα των αναλυτών και την ευαισθησία με ESI-MS/MS. [251]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7ο ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η εξέλιξη στον κλάδο της παραγωγής και επεξεργασίας των τροφίμων, έφερε ένα πλήθος νέων τεχνολογιών οι οποίες εμπλέκουν χημικές ουσίες (φυτορυθμιστικές ουσίες, αντιβιοτικά) που σε ορισμένες περιπτώσεις μένουν ως υπολείμματα στο τελικό προϊόν. Για τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών είναι απαραίτητη η ανάπτυξη οικονομικών, γρήγορων και εύκολων μεθόδων με πεδίο που να περιλαμβάνει αναλύτες διαφορετικών χημικών κατηγοριών και διαφόρων φυσικοχημικών ιδιοτήτων (π.χ. πολικών και υδρόφιλων ενώσεων, όπως στην παρούσα μελέτη).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μιας γρήγορης και αξιόπιστης μεθόδου υγροχρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) με πηγή ιόντων ESI, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό υπολειμμάτων διαφόρων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών ουσιών, αντιβιοτικών και μυκοτοξινών σε τρόφιμα φυτικής και ζωικής προέλευσης.

Οι αναλύτες που επιλέχθηκαν για την επικύρωση της μεθόδου είναι κυρίως πολικές και μετρίως πολικές ενώσεις και είναι οι εξής: οι φυτορυθμιστικές ουσίες: chlormequat, daminozide, diquat, maleic hydrazide, mepiquat, paraquat, το εντομοκτόνο: cyromazine, το ζιζανιοκτόνο: amitrole, το αντιβιοτικό φυτών kasugamycin, το ptu (μεταβολίτης του μυκητοκτόνου propineb), τα αντιβιοτικά: chlorotetracycline, doxycycline, oxytetracycline (τετρακυκλίνες), sulfamerazine, sulfadimidine, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfadimethoxine (σουλφοναμίδια), ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, flumequine, marbofloxacin, oxolinic acid (κινολόνες) καθώς και οι μυκοτοξίνες: αφλατοξίνη B1, B2, η φουμονισίνη B1 και η ωχρατοξίνη A. Επιπλέον αναπτύχθηκε μια ειδική μέθοδος για τον μεμονωμένο προσδιορισμό του μυκητοκτόνου fosetyl-aluminium με ESI-.

Η πορεία παραλαβής των ουσιών από τη μήτρα των τροφίμων φυτικής και ζωικής προέλευσης ήταν αρκετά απλή και σύντομη. Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των παραμέτρων της φασματομετρίας μαζών για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού καθώς και βελτιστοποίηση του χρωματογραφικού συστήματος.

Η επικύρωση της πολυπολειμματικής μεθόδου πραγματοποιήθηκε σε 2 επίπεδα (10 $\mu\text{g/kg}$ και στο δεκαπλάσιο αυτού), σε 9 διαφορετικά υποστρώματα των κατηγοριών: φρούτα-λαχανικά (μήλα, βερίκοκα, μαρούλια και κρεμμύδια), δημητριακά-όσπρια (αλεύρι και ρεβύθια), ζωικά προϊόντα (γάλα και κρέας (χοιρινός κιμάς)) και παιδικές τροφές (φρουτόκρεμα του εμπορίου). Το υπόστρωμα στο οποίο επικυρώθηκε η μέθοδος για το fosetyl-aluminium ήταν μαρούλια.

Οι μέθοδοι επικυρώθηκαν ως προς τα χαρακτηριστικά της γραμμικότητας, της ακρίβειας, της πιστότητας, ενώ προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και ο συντελεστής μήτρας. Τέλος έγινε εκτίμηση της αβεβαιότητας των μεθόδων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8ο ΟΡΓΑΝΑ, ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

8.1 ΠΡΟΤΥΠΕΣ ΟΥΣΙΕΣ ΚΑΙ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Οι δραστικές ουσίες που επιλέχθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων, η καθαρότητά τους, καθώς και η εταιρεία προέλευσης τους παρουσιάζονται στον πίνακα 8.1. Όλες οι πρότυπες ουσίες συνοδεύονταν από πιστοποιητικό ανάλυσης και ήταν επισημασμένες με ημερομηνία λήξης. Ακόμη στον πίνακα 8.2 παρουσιάζονται ορισμένες φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών που μελετήθηκαν.

Πίνακας 8.1. Οι πρότυπες ουσίες που μελετήθηκαν, η επί τοις εκατό καθαρότητα τους και η εταιρεία προέλευσής τους.

α/α	Πρότυπη Ουσία	Καθαρότητα (%)	Προέλευση
1	Aflatoxin B1	≥ 98	Sigma – Aldrich
2	Aflatoxin B2	≥ 98	Sigma – Aldrich
3	Amitrole	98	Dr. Ehrenstorfer
4	Chlormequat	99,5	BASF
5	Chlortetracycline hydrochloride	≥ 99	Sigma – Aldrich
6	Ciprofloxacin	≥ 98	Sigma – Aldrich
7	Cyromazine	99	Dr. Ehrenstorfer
8	Daminozide	99,4	G C Laboratories
9	Danofloxacin	> 99	Sigma – Aldrich
10	Diquat	98	Dr. Ehrenstorfer
11	Doxycycline hyclate	≥ 98	Sigma – Aldrich
12	Enrofloxacin	≥ 98	Sigma – Aldrich
13	Flumequine	≥ 99	Sigma – Aldrich
14	Fumonisin B1	≥ 98	Sigma – Aldrich
15	Fosetyl-Aluminium	94	Dr. Ehrenstorfer
16	Kasugamycin hydrochloride	≥ 90	Sigma – Aldrich
17	Maleic hydrazide	97,5	Dr. Ehrenstorfer
18	Marbofloxacin	≥ 99	Sigma – Aldrich

19	Mepiquat	98	BASF
20	Ochratoxin A	≥ 98	Sigma – Aldrich
21	Oxolinic acid	≥ 99	Sigma – Aldrich
22	Oxytetracycline	≥ 95	Sigma – Aldrich
23	Paraquat	96,5	Dr. Ehrenstorfer
24	PTU [propylenethiourea]	99	Dr. Ehrenstorfer
25	Sulfachloropyridazine	$\geq 99,0$	Sigma – Aldrich
26	Sulfadimethoxine	$\geq 98,5$	Sigma – Aldrich
27	Sulfadimidine	$\geq 99,0$	Sigma – Aldrich
28	Sulfamerazine	$\geq 99,0$	Sigma – Aldrich
29	Sulfamethoxypyridazine	$\geq 99,0$	Sigma – Aldrich

Πίνακας 8.2. Φυσικοχημικές ιδιότητες των ουσιών που μελετήθηκαν. [89,257]

α/α	Πρότυπη Ουσία	Τάση Ατμών (25°C)	LogK _{ow}	Διαλυτότητα στο νερό (mg/L)
1	Aflatoxin B1	$1,74 \times 10^{-9}$ mm Hg	1,23	918,3 (25 °C)
2	Aflatoxin B2	$1,65 \times 10^{-10}$ mm Hg	1,45	585,4 (25 °C)
3	Amitrole	$7,35 \times 10^{-4}$ mm Hg	-0,97 (pH 7)	$2,8 \times 10^5$ (25 °C)
4	Chlormequat	$1,29 \times 10^{-5}$ mm Hg	-3,44	$1,0 \times 10^6$ (25 °C)
5	Chlortetracycline hydrochloride	$5,84 \times 10^{-22}$ mm Hg	-0,62	630 (25 °C)
6	Ciprofloxacin	$2,85 \times 10^{-13}$ mm Hg	0,28	$1,148 \times 10^4$ (25 °C)
7	Cyromazine	$1,36 \times 10^{-6}$ mm Hg	-0,061 (pH 7)	$1,3 \times 10^4$ (25 °C)
8	Daminozide	$6,18 \times 10^{-6}$ mm Hg	-1,50 (pH 5, 7, 9, 21°C)	$6,18 \times 10^6$ (25 °C)
9	Danofloxacin	$2,36 \times 10^{-13}$ mm Hg	0,44	5818 (25 °C)
10	Diquat	148×10^{-4} mm Hg	-4,60	1027,2 (20 °C)
11	Doxycycline hyclate	$1,42 \times 10^{-23}$ mm Hg	-0,02	630 (25 °C)
12	Enrofloxacin	$3,06 \times 10^{-12}$ mm Hg	0,70	3397 (25 °C)
13	Flumequine	$7,64 \times 10^{-11}$ mm Hg	2,60	308,4 (25 °C)

14	Fumonisin B1	αμελητέα	2,24	$\geq 20 \times 10^3$ (25 °C)
15	Fosetyl-Aluminium	0,0557 mm Hg	-2,7 (pH 4)	4,288 5 (25 °C)
16	Kasugamycin hydrochloride	$9,75 \times 10^{-11}$ mm Hg	-5,75	$1,0 \times 10^6$ (25 °C)
17	Maleic hydrazide	$3,68 \times 10^{-8}$ mm Hg	-1,96 (pH 7)	4510 (25 °C)
18	Marbofloxacin	$1,3 \times 10^{-13}$ mm Hg	-2,92	$1,0 \times 10^6$ (25 °C)
19	Mepiquat	$1,26 \times 10^{-5}$ mm Hg	-2,82 (pH 7)	$1,0 \times 10^6$ (25 °C)
20	Ochratoxin A	$7,56 \times 10^{-7}$ mm Hg ¹⁵	4,74	0,9872 (25 °C)
21	Oxolinic acid	$1,02 \times 10^{-9}$ mm Hg	0,94	3,2 (25 °C)
22	Oxytetracycline	$9,05 \times 10^{-23}$ mm Hg	-0,90	313 (25 °C)
23	Paraquat	<0,01 mPa	-4,5	$6,20 \times 10^5$ (20 °C)
24	PTU [propylenethiourea]	$5,66 \times 10^{-5}$ mm Hg	-0,68	$1,99 \times 10^5$ (25 °C)
25	Sulfachloropyridazine	$1,33 \times 10^{-9}$ mm Hg	0,31	7000 (37 °C)
26	Sulfadimethoxine	$1,49 \times 10^{-9}$ mm Hg	1,63	343 (25 °C)
27	Sulfadimidine	$6,82 \times 10^{-9}$ mm Hg	0,89	1500 (29 °C)
28	Sulfamerazine	$4,71 \times 10^{-9}$ mm Hg	0,14	202 (20 °C)
29	Sulfamethoxypyridazine	$1,12 \times 10^{-9}$ mm Hg	0,32	147 (37 °C)

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων των ουσιών που μελετήθηκαν χρησιμοποιήθηκαν οι πρότυπες ουσίες (που προαναφέρθηκαν), οι οποίες ζυγίστηκαν και στη συνέχεια διαλυτοποιήθηκαν σε κατάλληλους διαλύτες (για την κάθε δραστική ουσία) υψηλής καθαρότητας, ώστε να έχουν τελική συγκέντρωση 1 mg/mL (1000 ppm). Με αυτό τον τρόπο παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης (stock standard solutions) των μεμονωμένων ουσιών τα οποία φυλάσσονται υπό ψύξη.

Ακόμη παρασκευάστηκαν τα πρότυπα διαλύματα εργασίας (working standards solutions) με κατάλληλες αραιώσεις από τα πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης. Έτσι κατ' αρχήν, με βάση τα παραπάνω διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν για την κάθε ουσία μεμονωμένα διαλύματα συγκέντρωσης 1 ppm σε νερό-μεθανόλη (50:50 v/v), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για την εύρεση των θραυσμάτων στο φασματογράφο μάζας καθώς και των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού. Επίσης παρασκευάστηκε ένα

πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1 ppm (μίγμα όλων των προτύπων ουσιών) για τον εμβολιασμό των υποστρωμάτων κατά την επικύρωση της μεθόδου.

Για την εκτίμηση της γραμμικότητας της μεθόδου παρασκευάστηκαν μίγματα προτύπων διαλυμάτων με όλες τις ουσίες σε συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 25, 50, 75 και 100 μg/L σε νερό-μεθανόλη, 50:50 v/v.

8.2 ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πειραματική διαδικασία, η καθαρότητά τους, καθώς και η εταιρεία προέλευσης τους παρουσιάζονται στον πίνακα 8.3.

Πίνακας 8.3. Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, η καθαρότητα τους και η εταιρεία προέλευσής τους.

Διαλύτες	Καθαρότητα	Προέλευση
Μεθανόλη	HPLC	Fisher Scientific
Ακετονιτρίλιο	HPLC	Fisher Scientific
Νερό	HPLC	Fisher Scientific

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα εξής:

- Μυρμηκικό αμμώνιο, Fluka Analytical
- Μυρμηκικό οξύ, Fluka Analytical
- NaCl, καθαρότητας $\geq 99,0\%$, Sigma – Aldrich

8.3 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Για την παρασκευή των διαλυμάτων και την προετοιμασία των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν στην επικύρωση, χρησιμοποιήθηκαν οι εξής συσκευές:

- Μηχανικές πιπέττες των 10-100 μL, 20-200 μL, 100-1000 μL, 0,5-5 mL, Transferpette
- Φιάλες φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL με βιδωτό πώμα (NALGENE)
- Ηλεκτρονικός ζυγός με ακρίβεια δύο δεκαδικών ψηφίων (KERN, PLS2100-2)
- Φυγόκεντρος (ROTINA 380 max speed 15000 στροφές/min, Hettich Zentrifugen)
- Φίλτρα τύπου syringe filter PTFE διαμέτρου πόρων 0,45 μm της εταιρείας Rerstek

- Πλαστικά σκουρόχρωμα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη των 2 mL
- Ογκομετρικές φιάλες κατηγορίας Class A
- Αναλυτικός ζυγός με ακρίβεια τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων

8.4 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΤΡΙΠΛΟ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟ

Στα πλαίσια της συγκεκριμένης μελέτης, χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφικό σύστημα Varian (Μοντέλο: 2X Prostar 20 (HPLC) & 1200 L (Quatropole MS/MS)) αποτελούμενο από τα εξής μέρη:

- 2 συστήματα solvent delivery (210)
- Αυτόματο δειγματολήπτη (model 420)
- Φούρνο στήλης (model 510 Prostar)
- Φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου (1200 L) με πηγή ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ElectronSpray Ionization, ESI)
- Λογισμικό διαχείρισης – επεξεργασίας δεδομένων (Varian Workstation)

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με την εξής αναλυτική στήλη: SeQuant ZIC-pHILIC, μήκους 150mm, εσωτερικής διαμέτρου 4,6mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9ο ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΥΤΟΠΡΑΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

Η ανάπτυξη της μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ουσιών που μελετήθηκαν πραγματοποιήθηκε σε δύο στάδια. Αρχικά, βρέθηκαν τα μητρικά και θυγατρικά ιόντα στο φασματομέτρο μαζών καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες ιοντισμού για τις υπό προσδιορισμό ενώσεις. Στη συνέχεια, μελετήθηκε ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των ουσιών δοκιμάζοντας διάφορες αναλογίες των συστατικών της κινητής φάσης, διάφορες θερμοκρασίες στην στήλη και διάφορες ροές στην κινητή φάση.

9.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΗΤΡΑ – ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Προετοιμασία Δείγματος

Για την εκχύλιση των ουσιών ακολουθήθηκε η εξής μεθοδολογία:

1. Κατ' αρχήν ζυγίζονται σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 50 mL:
 - α) $10 \pm 0,1$ g ομογενοποιημένου δείγματος για τρόφιμα με περιεκτικότητα σε νερό $>80\%$, για γάλα και για κρέας
 - β) $5 \pm 0,05$ g ομογενοποιημένου δείγματος για δημητριακά και όσπρια κι έπειτα προστίθενται 10 mL νερού και το δείγμα παραμένει για 10 min
2. Προστίθενται 10 mL διαλύματος 1% HCOOH σε μεθανόλη, η φιάλη πωματίζεται και ακολουθεί έντονη ανακίνηση με το χέρι για 1 min.
3. Στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 4000 rpm (στροφές ανά λεπτό) για 5 min.
4. Ακολούθως το υπερκείμενο υγρό διηθείται από φίλτρο τύπου PTFE syringe filter διαμέτρου πόρων 0,45 μm μέσα σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη των 2 mL.
(Για τα τρόφιμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά, το υπερκείμενο υγρό μεταφέρεται σε φιάλη φυγοκέντρου από Teflon των 15 mL και τοποθετείται για τουλάχιστον 12 ώρες σε καταψύκτη. Εκεί καθιζάνουν συνεκχυλίσματα με χαμηλή διαλυτότητα στη μεθανόλη. Έτσι η μεγαλύτερη ποσότητα των λιπαρών ουσιών καθιζάνει. Λαμβάνεται υπό ψύξη ορισμένη ποσότητα από το υπερκείμενο υγρό και

διηθείται σε θερμοκρασία δωματίου από φίλτρο τύπου syringe filter διαμέτρου πόρων 0,45 μm μέσα σε φιαλίδιο αυτόματου δειγματολήπτη των 2 mL.)

Η παραπάνω προκατεργασία πραγματοποιείται τόσο για τα εμβολιασμένα, όσο και για τα άγνωστα δείγματα. Στα εμβολιασμένα δείγματα στο στάδιο της εκχύλισης πριν την προσθήκη των 10 mL διαλύματος 1% HCOOH σε μεθανόλη, προσθέτουμε από το πρότυπο διάλυμα κατάλληλη ποσότητα για την επιθυμητή συγκέντρωση.

9.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η βελτιστοποίηση των παραμέτρων του φασματομέτρου μαζών είναι κυρίαρχης σημασίας κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου για την επίτευξη μεγαλύτερης ευαισθησίας, δηλαδή μεγαλύτερο λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N). Η τεχνική ιοντισμού που χρησιμοποιήθηκε είναι ο ηλεκτροψεκασμός (ESI).

Οι παράμετροι της πηγής βελτιστοποιούνται με πειράματα υπό ροή κινητής φάσης αλλά χωρίς στήλη, με την τεχνική «έγχυσης σε ροή από τον βρόχο» (loop injection). Η τεχνική αυτή παρέχει συνεχή ροή του αναλύτη στην πηγή και έτσι αποτελεί τον ευκολότερο τρόπο βελτιστοποίησης των παραμέτρων της πηγής, με τον κίνδυνο όμως μεγάλου υποβάθρου θορύβου στην συνέχεια.

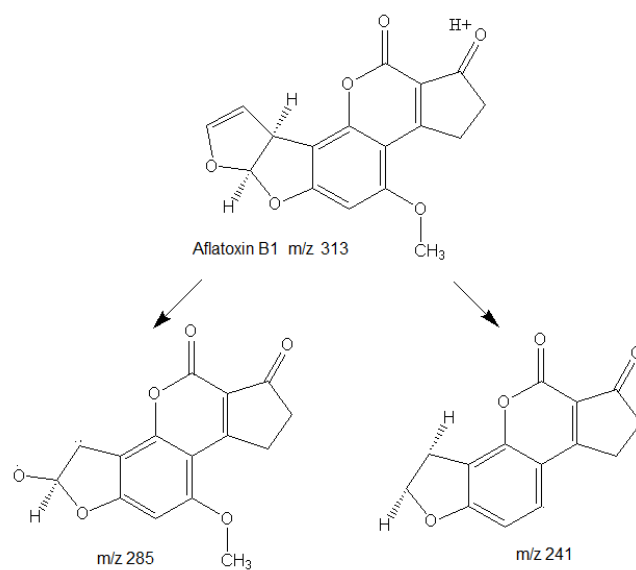
Για την εύρεση των μητρικών ιόντων, των θραυσμάτων και των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα μεμονωμένων ουσιών υψηλής συγκέντρωσης (1,0 $\mu\text{g/mL}$). Αρχικά, έγινε απ' ευθείας έγχυση (infusion) στο σύστημα του MS των μεμονωμένων ουσιών για να βρεθούν τα μητρικά ιόντα και τα θραύσματα τους. Αφού βρεθούν τα μητρικά ιόντα και τα θυγατρικά τους με τη μεγαλύτερη ένταση (intensity) γίνονται ενέσεις από την βαλβίδα εισαγωγής του οργάνου (loop injections) παρουσία κινητής φάσεως (οι ουσίες μελετήθηκαν ανάλογα με τη σύσταση της κινητής φάσης που υπάρχει κατά την έκλουση τους) για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών ιοντισμού (βέλτιστη τάση τριχοειδούς (capillary voltage) και βέλτιστη ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy)). Έτσι επιλέχθηκαν τα θραύσματα με το ισχυρότερο σήμα και τη βέλτιστη ενέργεια θραυσματοποίησης (Πίνακας 9.1 και Σχήματα 9.1 – 9.27).

Πίνακας 9.1. Μητρικά, θυγατρικά ιόντα και παράμετροι MS/MS των ουσιών που μελετήθηκαν.

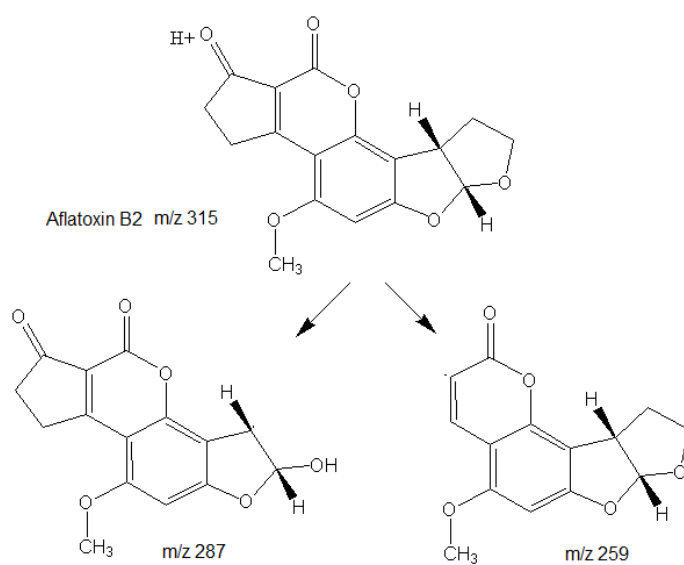
Ουσία	Μητρικό Ιόν (m/z)	Θυγατρικά Ιόντα (m/z)	Ενέργεια Θραυσματο- ποίησης (V)	Τάση Τριχοειδούς (V)
Aflatoxin B1	313	241	33,5	96
		285*	18,5	
Aflatoxin B2	315	259	26,0	76
		287*	22,0	
Amitrole	85	43*	15,0	75
		57	5,0	85
Chlormequat	122	58*	19,0	64
	124	58	14,5	21
Chlortetracycline hydrochloride	479	461	15,5	50
		462*	15,5	
Ciprofloxacin	332	231	33,5	64
		314*	18,5	
Cyromazine	167	85*	15,0	65
		125	15,0	45
Daminozide	161	61	9,0	32
		143*	7,0	
Danofloxacin	358	82	23,0	35
		340*	7,5	
Diquat	184	128	45,0	75
		156*	25,0	65
Doxycycline hyclate	445	154	23,0	54
		428*	11,0	
Enrofloxacin	360	316	13,5	50
		342*	7,5	
Flumequine	262	174	37,5	44
		244*	15,0	
Fumonisin B1	722	335	20,0	170
		352*	30,0	

Fosetyl-Aluminium	109	63	24,5	-58
		81*	10,5	
Kasugamycin hydrochloride	380	112	15,0	45
		200*	5,0	25
Maleic hydrazide	113	67	15,0	85
		83*	25,5	68
Marbofloxacin	363	320	13,5	44
		345*	18,5	44
Mepiquat	114	58	13,5	80
		98*	15,5	80
Ochratoxin A	404	239	19,0	60
		241*	20,0	
Oxolinic acid	262	160*	41,0	55
		216	24,5	
Oxytetracycline	461	426*	17,0	54
		444	17,0	
Paraquat	171	77	25,0	75
	186	171*	15,0	
PTU [propylenethiourea]	117	58*	15,0	35
		60	15,0	45
Sulfachloropyridazine	285	92	26,0	52
		156*	14,5	
Sulfadimethoxine	311	92	25,0	36
		156*	18,5	
Sulfadimidine	279	92	26	44
		186*	14,0	
Sulfamerazine	265	108*	43,0	38
		156	24,0	
Sulfamethoxypyridazine	281	92	24,0	48
		156*	12,0	

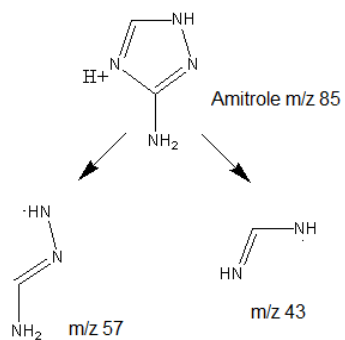
Με * επισημαίνονται τα ιόντα ποσοτικοποίησης



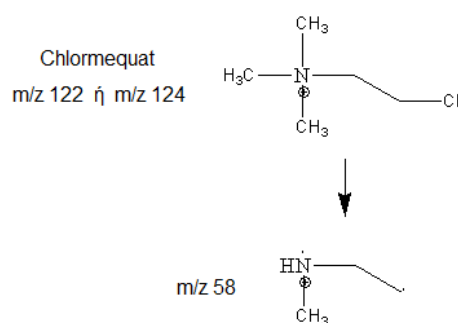
Σχήμα 9.1: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Aflatoxin B1.



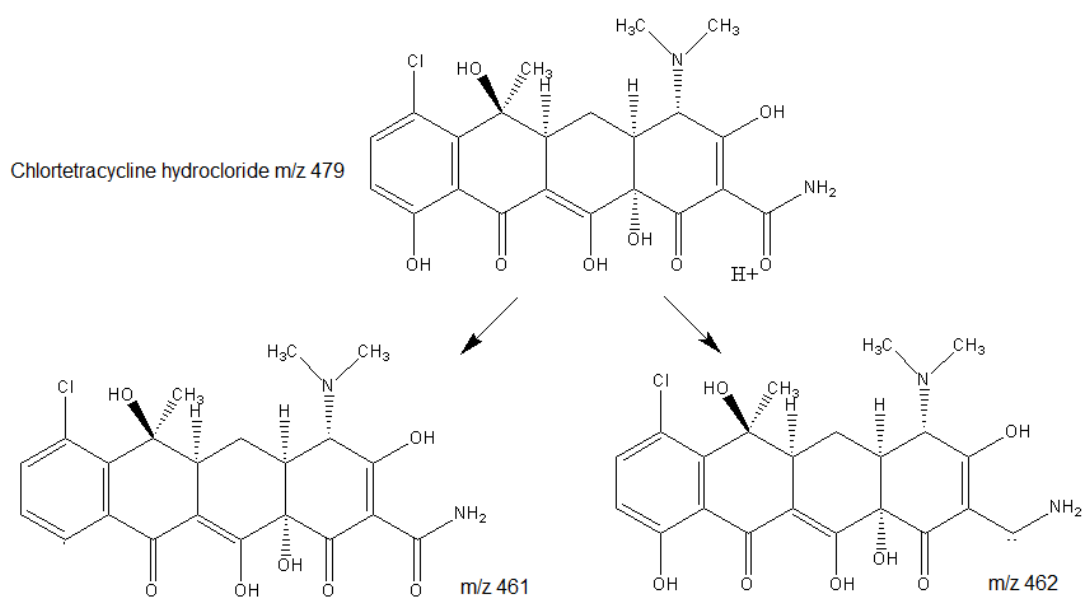
Σχήμα 9.2: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Aflatoxin B2.



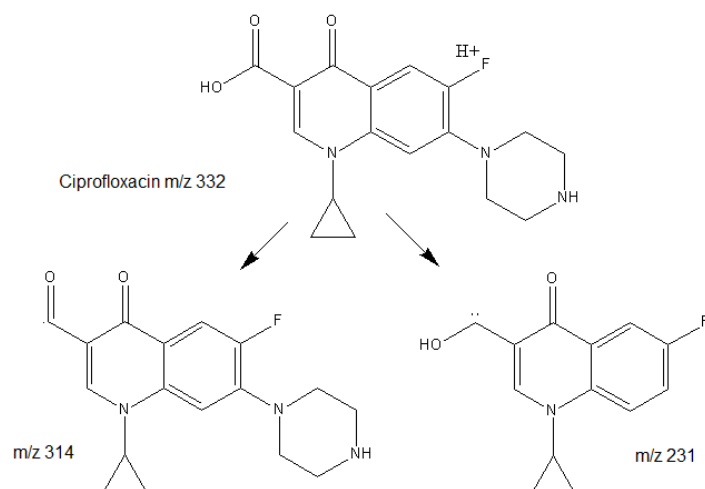
Σχήμα 9.3: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Amitrole.



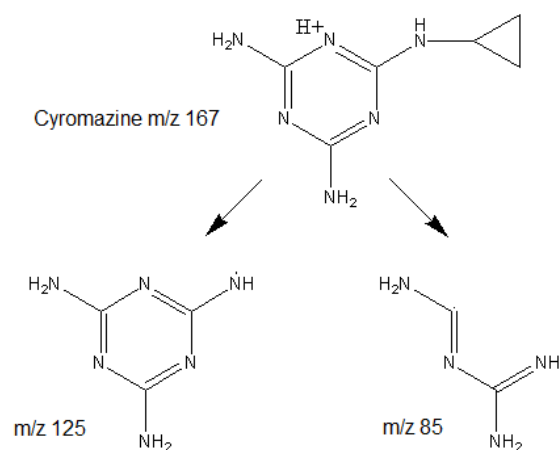
Σχήμα 9.4: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Chlormequat.



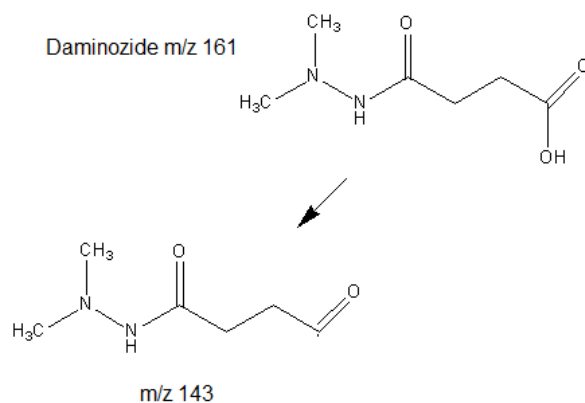
Σχήμα 9.5: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Chlortetracycline hydrochloride.



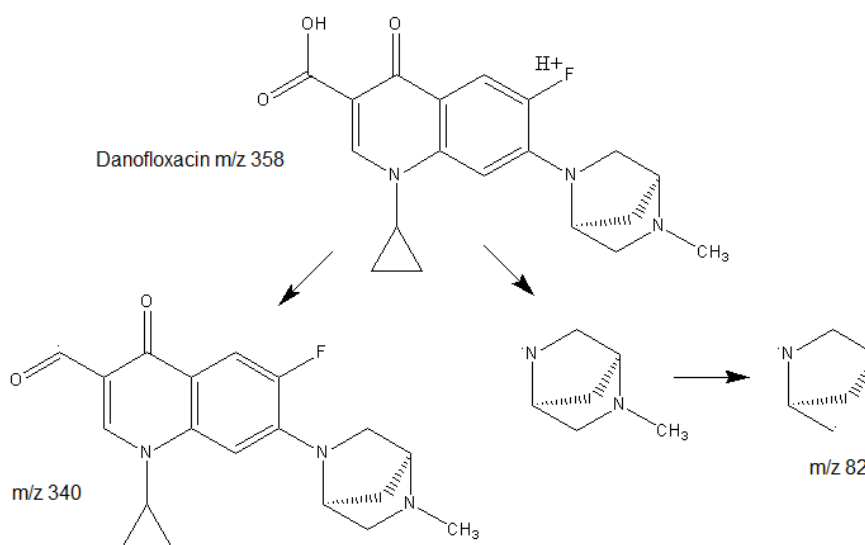
Σχήμα 9.6: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Ciprofloxacin.



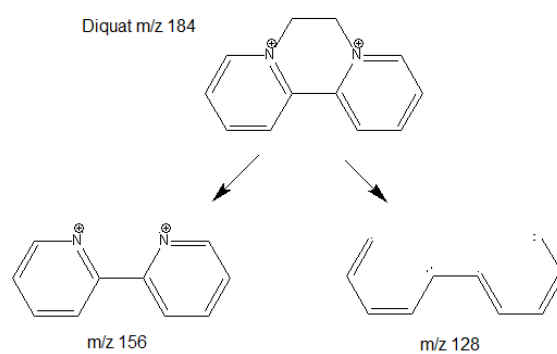
Σχήμα 9.7: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Cyromazine.



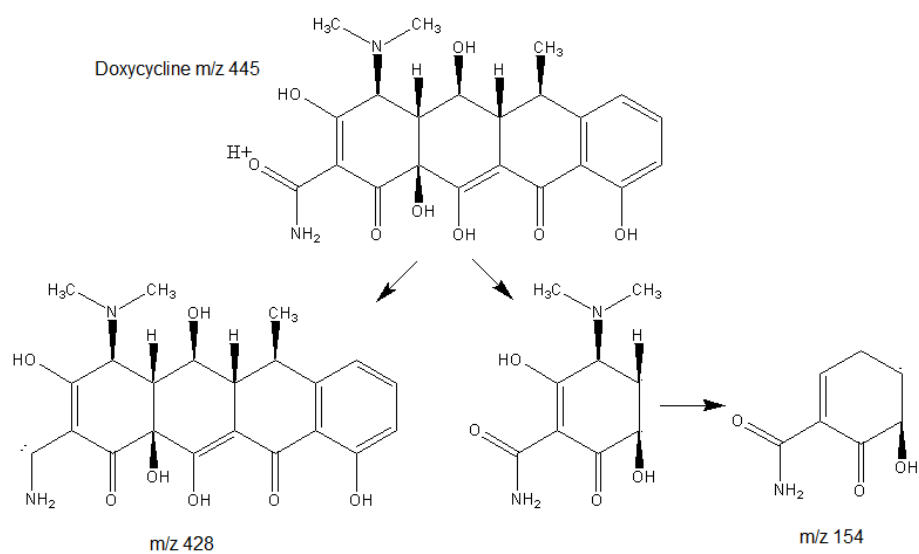
Σχήμα 9.8: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Daminozide.



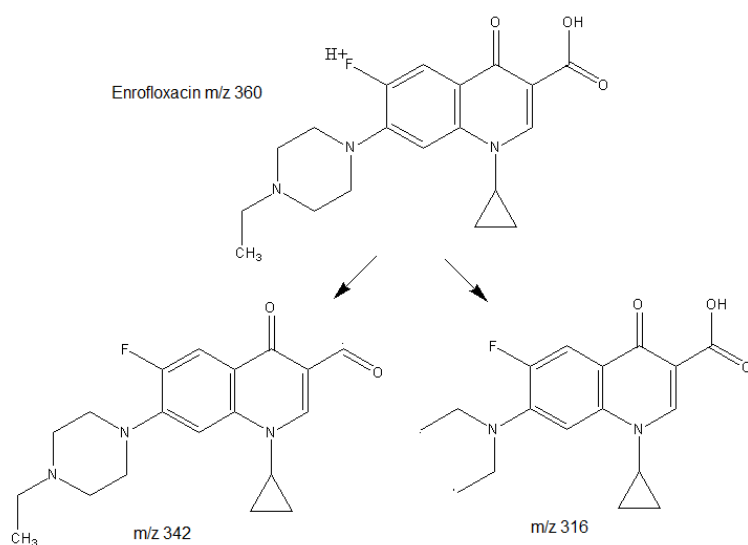
Σχήμα 9.9: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Danofloxacin.



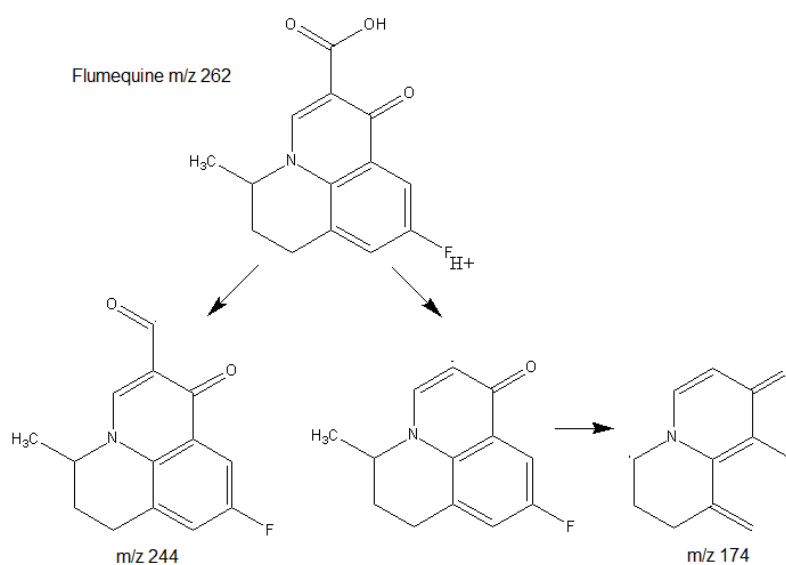
Σχήμα 9.10: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Diquat.



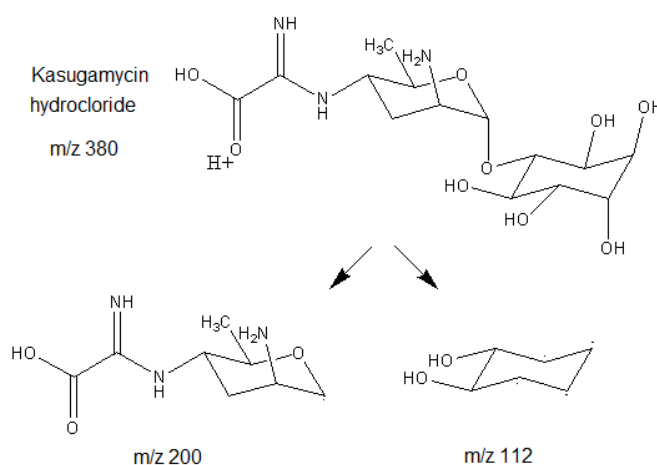
Σχήμα 9.11: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Doxycycline hyclate.



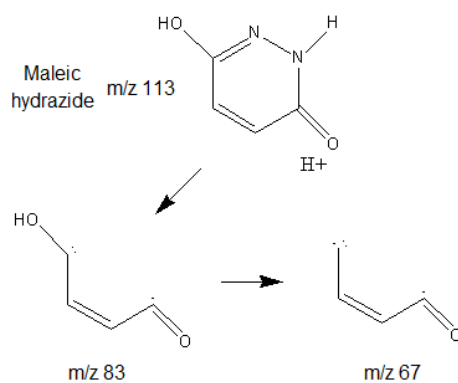
Σχήμα 9.12: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Enrofloxacin.



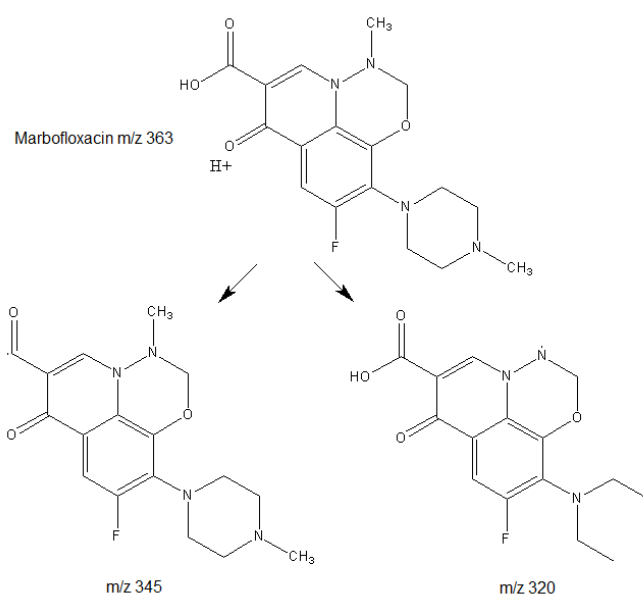
Σχήμα 9.13: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της *Flumequine*.



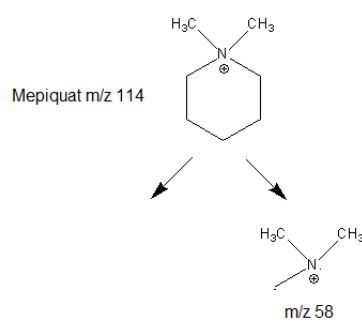
Σχήμα 9.14: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της *Kasugamycin hydrochloride*.



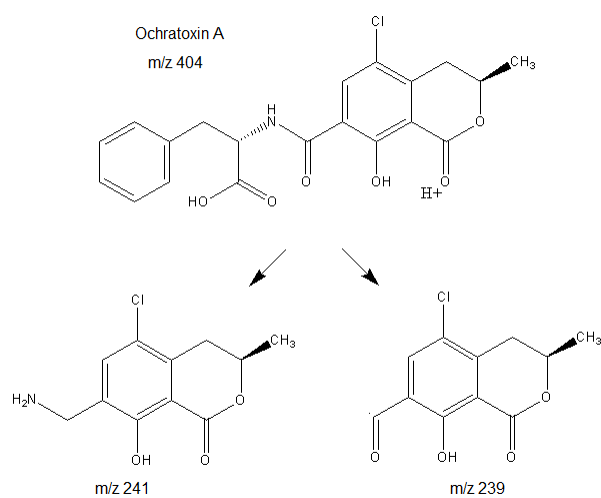
Σχήμα 9.15: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της *Maleic hydrazide*.



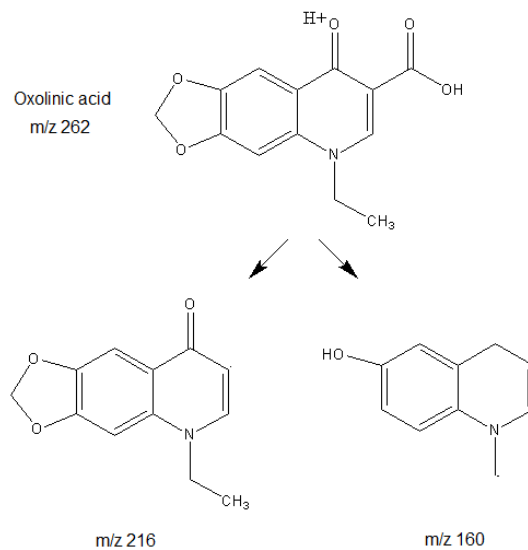
Σχήμα 9.16: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων της Marbofloxacin.



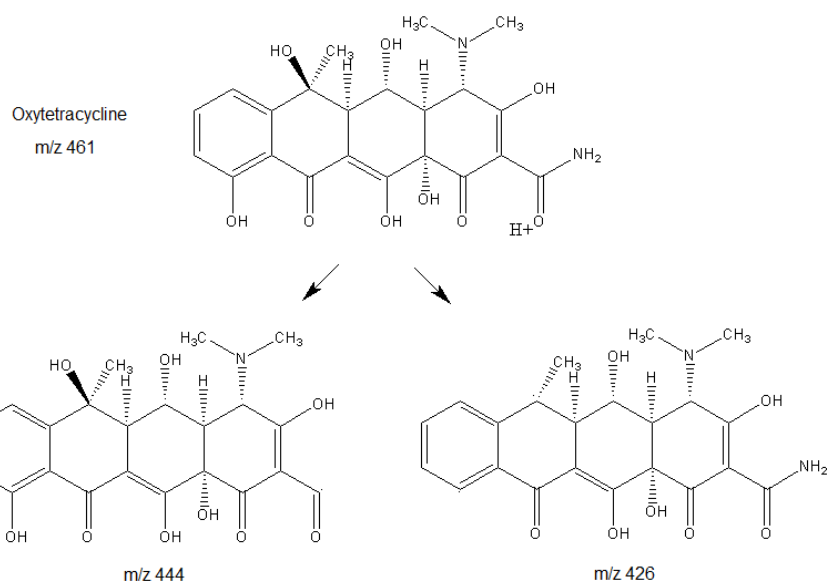
Σχήμα 9.17: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Mepiquat.



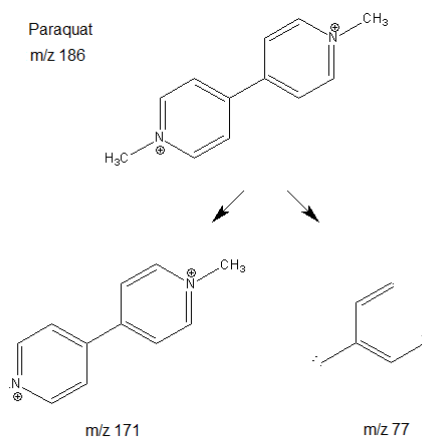
Σχήμα 9.18: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Ochratoxin A.



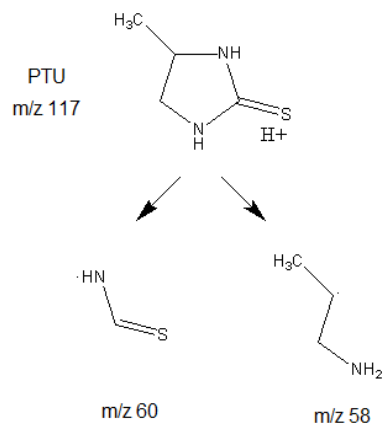
Σχήμα 9.19: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Oxolinic acid.



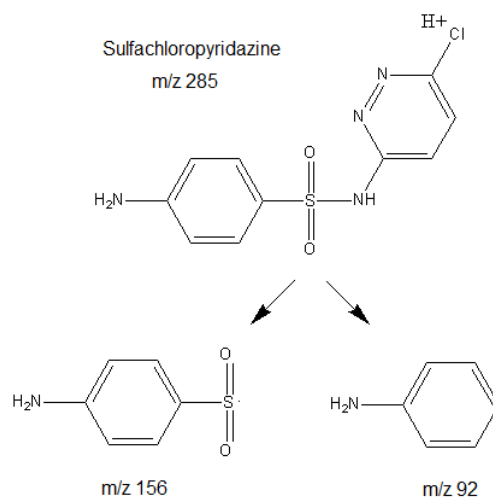
Σχήμα 9.20: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Oxytetracycline.



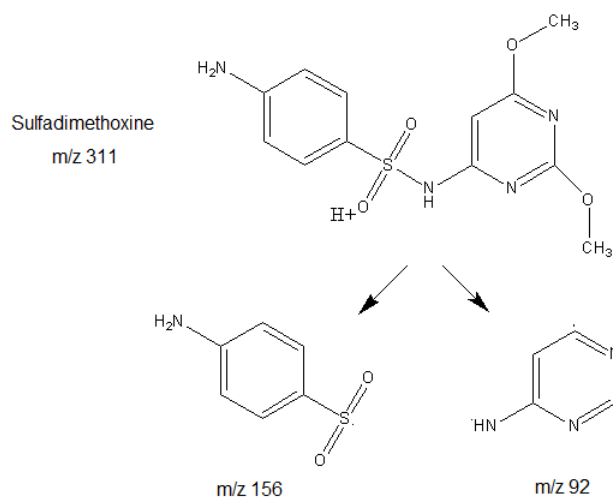
Σχήμα 9.21: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Paraquat.



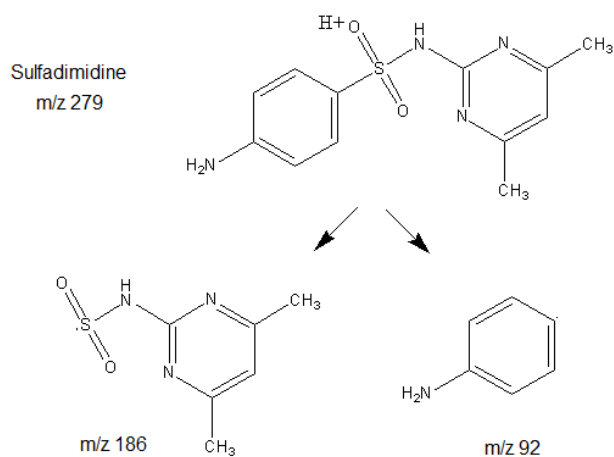
Σχήμα 9.22: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του PTU.



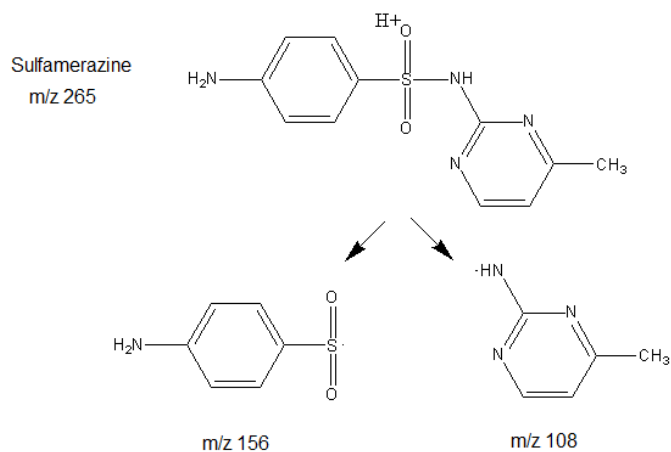
Σχήμα 9.23: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Sulfachloropyridazine.



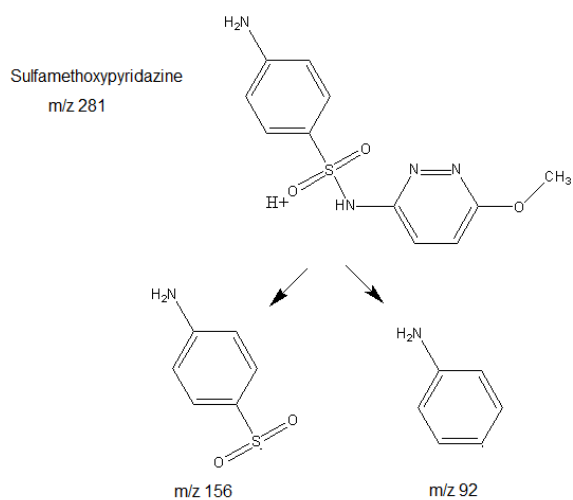
Σχήμα 9.24: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Sulfadimethoxine.



Σχήμα 9.25: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Sulfadimidine.



Σχήμα 9.26: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Sulfamerazine.



Σχήμα 9.27: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Sulfamethoxypyridazine.

Η βελτιστοποίηση που έγινε είναι μονοπαραμετρική καθώς μεταβάλλεται η τιμή μιας παραμέτρου κάθε φορά και μετά γίνεται εκ νέου έγχυση της ουσίας. Η τιμή της παραμέτρου που δίνει το μεγαλύτερο εμβαδό κορυφής της ουσίας στο ολικό χρωματογράφημα (Total Ion Chromatograph) ιόντων το οποίο λαμβάνεται την ώρα της ένεσης είναι και η βέλτιστη.

Σύμφωνα με την απόφαση της Ευρωπαϊκής Ένωσης 657/2002/EC, για την επιβεβαίωση των ουσιών της ομάδας Α του παραρτήματος Ι της οδηγίας 96/23/EK, απαιτούνται τουλάχιστον 4 μονάδες ταυτοποίησης. Στην περίπτωσή μας (τεχνική LC-MS/MS) που υπάρχουν ένα πρόδρομο ιόν και 2 θυγατρικά οι μονάδες ταυτοποίησης για κάθε παραγόμενο ιόν είναι 1,5. Άρα και για τις δύο μεταπτώσεις από ένα πρόδρομο οι συνολικές μονάδες ταυτοποίησης είναι 4 (1,5+1,5+1), το 1 προέρχεται από το πρόδρομο ιόν. Σε κάθε αναλύτη επιλέγονται δύο προϊόντα ιόντα, το ένα για ταυτοποίηση και το άλλο για ποσοτικοποίηση. Επιπλέον επιβεβαίωση της ένωσης γίνεται και με το λόγο των εντάσεων των m/z των δύο προϊόντων ιόντων.

Εκτός των άλλων στα πειράματα βελτιστοποίησης εξετάστηκαν οι εξής τιμές για τη θερμοκρασία του ξηραντικού αερίου 270 °C, 300 °C, 320 °C και 350 °C. Έτσι, από τις δοκιμές προέκυψαν οι εξής βέλτιστες παράμετροι του ESI-MS/MS:

- Θερμοκρασία ξηραντικού αερίου: 320 °C
- Q1 Mass peak width: 3,0 amu
- Q3 Mass peak width: 1,5 amu
- Πίεση αερίου θραυσματοποίησης: 1,5 mTorr
- Αέριο ξήρανσης: 18 psi
- Αέριο εκνέφωσης: 45 psi

9.3 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ

Αφού καθορίστηκαν οι τελικές παράμετροι του συστήματος φασματομετρίας μαζών πραγματοποιήθηκαν δοκιμές στο χρωματογραφικό σύστημα ώστε να γίνει επιλογή της βέλτιστης χρωματογραφίας για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ουσιών. Διάφορα προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης εξετάστηκαν με αρχικό ποσοστό οργανικού διαλύτη (B) 75%-80%-85%-90%-95% ώστε να βρεθεί η βέλτιστη αναλογία οργανικού διαλύτη. Στο τέλος έχει προστεθεί και μία περίοδος 6 min για την εξισορρόπηση της στήλης για την επόμενη ένεση. Επίσης δοκιμάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις HCOONH_4 στον διαλύτη (A) 5-25-50-75 mM. Ακόμη δοκιμάστηκαν

οι εξής τιμές για τη θερμοκρασία της στήλης: 30 °C, 35 °C και 40 °C και οι εξής τιμές για την ροή της κινητής φάσης: 0,4, 0,5, 0,6, 0,7 και 0,8 mL/min. Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων που εξετάστηκαν είναι οι εξής:

Κινητή φάση: A: H₂O (100 v/v) – 50 mM HCOONH₄

B: CH₃CN / H₂O (90:10 v/v)

Ροή της κινητής φάσης: 0,5 mL/min

Θερμοκρασία στήλης: 35 °C

Τύπος πηγής: ESI+

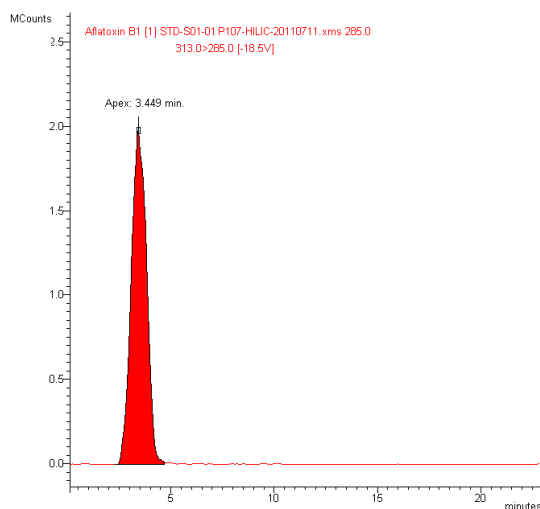
Όπως προαναφέρθηκε πρόκειται για μονοπαραμετρική βελτιστοποίηση. Η τιμή της παραμέτρου που δίνει το μεγαλύτερο εμβαδό κορυφής της ουσίας στο ολικό χρωματογράφημα (Total Ion Chromatograph) ιόντων το οποίο λαμβάνεται την ώρα της ένεσης είναι και η βέλτιστη.

Το τελικό πρόγραμμα διαρκεί 23 min συμπεριλαμβανομένων 6 min για την εξισορρόπηση της στήλης. Ο διαχωρισμός των αναλυτών είναι ικανοποιητικός. Το τελικό πρόγραμμα έκλουσης των ουσιών που μελετήθηκαν παρουσιάζεται στον πίνακα 9.2.

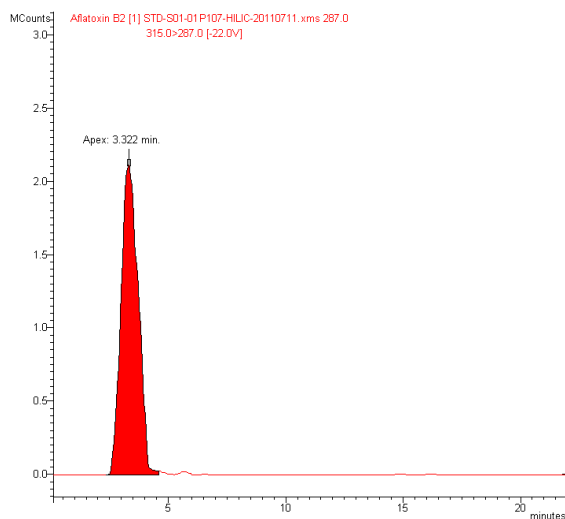
Πίνακας 9.2: Συνθήκες χρωματογραφικού συστήματος

Χρόνος (min)	% A: H ₂ O (100 v/v) – 50 mM HCOONH ₄	%B: CH ₃ CN / H ₂ O (90:10 v/v)	Ροή κινητής φάσης (mL/min)
0:00	20,0	80,0	0,5
1:00	20,0	80,0	0,5
10:00	90,0	10,0	0,5
17:00	90,0	10,0	0,5
17:06	20,0	80,0	0,5
23:00	20,0	80,0	0,5

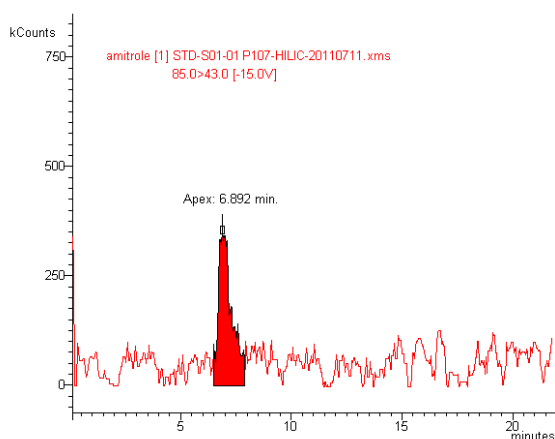
Στη συνέχεια παρουσιάζονται ανακατασκευές χρωματογραφήματων για τις ουσίες που εξετάστηκαν σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L (Εικόνες 9.1 – 9.28).



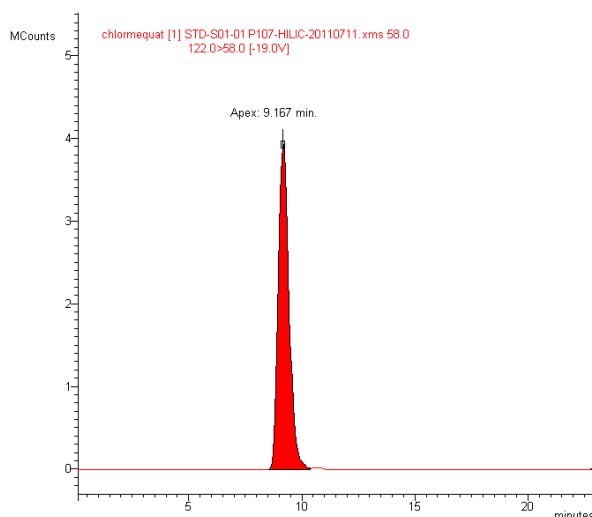
Εικόνα 9.1: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Aflatoxin B1 σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,449$ min



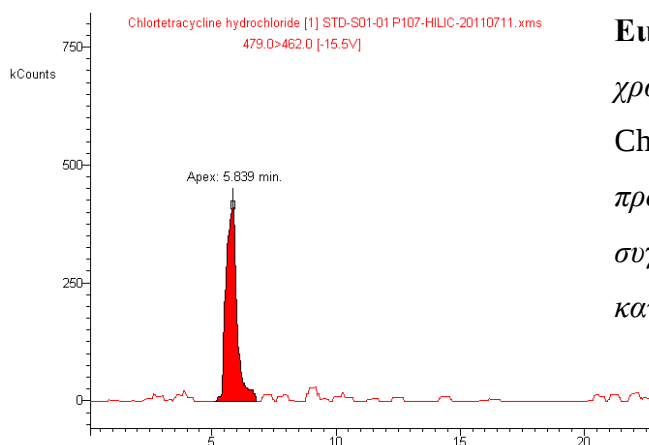
Εικόνα 9.2: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Aflatoxin B2 σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,322$ min



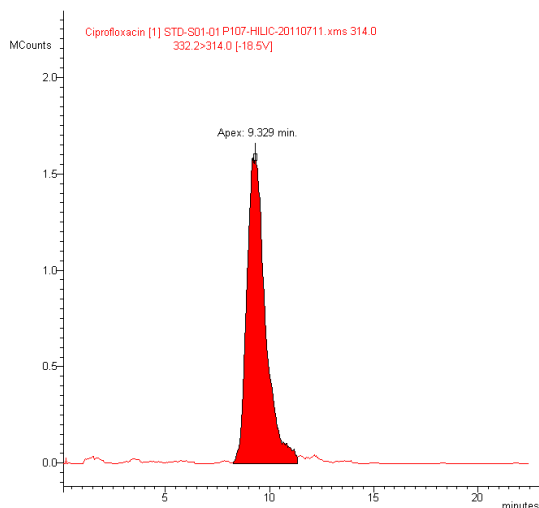
Εικόνα 9.3: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Amitrole σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 6,892$ min



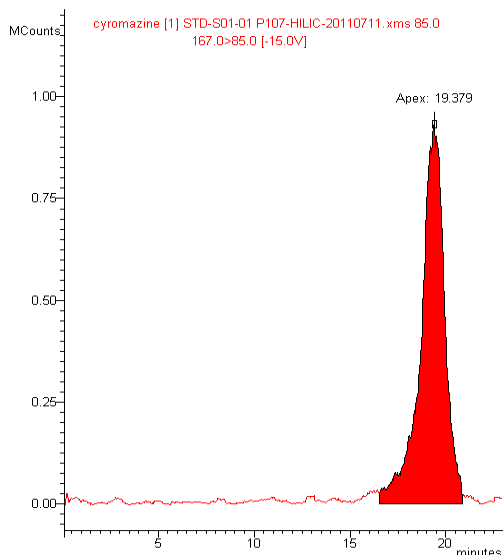
Εικόνα 9.4: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Chlormequat σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 9,167$ min



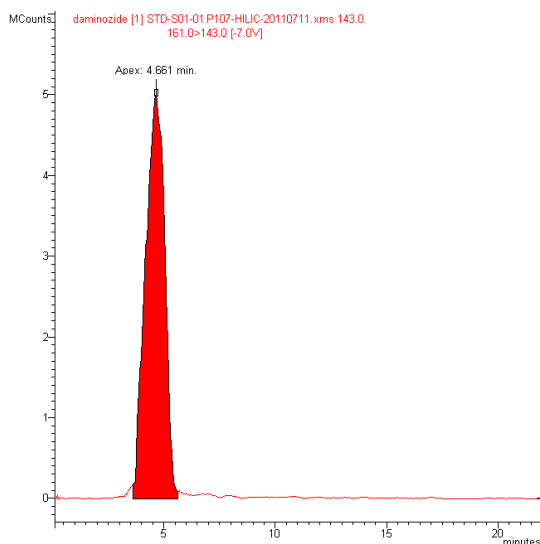
Εικόνα 9.5: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Chlortetracycline hydrochloride σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 5,839$ min



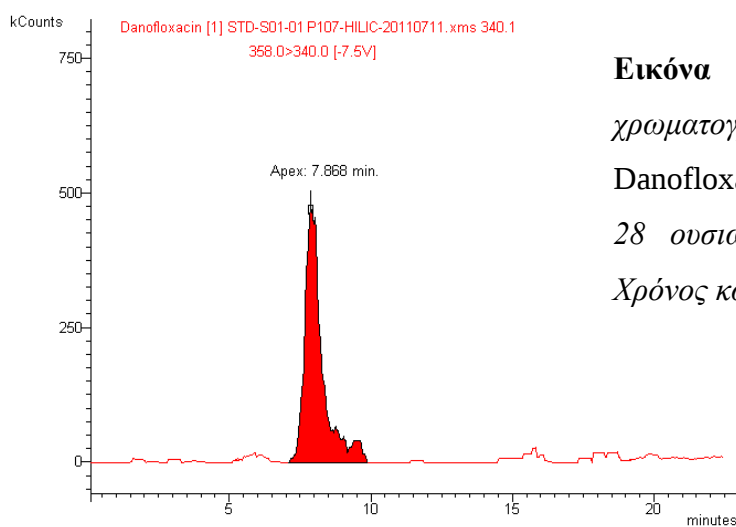
Εικόνα 9.6: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Ciprofloxacin σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 9,329$ min



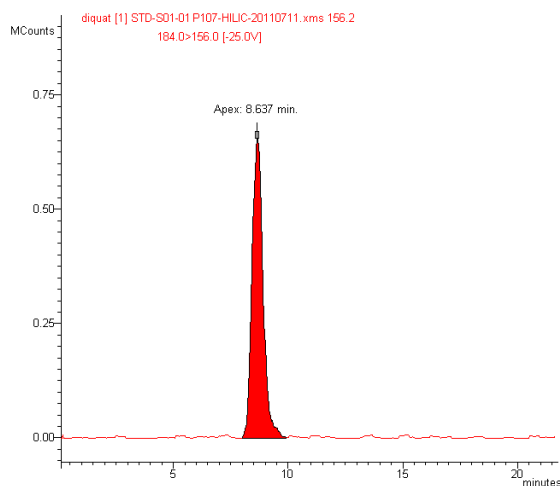
Εικόνα 9.7: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Cyromazine σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 19,379$ min



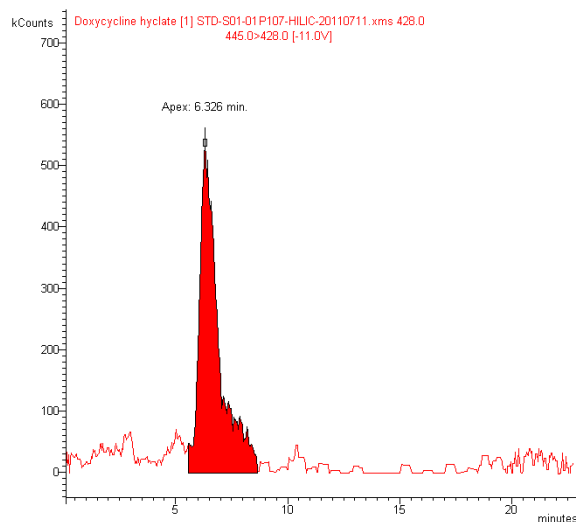
Εικόνα 9.8: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Daminozide σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 4,661$ min



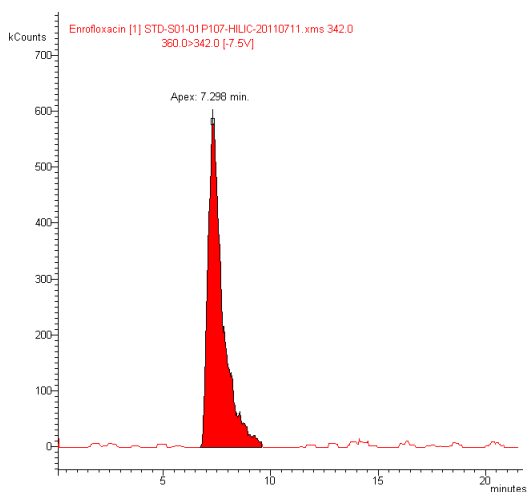
Εικόνα 9.9: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Danofloxacin σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 7,868$ min



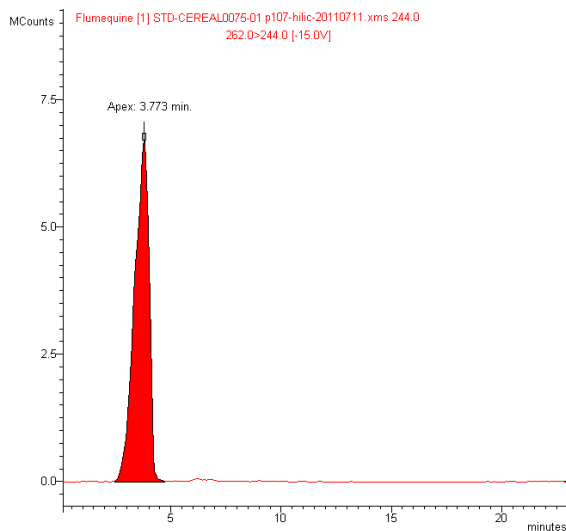
Εικόνα 9.10: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Diquat σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 8,637$ min



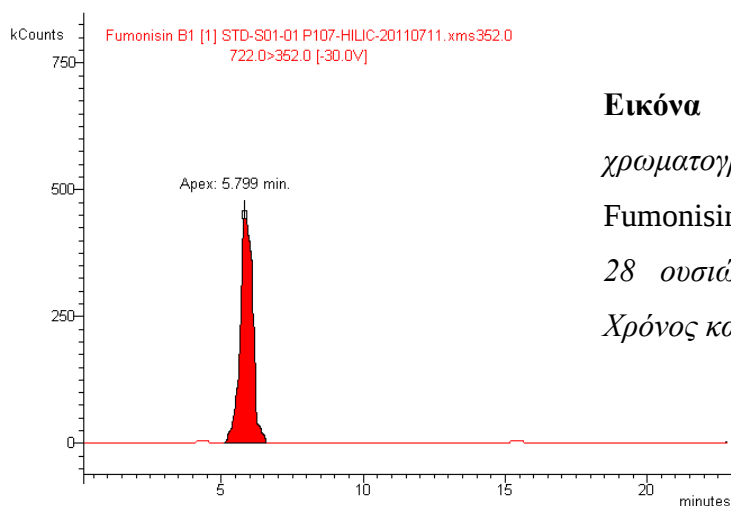
Εικόνα 9.11: : Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Doxycycline hyclate σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 6,326$ min



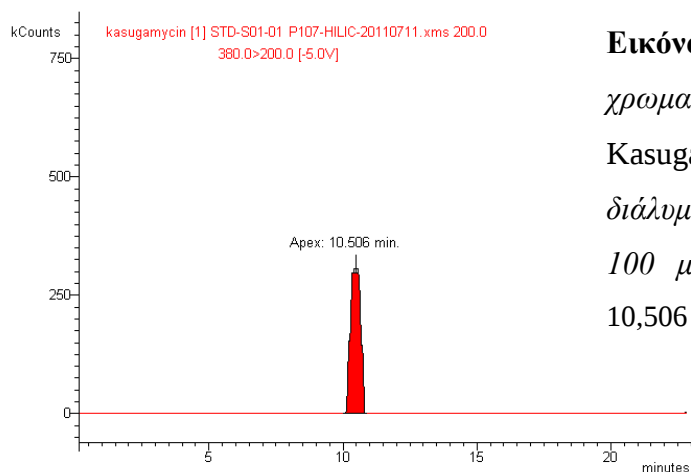
Εικόνα 9.12: : Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Enrofloxacin σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 7,298$ min



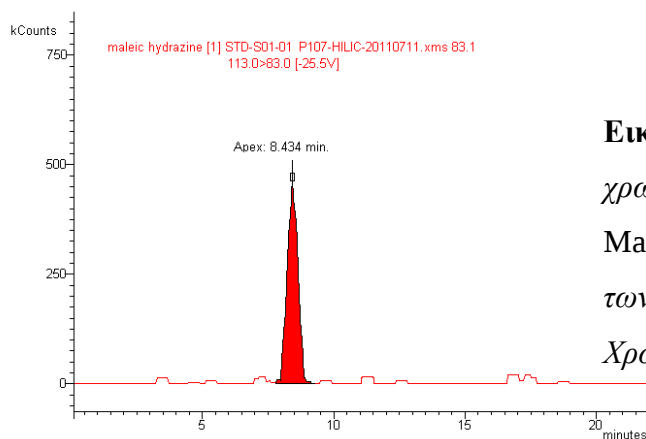
Εικόνα 9.13: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Flumequine σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,773$ min



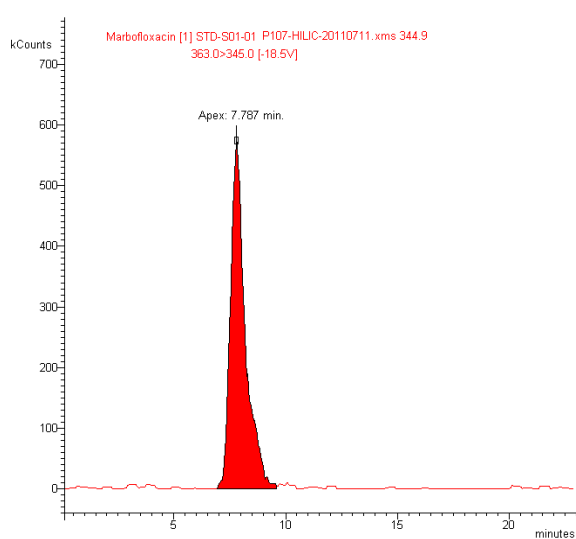
Εικόνα 9.14: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Fumonisin B1 σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 5,799$ min



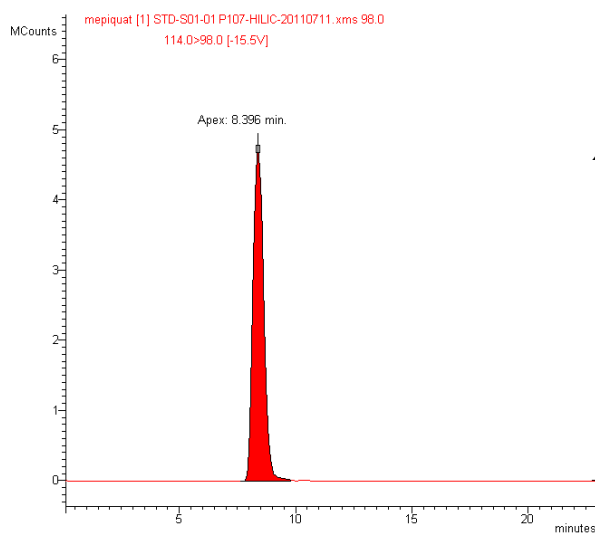
Εικόνα 9.15: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Kasugamycin hydrochloride σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 10,506$ min



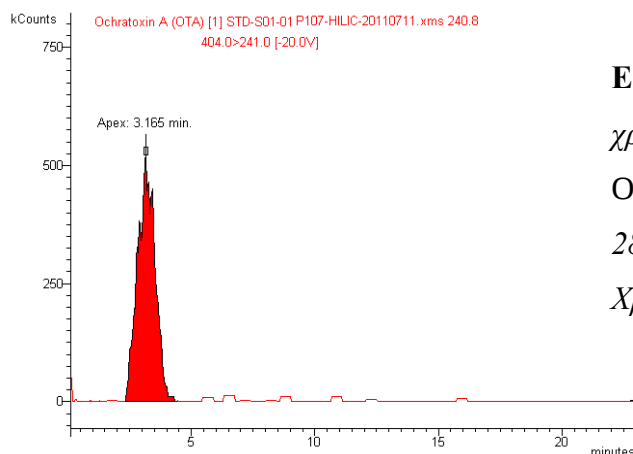
Εικόνα 9.16: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Maleic hydrazide σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 8,434$ min



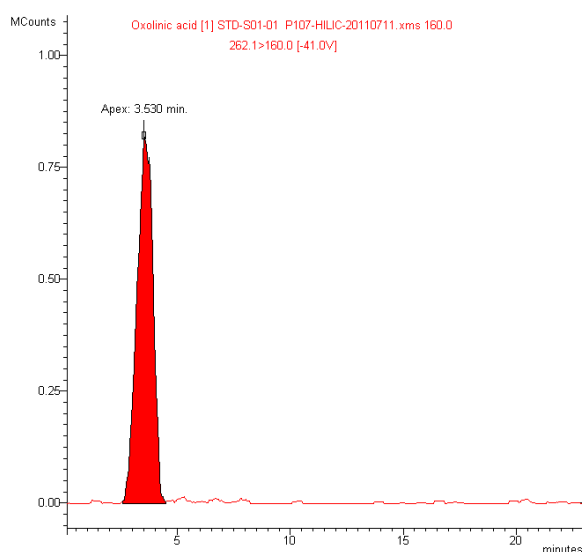
Εικόνα 9.17: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Marbofloxacin σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 7,787$ min



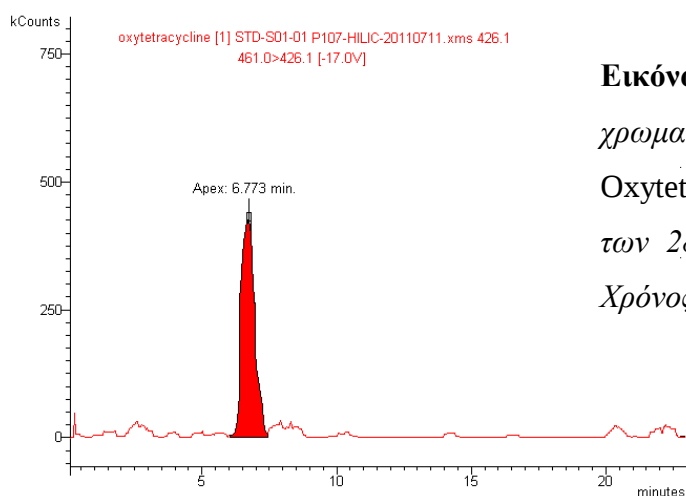
Εικόνα 9.18: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Mepiquat σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 8,396$ min



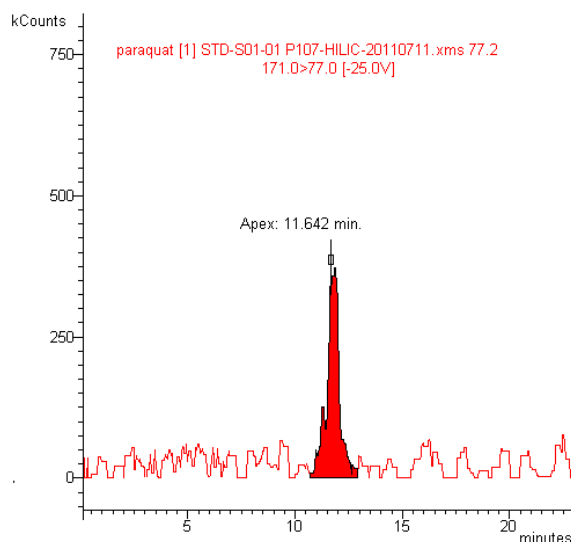
Εικόνα 9.19: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Ochratoxin A σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R=3,165$ min



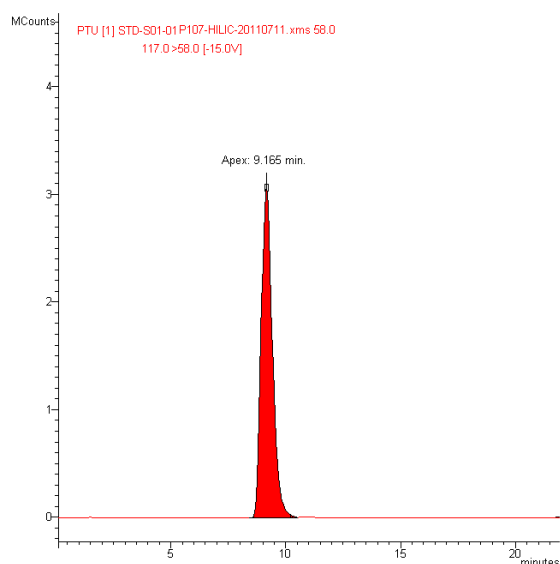
Εικόνα 9.20: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Oxolinic acid σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R= 3,530$ min



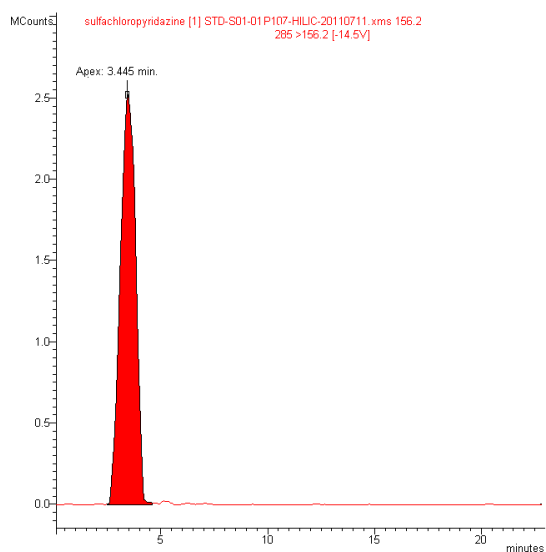
Εικόνα 9.21: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Oxytetracycline σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R= 6,773$ min



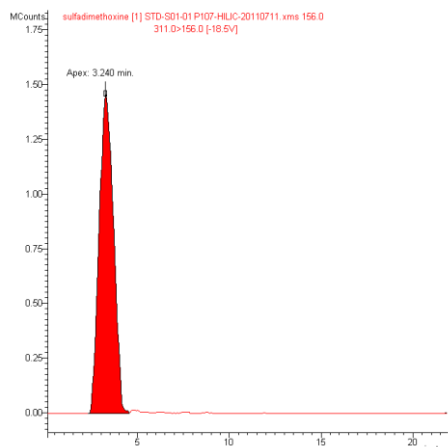
Εικόνα 9.22: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Paraquat σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 11,642$ min



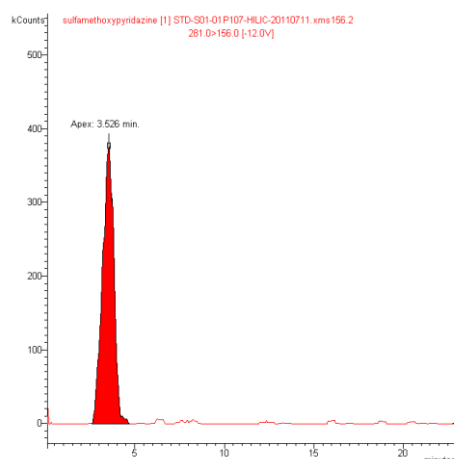
Εικόνα 9.23: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία PTU [propylenethiourea] σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 9,165$ min



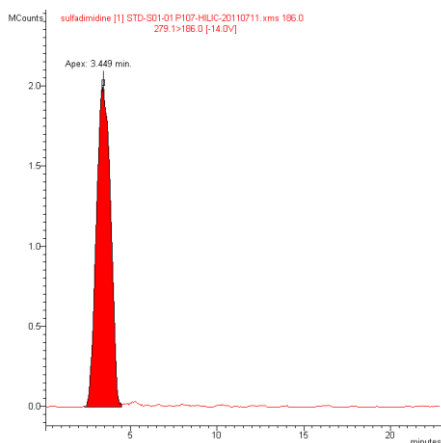
Εικόνα 9.24: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Sulfachloropyridazine σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,445$ min



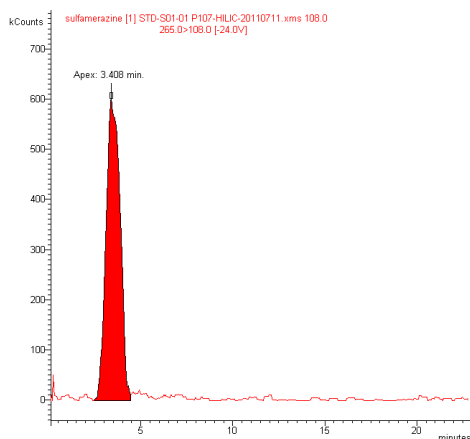
Εικόνα 9.25: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Sulfadimethoxine σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,240$ min



Εικόνα 9.26: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Sulfadimidine σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,449$ min



Εικόνα 9.27: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Sulfamerazine σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,408$ min



Εικόνα 9.28: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Sulfamethoxypyridazine σε πρότυπο διάλυμα των 28 ουσιών συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,526$ min

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10ο ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ LC-MS/MS ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΥΤΟΠΡΑΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ, ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

10.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η επικύρωση της μεθόδου αναφέρεται στην επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων (τεκμηρίων), ότι η μέθοδος ικανοποιεί τις ιδιαίτερες απαιτήσεις για τη συγκεκριμένη σκοπούμενη χρήση. Πιο αναλυτικά επικύρωση είναι η αξιολόγηση των χαρακτηριστικών ποιότητας της μεθόδου μέσω πειραματικής τεκμηρίωσης και η εξέταση της ανταπόκρισής της προς προδιαγραφές (specifications) για να αποδειχθεί ότι είναι κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται (fitness for purpose).

Κατά την επικύρωση της μεθόδου για τον προσδιορισμό των ουσιών, (μετά από σειρά πειραμάτων) μελετήθηκαν τα εξής χαρακτηριστικά ποιότητας: γραμμικότητα (linearity), πιστότητα (precision) υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (repeatability), ακρίβεια (accuracy), όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD), όριο ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) και ο παράγοντας μήτρας (matrix factor). Η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις και τα κριτήρια επίδοσης που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση στην οδηγία της SANCO/12495/2011.

10.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ

Η γραμμικότητα της μεθόδου αποδεικνύεται με οπτική εξέταση του διαγράμματος αναλυτικό σήμα προς συγκέντρωση ή περιεκτικότητα του αναλύτη και αξιολογείται με στατιστικές μεθόδους όπως ο υπολογισμός της εξίσωσης της ευθείας παλινδρόμησης με την μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Η γραμμικότητα εξετάζεται σε όλο το εύρος (range) της περιοχής συγκεντρώσεων της αναλυτικής μεθόδου.

Έγινε εκτίμηση της δυναμικής περιοχής της καμπύλης βαθμονόμησης σε πρότυπα διαλύματα σε διαλύτη (standard solutions) και σε πρότυπα διαλύματα σε μήτρα (matrix-matched solutions). Προσδιορίστηκε με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων η ευθεία παλινδρόμησης της μορφής $y = (b \pm S_b) x + (a \pm S_a)$, η τυπική απόκλιση της τομής S_a , η τυπική απόκλιση της κλίσης S_b και οι συντελεστές συσχέτισης r^2 . Στην εξίσωση παλινδρόμησης που προκύπτει το y αντιστοιχεί στο εμβαδόν της κορυφής του αναλύτη και το x στην συγκέντρωσή του, εκφρασμένη σε

mg/L. Για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς, καταγράφεται το εμβαδό από την ολοκλήρωση του σήματος του ιόντος ποσοτικοποίησης της κάθε ένωσης ως προς τη συγκέντρωση της κάθε ένωσης.

Πιο συγκεκριμένα η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς για τα πρότυπα σε διαλύτη μελετήθηκε στις συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 25, 50, 75 και 100 µg/L σε νερό-μεθανόλη, (50:50 v/v). Για κάθε πρότυπο πραγματοποιήθηκαν εννέα ενέσεις στο σύστημα LC-MS/MS.

Η γραμμικότητα της καμπύλης αναφοράς για τα πρότυπα σε μήτρα (για όλα τα υποστρώματα) μελετήθηκε στις συγκεντρώσεις 2, 5, 10, 25, 50, 75 και 100 µg/L. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 10.1.

Πίνακας 10.1: Αποτελέσματα γραμμικότητας και της καμπύλης βαθμονόμησης για τα πρότυπα σε διαλύτη [Γραμμική περιοχή 2-100 µg/L, εκτός των Amitrole και Paraquat που είναι 25-100 µg/L και Doxycycline hyclate που είναι 5-100 µg/L]

Αναλύτης	Κλίση, ($b \pm S_b$) ($\times 10^7$)	Τομή στον άξονα y, ($a \pm S_a$) ($\times 10^5$)	Συντελεστής Συσχέτισης (r^2)
Aflatoxin B1	91,0 $\pm$ 3,1	26,0 $\pm$ 16,0	0,994
Aflatoxin B2	100,0 $\pm$ 2,6	24,0 $\pm$ 14,0	0,997
Amitrole	1,7 $\pm$ 1,5	3,7 $\pm$ 0,8	0,965
Chlormequat	120,0 $\pm$ 3,3	28,0 $\pm$ 17,0	0,996
Chlortetracycline hydrochloride	0,8 $\pm$ 0,05	-0,03 $\pm$ 0,3	0,980
Ciprofloxacin	65,0 $\pm$ 1,0	0,6 $\pm$ 5,4	0,999
Cyromazine	120,0 $\pm$ 4,2	17,0 $\pm$ 22,0	0,994
Daminozide	430,0 $\pm$ 17,0	240,0 $\pm$ 87,0	0,992
Danofloxacin	2,6 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,2	0,999
Diquat	20,0 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 1,9	0,998
Doxycycline hyclate	6,0 $\pm$ 0,06	2,3 $\pm$ 0,3	0,999
Enrofloxacin	6,9 $\pm$ 0,4	4,3 $\pm$ 2,0	0,985
Flumequine	790,0 $\pm$ 21,0	160,0 $\pm$ 110,0	0,996
Fumonisin B1	1,0 $\pm$ 0,1	-0,2 $\pm$ 0,5	0,985
Kasugamycin hydrochloride	0,3 $\pm$ 0,05	0,07 $\pm$ 0,2	0,903
Maleic hydrazide	2,8 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,9	0,981
Marbofloxacin	20,0 $\pm$ 0,3	-1,8 $\pm$ 1,8	0,999
Mepiquat	150,0 $\pm$ 1,8	38,0 $\pm$ 9,5	0,999
Ochratoxin A	3,7 $\pm$ 0,2	-1,4 $\pm$ 0,8	0,992

Oxolinic acid	34,0 ± 1,2	13,0 ± 6,2	0,994
Oxytetracycline	3,7 ± 0,08	1,1 ± 0,4	0,998
Paraquat	2,7 ± 0,1	1,4 ± 0,7	0,987
PTU [propylenethiourea]	94,0 ± 2,3	13,0 ± 12,0	0,997
Sulfachloropyridazine	120,0 ± 6,2	63,0 ± 32,0	0,987
Sulfadimethoxine	78,0 ± 3,9	34,0 ± 20,0	0,988
Sulfadimidine	130,0 ± 3,4	40,0 ± 17,0	0,997
Sulfamerazine	29,0 ± 0,9	14,0 ± 4,9	0,995
Sulfamethoxypyridazine	20,0 ± 0,8	8,3 ± 4,0	0,992

Πίνακας 10.2: Αποτελέσματα γραμμικότητας για τα πρότυπα σε μήτρα (μήλα, βερίκοκα, μαρούλια, κρεμμύδια και παιδικές τροφές)

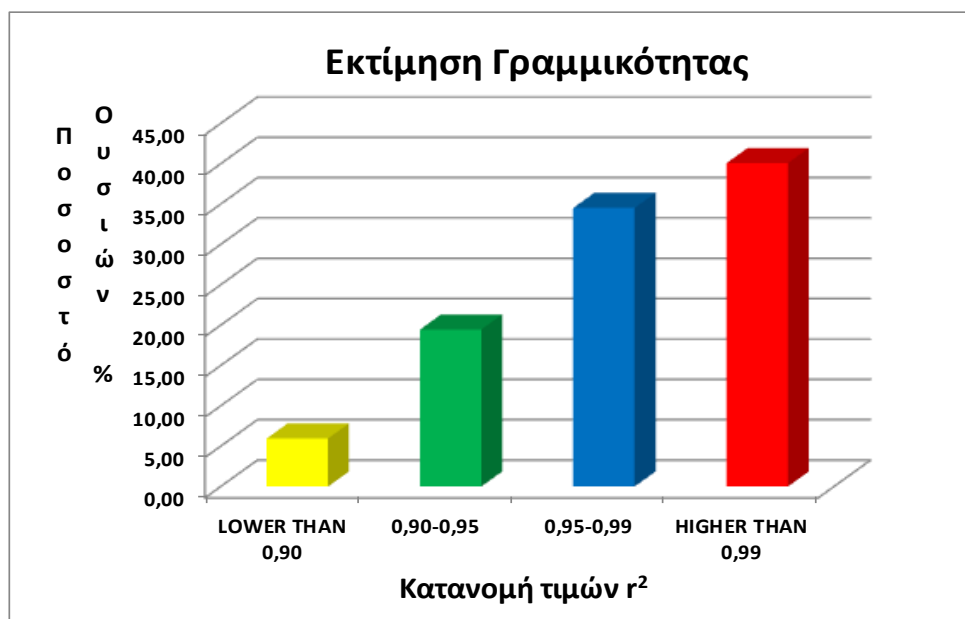
Αναλύτης	Συντελεστής Συσχέτισης (r ²)				
	Μήλα	Βερίκοκα	Μαρούλια	Κρεμμύδια	Παιδικές τροφές
Aflatoxin B1	0,993	0,989	0,990	0,995	0,998
Aflatoxin B2	0,987	0,996	0,984	0,996	0,997
Amitrole	0,827	0,912	0,989	0,862	0,403
Chlormequat	0,993	0,981	0,985	0,997	0,987
Chlortetracycline hydrochloride	0,998	0,992	0,970	0,999	0,963
Ciprofloxacin	0,989	0,993	0,997	0,990	0,965
Cyromazine	0,977	0,991	0,930	0,996	0,961
Daminozide	0,995	0,989	0,998	0,999	0,999
Danofloxacin	0,968	0,986	0,931	0,931	0,851
Diquat	0,993	0,964	0,985	0,994	0,944
Doxycycline hyclate	0,999	0,996	0,993	0,994	0,970
Enrofloxacin	0,987	0,997	0,943	0,962	0,985
Flumequine	0,988	0,992	0,998	0,994	0,999
Fumonisin B1	0,999	0,971	0,972	0,981	0,994
Kasugamycin hydrochloride	0,761	0,917	0,923	0,900	0,548
Maleic hydrazide	0,957	0,990	0,902	0,961	0,822
Marbofloxacin	0,996	0,992	0,983	0,997	0,988
Mepiquat	0,987	0,988	0,982	0,998	0,998
Ochratoxin A	0,914	0,975	0,981	0,946	0,902
Oxolinic acid	0,993	0,981	0,996	0,995	0,998

Oxytetracycline	0,995	0,980	0,930	0,999	0,997
Paraquat	0,391	0,907	0,904	0,403	0,545
PTU [propylenethiourea]	0,993	0,981	0,981	0,997	0,987
Sulfachloropyridazine	0,991	0,980	0,996	0,993	0,988
Sulfadimethoxine	0,997	0,988	0,994	0,995	0,998
Sulfadimidine	0,990	0,994	0,991	0,996	0,994
Sulfamerazine	0,989	0,997	0,998	0,981	0,992
Sulfamethoxypyridazine	0,985	0,984	0,980	0,894	0,958

Πίνακας 10.3: Αποτελέσματα γραμμικότητας για τα πρότυπα σε μήτρα (δημητριακά (αλεύρι), όσπρια (ρεβύθια), γάλα και κρέας)

Αναλύτης	Συντελεστής Συσχέτισης (r ²)			
	Δημητριακά	Όσπρια	Γάλα	Κρέας
Aflatoxin B1	0,997	0,996	0,974	0,998
Aflatoxin B2	0,995	0,996	0,981	0,999
Amitrole	0,924	0,580	0,941	0,574
Chlormequat	0,980	0,983	0,944	0,988
Chlortetracycline hydrochloride	0,957	0,910	0,917	0,928
Ciprofloxacin	0,971	0,988	0,915	0,998
Cyromazine	0,990	0,959	0,913	0,954
Daminozide	0,974	0,999	0,981	0,995
Danofloxacin	0,973	0,915	0,906	0,917
Diquat	0,986	0,917	0,923	0,980
Doxycycline hyclate	0,926	0,909	0,904	0,913
Enrofloxacin	0,937	0,957	0,910	0,962
Flumequine	0,998	0,994	0,918	0,997
Fumonisin B1	0,986	0,935	0,919	0,922
Kasugamycin hydrochloride	0,743	0,978	0,537	0,897
Maleic hydrazide	0,997	0,929	0,925	0,905
Marbofloxacin	0,901	0,999	0,902	0,972
Mepiquat	0,909	0,995	0,984	0,996
Ochratoxin A	0,952	0,898	0,919	0,900
Oxolinic acid	0,997	0,991	0,926	0,996
Oxytetracycline	0,952	0,905	0,909	0,945
Paraquat	0,944	0,547	0,473	0,378

PTU [propylenethiourea]	0,970	0,913	0,945	0,988
Sulfachloropyridazine	0,993	0,996	0,954	0,995
Sulfadimethoxine	0,994	0,994	0,966	0,997
Sulfadimidine	0,998	0,996	0,970	0,999
Sulfamerazine	0,975	0,985	0,916	0,997
Sulfamethoxypyridazine	0,983	0,991	0,966	0,992



Σχήμα 10.1: Εκτίμηση της γραμμικότητας για τα πρότυπα σε μήτρα διαγραμματικά

Παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ουσιών εμφανίζει τιμές r^2 μεγαλύτερες του 0,90.

10.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ (ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ)

Η ακρίβεια (accuracy) αφορά τη διαφορά μεταξύ του μέσου όρου μιας σειράς μετρήσεων και της τιμής που γίνεται αποδεκτή ως αληθής ή ορθή τιμή της μετρούμενης ποσότητας. Η αληθής τιμή λαμβάνεται: α) ως η ποσότητα που προστίθεται σε ειδικά παρασκευασμένο (εμβολιασμένο) δείγμα, β) από το αποτελέσματα άλλης μεθόδου (γνωστής ορθότητας και ακρίβειας), γ) από το υλικό αναφοράς (γνωστής αποδεκτής σύνθεσης). Οι κυριότεροι περιορισμοί στην ακρίβεια προέρχονται από: α) τα τυχαία σφάλματα και β) τα συστηματικά σφάλματα μίας αναλυτικής μεθόδου. Μία ακριβής μέτρηση θεωρείται αυτή που στερείται συστηματικού σφάλματος και είναι επαναλήψιμη.

Η ακρίβεια της μεθόδου μπορεί να εκφραστεί ως η επί τις εκατό (%) ανάκτηση (%Recovery) της γνωστής ποσότητας των υπό προσδιορισμό ουσιών που προστέθηκε στο δείγμα. Η επί τις εκατό ανάκτηση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\% R = ((C_{\text{πειρ}} / C_{\text{εμβ}}) \times 100 \text{ (εξίσωση 9.4)})$$

Όπου:

$C_{\text{πειρ}}$: η συγκέντρωση της υπό προσδιορισμό ουσίας στο εμβολιασμένο δείγμα

$C_{\text{εμβ}}$: η συγκέντρωση εμβολιασμού

Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των ουσιών στα εμβολιασμένα δείγματα ($C_{\text{πειρ}}$) είναι η τεχνική του εγκλωβισμού (bracketing). Σύμφωνα με την τεχνική αυτή η επιφάνεια της κορυφής κάθε ουσίας του εκλούσματος του εμβολιασμένου δείγματος «εγκλωβίζεται» ανάμεσα στις δύο πιο κοντινές τιμές των επιφανειών των κορυφών που δίνουν δύο πρότυπα διαλύματα.

Η ακρίβεια (ορθότητα) της μεθόδου εξετάστηκε σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης των ουσιών που μελετήθηκαν, σε εννέα διαφορετικά υποστρώματα (Πίνακες 10.4 – 10.8).

Πίνακας 10.4: Μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού (1^ο επίπεδο εμβολιασμού 0,01 mg/kg και 2^ο επίπεδο εμβολιασμού 0,1 mg/kg) σε υπόστρωμα μύλων και βερίκοκων (N=5).

Αναλύτης	Μήλα		Βερίκοκα	
	Μέση Τιμή Ανάκτησης %		Μέση Τιμή Ανάκτησης %	
	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg
Aflatoxin B1	97,1	81,0	91,3	110,8
Aflatoxin B2	90,0	87,8	90,5	109,0
Amitrole	77,6	68,1	105,1	89,6
Chlormequat	93,7	91,1	72,7	87,8
Chlortetracycline hydrochloride	48,8	81,1	118,6	119,8
Ciprofloxacin	84,3	89,0	90,4	118,7
Cyromazine	118,5	96,8	74,4	97,1
Daminozide	114,4	100,9	96,8	107,0
Danofloxacin	102,7	120,2	62,3	66,3
Diquat	117,9	93,3	117,6	119,1
Doxycycline hyclate	71,3	81,7	89,1	114,8
Enrofloxacin	101,0	89,7	137,1	141,1

Flumequine	99,4	86,1	85,4	108,1
Fumonisin B1	115,7	105,7	89,0	104,1
Kasugamycin hydrochloride	65,6	62,7	54,9	51,3
Maleic hydrazide	87,1	74,3	104,8	103,6
Marbofloxacin	87,3	95,1	95,3	121,4
Mepiquat	93,4	92,4	78,0	81,7
Ochratoxin A	119,3	91,1	98,7	116,7
Oxolinic acid	86,2	86,3	109,7	108,0
Oxytetracycline	78,7	89,1	119,7	105,3
Paraquat	55,7	61,3	158,4	152,3
PTU [propylenethiourea]	93,1	92,6	74,8	88,5
Sulfachloropyridazine	76,1	61,7	82,2	116,7
Sulfadimethoxine	71,0	63,2	108,1	115,7
Sulfadimidine	67,5	64,5	69,8	109,8
Sulfamerazine	82,4	67,8	106,2	127,4
Sulfamethoxypyridazine	75,6	89,4	103,0	120,5

Πίνακας 10.5: Μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα μαρουλιών και κρεμμυδιών (N=5).

Αναλύτης	Μαρούλια		Κρεμμύδια	
	Μέση Τιμή Ανάκτησης %		Μέση Τιμή Ανάκτησης %	
	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg
Aflatoxin B1	118,0	110,0	100,7	77,7
Aflatoxin B2	117,7	114,4	73,1	87,5
Amitrole	156,0	122,5	102,9	79,3
Chlormequat	107,0	116,0	109,2	117,6
Chlortetracycline hydrochloride	118,0	113,7	85,3	94,3
Ciprofloxacin	83,7	111,6	98,3	94,0
Cyromazine	114,7	114,4	86,1	119,1
Daminozide	107,3	117,0	77,5	89,6
Danofloxacin	156,3	74,0	57,8	114,9
Diquat	88,3	96,1	119,2	73,4
Doxycycline hyclate	96,0	105,0	108,1	122,2
Enrofloxacin	96,3	83,2	100,4	123,1
Flumequine	102,8	125,9	97,9	123,4
Fumonisin B1	112,4	129,1	92,2	117,1

Kasugamycin hydrochloride	62,5	123,1	47,8	61,4
Maleic hydrazide	70,2	103,5	113,2	114,9
Marbofloxacin	93,9	106,3	104,3	136,3
Mepiquat	99,3	111,3	81,4	83,5
Ochratoxin A	79,1	90,0	94,0	70,4
Oxolinic acid	98,6	128,8	60,6	67,4
Oxytetracycline	61,8	107,9	83,1	75,6
Paraquat	144,2	130,1	139,1	118,9
PTU [propylenethiourea]	79,4	118,6	109,4	117,6
Sulfachloropyridazine	107,9	130,1	72,4	94,0
Sulfadimethoxine	105,7	130,8	67,8	79,1
Sulfadimidine	113,3	126,2	68,9	88,9
Sulfamerazine	106,3	134,4	106,8	100,1
Sulfamethoxypyridazine	67,4	111,1	95,7	76,6

Πίνακας 10.6: Μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για τα δύο επίπεδα εμφολιασμού σε υπόστρωμα παιδικών τροφών (N=5).

Αναλύτης	Παιδικές τροφές	
	Μέση Τιμή Ανάκτησης %	
	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg
Aflatoxin B1	117,4	96,9
Aflatoxin B2	88,5	90,9
Amitrole	103,5	134,2
Chlormequat	83,0	87,0
Chlortetracycline hydrochloride	91,2	107,2
Ciprofloxacin	71,1	86,5
Cyromazine	114,7	117,9
Daminozide	112,7	99,4
Danofloxacin	101,3	110,7
Diquat	73,0	109,4
Doxycycline hyclate	104,3	94,5
Enrofloxacin	78,3	98,1
Flumequine	105,5	90,3
Fumonisin B1	93,2	117,9
Kasugamycin hydrochloride	167,1	84,8
Maleic hydrazide	73,3	90,8

Marbofloxacin	130,6	92,9
Mepiquat	101,9	96,3
Ochratoxin A	113,1	87,8
Oxolinic acid	102,6	94,5
Oxytetracycline	136,7	111,7
Paraquat	82,9	69,7
PTU [propylenethiourea]	83,2	86,2
Sulfachloropyridazine	62,4	89,1
Sulfadimethoxine	107,5	85,0
Sulfadimidine	110,0	82,2
Sulfamerazine	99,3	85,4
Sulfamethoxypyridazine	137,7	111,9

Πίνακας 10.7: Μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα δημητριακών (αλεύρι) και οσπρίων (ρεβύθια) (N=5).

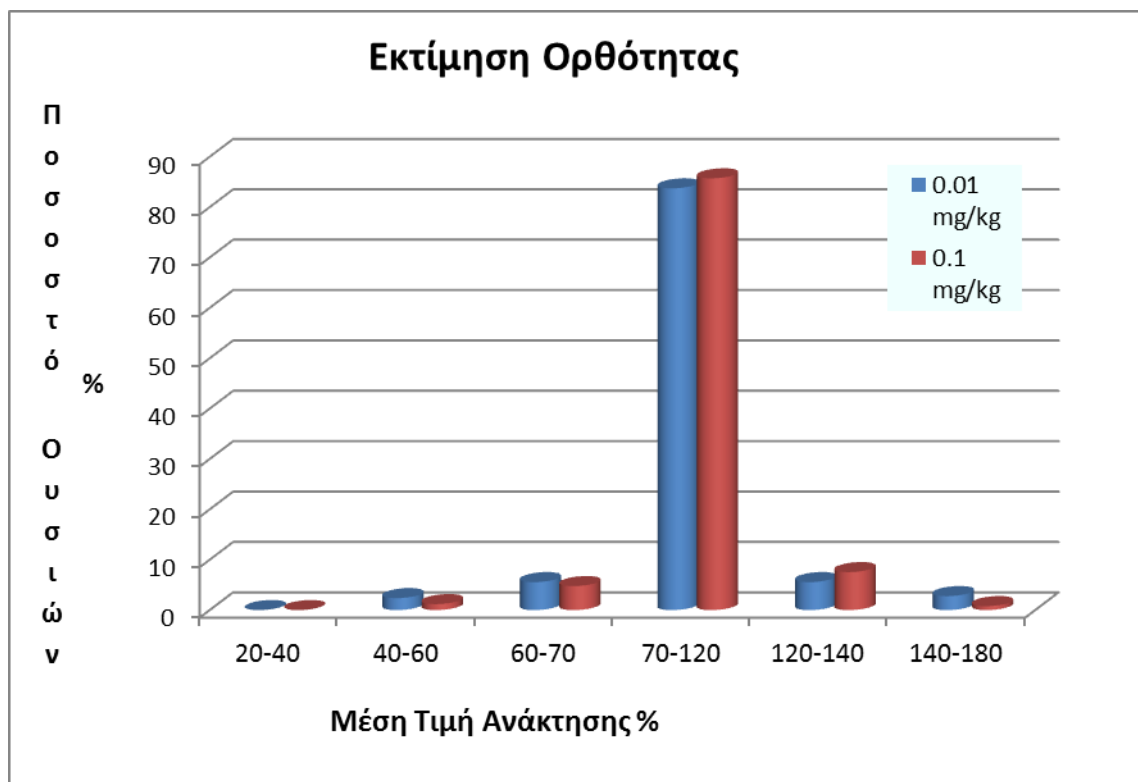
Αναλύτης	Δημητριακά		Όσπρια	
	Μέση Τιμή Ανάκτησης %		Μέση Τιμή Ανάκτησης %	
	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg
Aflatoxin B1	78,9	71,3	109,7	101,7
Aflatoxin B2	74,6	78,2	115,6	102,9
Amitrole	132,6	115,6	124,4	63,6
Chlormequat	108,5	115,3	119,3	89,5
Chlortetracycline hydrochloride	89,8	118,1	75,0	113,7
Ciprofloxacin	117,9	94,5	102,5	84,6
Cyromazine	113,7	116,0	86,5	116,3
Daminozide	119,1	113,4	112,9	114,8
Danofloxacin	119,1	80,3	124,9	109,0
Diquat	118,5	108,8	75,1	86,3
Doxycycline hyclate	118,8	108,2	130,8	105,8
Enrofloxacin	98,3	113,8	108,8	58,7
Flumequine	95,7	85,2	109,8	86,1
Fumonisin B1	112,5	77,1	112,6	108,8
Kasugamycin hydrochloride	102,9	80,4	41,3	81,6
Maleic hydrazide	90,3	105,1	77,3	76,5

Marbofloxacin	110,3	119,3	94,3	84,3
Mepiquat	118,6	117,3	99,0	92,6
Ochratoxin A	113,1	114,1	113,4	73,1
Oxolinic acid	92,0	90,6	70,0	91,7
Oxytetracycline	79,3	117,1	101,6	108,2
Paraquat	109,4	118,5	71,7	106,4
PTU [propylenethiourea]	102,8	106,8	119,8	109,7
Sulfachloropyridazine	61,9	84,1	126,3	99,0
Sulfadimethoxine	116,8	70,9	78,1	97,2
Sulfadimidine	113,1	104,0	122,6	104,6
Sulfamerazine	114,9	96,5	96,0	99,1
Sulfamethoxypyridazine	71,3	110,6	116,8	70,8

Πίνακας 10.8: Μέση τιμή των ανακτήσεων των αναλυτών για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα γάλακτος και κρέατος (χοιρινός κιμάς) (N=5).

Αναλύτης	Γάλα		Κρέας	
	Μέση Τιμή Ανάκτησης %		Μέση Τιμή Ανάκτησης %	
	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg
Aflatoxin B1	103,8	113,1	103,2	118,1
Aflatoxin B2	72,9	114,7	106,1	113,1
Amitrole	130,9	106,5	125,2	110,1
Chlormequat	66,7	92,0	77,4	117,1
Chlortetracycline hydrochloride	108,1	107,1	73,7	77,4
Ciprofloxacin	109,3	109,9	93,2	109,8
Cyromazine	118,3	113,4	77,9	98,8
Daminozide	74,3	113,9	94,5	118,5
Danofloxacin	109,7	72,9	109,3	108,7
Diquat	114,1	110,8	93,4	87,3
Doxycycline hyclate	103,1	109,1	107,1	87,8
Enrofloxacin	109,8	103,2	103,7	86,8
Flumequine	100,2	107,7	101,3	103,1
Fumonisin B1	117,7	98,5	101,2	81,0
Kasugamycin hydrochloride	169,3	118,3	176,9	107,6
Maleic hydrazide	89,5	97,1	85,5	106,3

Marbofloxacin	83,1	103,7	95,5	107,1
Mepiquat	110,9	110,6	100,1	103,0
Ochratoxin A	73,1	93,7	109,8	98,0
Oxolinic acid	107,3	106,7	104,0	107,7
Oxytetracycline	107,2	83,4	109,1	103,4
Paraquat	95,4	108,0	126,6	59,3
PTU [propylenethiourea]	113,7	92,2	76,7	117,1
Sulfachloropyridazine	107,1	90,8	97,9	103,7
Sulfadimethoxine	109,7	100,6	89,8	104,7
Sulfadimidine	108,7	93,1	102,5	107,1
Sulfamerazine	103,8	102,3	103,4	107,9
Sulfamethoxypyridazine	107,9	83,2	104,1	109,1



Σχήμα 10.2: Εκτίμηση της ορθότητας για όλες τις ουσίες και για όλα τα υποστρώματα διαγραμματικά

Στο Σχήμα 10.2 παρατηρούμε ότι το μεγαλύτερο ποσοστό των ουσιών και στα δύο επίπεδα (ελαφρά μεγαλύτερο στο επίπεδο των 0,1mg/kg) έχει ποσοστά ανακτήσεων 70-120%.

10.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΠΙΣΤΟΤΗΤΑΣ

Η πιστότητα εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας (εγγύτητας) μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό ρητά καθορισμένες (προκαθορισμένες) συνθήκες. Ως παράμετρος ποιότητας της ανάλυσης, η πιστότητα μπορεί ποιοτικά να περιγραφεί ως η ποσότητα που μετρά τη διασπορά (dispersion) (μη πιστότητα) των αποτελεσμάτων, όταν η αναλυτική μεθοδολογία επαναλαμβάνεται σε ένα δείγμα. Η διασπορά των αποτελεσμάτων μπορεί να προκαλείται από πολλές πηγές και βρίσκεται γύρω από την αναμενόμενη τιμή του αποτελέσματος εάν δεν υπάρχει συστηματικό σφάλμα. Η πιστότητα μίας αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται με την τυπική απόκλιση μιας σειράς αποτελεσμάτων που λαμβάνονται από ένα δείγμα υπό καθορισμένες συνθήκες, τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας όσο και υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας.

Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα αποτελούν υποσύνολα του όρου πιστότητα. Επαναληψιμότητα (Repeatability) είναι η πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, δηλαδή το μέτρο της διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες, δηλαδή ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο και βραχύ χρονικό διάστημα.

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης. Έγιναν πέντε επαναληπτικά δείγματα τα οποία εγχύθηκαν στο υδροχρωματογραφικό σύστημα κατά την ίδια εργαστηριακή μέρα. Στη συνέχεια υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (Standard Deviation, SD) (εξίσωση 9.1)

$$SD = \pm \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\bar{x} - x_i)^2}{n-1}} \quad (9.1)$$

και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (%Relative Standard Deviation, %RSD) (εξίσωση 9.2)

$$\%RSD = \frac{SD \times 100}{\bar{x}} \quad (9.2)$$

για κάθε υπό εξέταση ουσία. Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας δίνονται στους πίνακες 10.9 – 10.17.

Πίνακας 10.9: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα μήλων (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	16,4	16,9	4,6	5,7
Aflatoxin B2	14,9	16,5	5,8	6,7
Amitrole	15,0	19,3	6,7	9,7
Chlormequat	11,2	11,9	2,5	2,8
Chlortetracycline hydrochloride	6,8	14,0	6,5	8,0
Ciprofloxacin	10,1	12,0	2,5	2,8
Cyromazine	10,2	7,5	4,4	4,5
Daminozide	12,2	10,7	5,3	5,3
Danofloxacin	20,4	19,8	10,5	8,7
Diquat	18,6	15,8	5,7	6,1
Doxycycline hyclate	13,7	19,2	4,5	5,5
Enrofloxacin	18,0	17,8	4,3	4,8
Flumequine	16,9	16,9	2,5	2,8
Fumonisin B1	17,1	14,8	12,9	12,2
Kasugamycin hydrochloride	12,1	18,5	14,5	23,1
Maleic hydrazide	17,2	19,7	4,3	5,8
Marbofloxacin	13,4	15,4	3,5	3,6
Mepiquat	9,7	10,3	3,5	3,8
Ochratoxin A	15,74	13,2	5,1	5,7
Oxolinic acid	9,5	11,0	10,2	11,8
Oxytetracycline	10,9	13,9	4,8	5,3
Paraquat	14,6	26,2	2,4	6,6
PTU [propylenethiourea]	10,5	11,3	3,0	3,2
Sulfachloropyridazine	11,0	14,5	2,5	4,0
Sulfadimethoxine	5,8	8,1	4,5	7,1
Sulfadimidine	4,0	5,9	4,0	6,3
Sulfamerazine	14,7	17,8	7,4	11,0
Sulfamethoxypyridazine	8,5	11,3	7,1	7,9

Πίνακας 10.10: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα βερίκοκων (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	12,2	13,4	6,2	5,5
Aflatoxin B2	15,4	17,1	7,9	7,3
Amitrole	15,2	14,4	16,5	18,4
Chlormequat	11,1	15,3	8,9	10,2
Chlortetracycline hydrochloride	23,4	17,3	18,1	15,1
Ciprofloxacin	5,2	5,8	4,4	3,7
Cyromazine	7,8	10,5	3,7	3,8
Daminozide	7,3	7,6	4,4	4,1
Danofloxacin	11,5	18,5	2,3	3,5
Diquat	8,3	7,1	2,5	2,1
Doxycycline hyclate	12,9	14,4	10,5	9,1
Enrofloxacin	12,4	9,0	6,4	4,6
Flumequine	3,7	4,4	4,7	4,3
Fumonisin B1	16,3	18,3	13,8	13,3
Kasugamycin hydrochloride	16,0	29,1	7,4	14,4
Maleic hydrazide	16,5	15,8	8,4	8,1
Marbofloxacin	6,2	6,5	2,6	2,1
Mepiquat	11,3	14,5	7,5	9,2
Ochratoxin A	7,2	7,2	13,7	11,7
Oxolinic acid	14,2	12,9	10,0	9,3
Oxytetracycline	20,0	16,7	16,6	15,8
Paraquat	19,0	12,0	10,8	7,1
PTU [propylenethiourea]	10,0	13,4	9,0	10,2
Sulfachloropyridazine	5,6	6,8	6,4	5,5
Sulfadimethoxine	7,7	7,1	13,4	11,6
Sulfadimidine	11,5	16,4	6,8	6,2
Sulfamerazine	17,6	16,5	16,7	13,0
Sulfamethoxypyridazine	22,1	21,3	5,4	4,5

Πίνακας 10.11: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα μαρουλιών (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	15,9	13,5	3,5	3,2
Aflatoxin B2	15,0	13,4	7,6	6,6
Amitrole	14,2	9,1	11,8	9,6
Chlormequat	15,9	14,8	12,7	10,9
Chlortetracycline hydrochloride	14,8	12,6	4,7	4,1
Ciprofloxacin	6,5	7,8	9,0	8,1
Cyromazine	19,0	16,5	19,8	17,3
Daminozide	15,6	14,5	10,7	9,1
Danofloxacin	16,9	29,9	22,1	10,9
Diquat	12,6	14,3	14,2	14,8
Doxycycline hyclate	10,0	23,1	24,3	10,4
Enrofloxacin	26,1	27,0	19,9	23,9
Flumequine	8,8	8,5	4,6	3,6
Fumonisin B1	21,7	19,3	18,0	14,0
Kasugamycin hydrochloride	39,4	63,1	42,6	34,6
Maleic hydrazide	10,9	15,5	9,7	9,3
Marbofloxacin	11,0	11,8	11,9	11,2
Mepiquat	3,8	3,9	8,4	7,5
Ochratoxin A	13,5	17,1	9,8	10,9
Oxolinic acid	16,0	16,2	5,0	3,9
Oxytetracycline	8,9	14,4	18,1	16,7
Paraquat	25,1	17,4	28,6	22,0
PTU [propylenethiourea]	10,6	13,3	16,3	13,7
Sulfachloropyridazine	6,0	5,5	7,2	5,5
Sulfadimethoxine	6,1	5,8	6,4	4,9
Sulfadimidine	11,3	10,0	9,7	7,7
Sulfamerazine	19,1	17,9	16,7	12,4
Sulfamethoxypyridazine	4,5	6,7	9,6	8,6

Πίνακας 10.12: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα κρεμμυδιών (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	10,0	9,9	6,5	8,4
Aflatoxin B2	11,7	15,9	7,1	8,1
Amitrole	13,8	13,4	24,9	31,4
Chlormequat	18,2	16,7	20,9	17,7
Chlortetracycline hydrochloride	11,4	13,4	12,0	12,7
Ciprofloxacin	19,1	19,4	16,6	17,7
Cyromazine	15,8	18,4	11,1	9,2
Daminozide	4,2	5,4	13,1	14,6
Danofloxacin	5,7	29,3	33,7	9,9
Diquat	11,4	9,6	10,8	14,7
Doxycycline hyclate	1,8	1,7	18,9	15,5
Enrofloxacin	2,4	2,4	7,4	6,0
Flumequine	2,2	2,2	5,1	4,1
Fumonisin B1	17,4	18,9	20,3	17,3
Kasugamycin hydrochloride	1,3	2,8	7,5	12,2
Maleic hydrazide	13,6	12,0	18,1	15,4
Marbofloxacin	7,9	7,6	19,1	14,0
Mepiquat	10,8	13,3	9,5	11,4
Ochratoxin A	5,9	6,3	11,8	16,7
Oxolinic acid	10,3	17,0	13,0	19,3
Oxytetracycline	3,8	4,6	13,2	17,5
Paraquat	35,5	25,5	35,9	30,2
PTU [propylenethiourea]	21,0	19,2	21,1	17,9
Sulfachloropyridazine	13,8	22,3	21,0	19,0
Sulfadimethoxine	12,5	18,5	13,4	16,9
Sulfadimidine	4,2	20,6	18,3	7,1
Sulfamerazine	12,7	11,9	15,2	15,2
Sulfamethoxypyridazine	5,9	6,1	14,7	19,1

Πίνακας 10.13: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα παιδικών τροφών (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	19,1	16,3	10,1	10,4
Aflatoxin B2	9,8	11,0	7,1	7,8
Amitrole	21,0	20,3	13,5	10,0
Chlormequat	9,2	11,1	4,2	4,8
Chlortetracycline hydrochloride	12,3	13,5	5,4	5,1
Ciprofloxacin	9,2	12,9	6,5	7,5
Cyromazine	8,3	7,3	2,9	2,5
Daminozide	7,3	6,5	3,8	3,8
Danofloxacin	14,3	14,1	9,8	8,9
Diquat	6,3	8,6	7,2	6,5
Doxycycline hyclate	16,3	15,7	9,1	9,6
Enrofloxacin	12,8	16,3	10,2	10,4
Flumequine	6,5	6,1	4,0	4,4
Fumonisin B1	18,1	19,4	11,2	9,5
Kasugamycin hydrochloride	56,3	33,7	35,3	41,6
Maleic hydrazide	13,7	18,7	15,5	17,1
Marbofloxacin	15,2	11,6	7,4	7,9
Mepiquat	12,6	12,4	3,4	3,5
Ochratoxin A	15,0	13,3	12,5	14,2
Oxolinic acid	17,2	16,8	6,5	6,8
Oxytetracycline	19,4	14,2	19,8	17,7
Paraquat	10,0	12,1	7,6	11,0
PTU [propylenethiourea]	8,1	9,7	4,3	5,0
Sulfachloropyridazine	11,9	19,3	13,4	15,0
Sulfadimethoxine	11,7	10,9	8,9	10,5
Sulfadimidine	17,5	15,9	8,9	10,8
Sulfamerazine	10,9	11,0	10,9	12,8
Sulfamethoxypyridazine	12,9	9,4	22,2	19,8

Πίνακας 10.14: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα δημητριακών (αλεύρι) (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	7,3	9,3	6,8	9,6
Aflatoxin B2	7,2	9,7	3,7	4,8
Amitrole	14,8	11,2	17,8	15,4
Chlormequat	12,1	11,1	3,5	3,0
Chlortetracycline hydrochloride	14,2	15,8	16,8	14,2
Ciprofloxacin	8,4	7,1	6,0	6,4
Cyromazine	20,0	17,6	13,8	11,9
Daminozide	19,7	16,5	12,6	11,1
Danofloxacin	15,9	13,3	11,8	14,7
Diquat	22,6	19,1	16,4	15,1
Doxycycline hyclate	19,9	16,7	8,4	7,8
Enrofloxacin	18,5	18,8	20,9	18,3
Flumequine	9,2	9,6	3,5	4,1
Fumonisin B1	19,6	17,4	13,4	17,4
Kasugamycin hydrochloride	30,4	29,5	50,1	62,3
Maleic hydrazide	16,7	18,5	17,6	16,7
Marbofloxacin	18,5	16,7	21,1	17,7
Mepiquat	20,5	17,3	5,7	4,9
Ochratoxin A	19,6	17,3	15,1	13,2
Oxolinic acid	12,9	14,0	10,1	11,1
Oxytetracycline	12,3	15,5	13,3	10,7
Paraquat	5,4	5,0	9,8	8,3
PTU [propylenethiourea]	18,4	17,9	4,1	3,8
Sulfachloropyridazine	10,7	17,3	5,8	6,9
Sulfadimethoxine	3,6	3,1	6,2	8,7
Sulfadimidine	20,7	18,3	2,1	2,0
Sulfamerazine	22,9	14,9	10,9	11,3
Sulfamethoxypyridazine	10,9	15,2	17,3	15,6

Πίνακας 10.15: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα οσπρίων (ρεβύθια) (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	4,5	4,1	6,8	6,7
Aflatoxin B2	18,3	15,8	4,6	4,4
Amitrole	12,7	10,2	2,7	4,3
Chlormequat	10,8	9,1	4,6	5,1
Chlortetracycline hydrochloride	13,6	18,1	19,5	17,1
Ciprofloxacin	8,9	8,7	12,9	15,2
Cyromazine	14,3	16,5	20,1	17,3
Daminozide	5,4	4,8	4,2	3,7
Danofloxacin	22,9	18,4	19,3	17,7
Diquat	3,4	4,5	7,1	8,2
Doxycycline hyclate	15,0	11,5	10,0	9,5
Enrofloxacin	20,3	18,7	10,7	18,2
Flumequine	7,7	7,0	4,8	5,6
Fumonisin B1	20,6	18,3	18,9	17,4
Kasugamycin hydrochloride	19,5	47,4	23,2	28,5
Maleic hydrazide	14,7	19,0	11,5	15,1
Marbofloxacin	7,7	8,2	3,9	4,7
Mepiquat	17,0	17,1	3,3	3,6
Ochratoxin A	20,1	17,7	10,2	16,9
Oxolinic acid	12,8	18,3	6,7	7,3
Oxytetracycline	18,0	17,7	19,4	17,9
Paraquat	6,6	9,3	23,1	21,7
PTU [propylenethiourea]	4,9	4,1	6,8	6,2
Sulfachloropyridazine	18,0	14,3	10,7	10,8
Sulfadimethoxine	12,1	15,5	7,6	7,8
Sulfadimidine	14,2	11,6	9,2	8,7
Sulfamerazine	17,3	18,0	6,9	6,9
Sulfamethoxypyridazine	30,8	26,4	8,9	12,6

Πίνακας 10.16: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα γάλακτος (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	4,9	4,7	10,9	9,7
Aflatoxin B2	9,0	12,3	16,1	14,0
Amitrole	4,7	3,6	15,4	14,4
Chlormequat	8,8	13,2	9,0	9,9
Chlortetracycline hydrochloride	20,2	18,7	20,4	19,0
Ciprofloxacin	20,1	19,1	12,0	10,9
Cyromazine	11,6	9,8	16,7	14,7
Daminozide	7,6	10,2	12,0	10,6
Danofloxacin	19,0	17,4	12,7	17,3
Diquat	20,9	18,3	7,1	6,4
Doxycycline hyclate	18,5	17,9	18,1	16,6
Enrofloxacin	18,8	17,1	18,4	17,8
Flumequine	5,5	5,5	8,6	8,0
Fumonisin B1	22,4	19,0	17,1	17,3
Kasugamycin hydrochloride	84,8	50,1	17,4	14,7
Maleic hydrazide	15,5	17,3	12,2	12,5
Marbofloxacin	2,5	3,0	15,5	15,0
Mepiquat	6,7	6,0	12,8	11,6
Ochratoxin A	12,9	17,7	10,4	11,1
Oxolinic acid	17,3	14,4	13,7	12,8
Oxytetracycline	20,7	19,3	12,5	15,0
Paraquat	7,5	7,8	16,5	15,3
PTU [propylenethiourea]	14,0	12,4	9,1	9,9
Sulfachloropyridazine	1,9	1,7	7,1	7,8
Sulfadimethoxine	5,6	5,1	11,3	11,2
Sulfadimidine	11,9	10,9	6,6	7,1
Sulfamerazine	3,0	2,9	12,5	12,2
Sulfamethoxypyridazine	19,2	17,8	5,7	6,9

Πίνακας 10.17: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα κρέατος (χοιρινός κιμάς) (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Aflatoxin B1	10,3	10,0	8,2	6,9
Aflatoxin B2	11,5	10,5	10,4	9,2
Amitrole	4,6	3,6	12,3	11,1
Chlormequat	13,9	17,9	11,3	9,7
Chlortetracycline hydrochloride	7,0	9,5	3,2	4,1
Ciprofloxacin	11,8	12,6	9,9	9,1
Cyromazine	8,2	10,5	18,3	18,5
Daminozide	3,7	3,9	3,3	2,8
Danofloxacin	12,7	11,7	9,4	8,7
Diquat	15,6	16,7	15,5	17,7
Doxycycline hyclate	18,5	17,3	13,2	15,1
Enrofloxacin	12,7	11,7	6,9	8,0
Flumequine	5,1	5,1	5,9	5,8
Fumonisin B1	18,5	18,3	11,6	14,3
Kasugamycin hydrochloride	0,4	0,2	20,5	19,1
Maleic hydrazide	14,7	17,2	11,6	10,9
Marbofloxacin	16,2	16,9	12,0	9,8
Mepiquat	17,3	17,3	7,5	7,3
Ochratoxin A	20,0	18,2	17,3	17,7
Oxolinic acid	19,6	18,8	7,8	7,2
Oxytetracycline	16,5	15,1	17,9	17,3
Paraquat	20,3	16,0	17,0	28,6
PTU [propylenethiourea]	12,7	16,5	4,6	3,9
Sulfachloropyridazine	10,2	10,4	8,4	8,1
Sulfadimethoxine	15,4	17,5	7,6	5,7
Sulfadimidine	8,3	8,1	10,6	9,9
Sulfamerazine	11,8	11,4	4,5	4,2
Sulfamethoxypyridazine	18,7	17,9	19,5	17,8

10.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Η ανιχνευσιμότητα (detectability) εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με δύο εκφράσεις:

α) Όριο ανιχνεύσεως (Detection Limit, DL ή LOD)

και β) Όριο ποσοτικοποίησης (Quantitation Limit, QL ή LOQ)

Ως όριο ανίχνευσης ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να ανιχνευτεί αξιόπιστα (ή αλλιώς η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 3,3 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού).

Ως όριο ποσοτικοποίησης ορίζεται η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά αξιόπιστα, με αποδεκτή δηλαδή ακρίβεια και ορθότητα (ή αλλιώς η συγκέντρωση του αναλύτη της οποίας το αναλυτικό σήμα διαφέρει από το σήμα του λευκού δείγματος κατά 10 φορές την τυπική απόκλιση του σήματος του λευκού).

Ο ορισμός των δύο αυτών ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα επιτρεπόμενα σφάλματα πρώτου και δευτέρου είδους.

Σύμφωνα με την οδηγία SANCO/12495/2011 ως όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση που έχει επικυρωθεί και πληροί τις προδιαγραφές (RSD<20%, Μέση Ανάκτηση: 70-120%). Συνεπώς το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου με βάση τη SANCO είναι 10 µg/kg.

Ο προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης και την κλίση των καμπυλών αναφοράς (Πίνακες 10.18 – 10.20) δίνεται από τους τύπους:

$$LOD = (3,3 \times S_a) / b \quad (9.3)$$

και

$$LOQ = (10 \times S_a) / b \quad (9.4)$$

Όπου:

S_a : η τυπική απόκλιση της τομής

b : η κλίση της καμπύλης αναφοράς

Πίνακας 10.18: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε υποστρώματα μήλα, βερίκοκα και μαρούλια.

Αναλύτης	Μήλα		Βερίκοκα		Μαρούλια	
	LOD (µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)	LOD (µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)
Aflatoxin B1	0,6	1,9	0,8	2,5	0,8	2,4
Aflatoxin B2	0,9	2,7	0,5	1,5	1,0	2,9
Amitrole	3,5	11	2,4	7,2	0,8	2,5
Chlormequat	0,7	2,0	1,1	3,2	1,0	2,9
Chlortetracycline hydrochloride	0,3	1,0	0,7	2,1	1,4	4,1
Ciprofloxacin	0,8	2,4	0,6	2,0	0,4	1,2
Cyromazine	1,2	3,5	0,7	2,2	2,1	6,4
Daminozide	0,5	1,6	0,8	2,5	0,4	1,1
Danofloxacin	1,4	4,2	0,9	2,8	2,8	8,5
Diquat	0,6	1,9	1,5	4,5	0,9	2,8
Doxycycline hyclate	0,3	0,8	0,5	1,4	0,6	1,9
Enrofloxacin	0,9	2,7	0,4	1,2	11	32,4
Flumequine	0,9	2,6	0,7	2,1	0,4	1,1
Fumonisin B1	0,3	0,9	1,3	4,0	1,3	4,0
Kasugamycin hydrochloride	4,3	13	2,3	7,0	2,2	6,7
Maleic hydrazide	2,6	8,0	0,8	2,4	2,5	7,7
Marbofloxacin	0,5	1,4	0,7	2,1	1,0	3,1
Mepiquat	0,9	2,7	0,9	2,6	1,0	3,1
Ochratoxin A	2,4	7,1	1,2	3,7	1,1	3,3
Oxolinic acid	0,6	1,9	1,1	3,3	0,5	1,5
Oxytetracycline	0,6	1,7	1,1	3,3	2,1	6,4
Paraquat	9,6	29	0,6	1,7	2,5	7,6
PTU [propylenethiourea]	0,6	1,9	1,1	3,2	1,1	3,3
Sulfachloropyridazine	0,8	2,3	1,1	3,3	0,5	1,5
Sulfadimethoxine	0,5	1,4	0,8	2,5	0,6	1,8
Sulfadimidine	0,8	2,3	0,6	1,8	0,7	2,3
Sulfamerazine	0,8	2,4	0,5	1,4	0,3	0,9
Sulfamethoxypyridazine	1,0	2,9	1,0	3,0	3,8	11

Πίνακας 10.19: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου στα υποστρώματα κρεμμύδια, παιδικές τροφές και δημητριακά (αλεύρι).

Αναλύτης	Κρεμμύδια		Παιδικές Τροφές		Δημητριακά (Αλεύρι)	
	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)
Aflatoxin B1	0,4	1,2	0,3	1,0	0,4	1,3
Aflatoxin B2	0,4	1,1	0,5	1,4	0,5	1,7
Amitrole	2,2	6,8	17	53	2,2	6,7
Chlormequat	0,3	0,9	0,9	2,6	1,1	3,4
Chlortetracycline hydrochloride	0,2	0,5	1,5	4,5	1,6	4,9
Ciprofloxacin	0,6	1,7	1,5	4,5	1,3	4,0
Cyromazine	0,4	1,1	1,5	4,7	0,8	2,3
Daminozide	0,2	0,6	0,2	0,5	1,3	3,8
Danofloxacin	1,1	3,3	3,2	9,7	1,3	3,9
Diquat	0,4	1,3	1,9	5,6	1,0	2,8
Doxycycline hyclate	0,5	1,4	1,4	4,1	2,7	6,6
Enrofloxacin	1,1	3,4	0,9	2,8	2,0	6,0
Flumequine	0,4	1,3	0,2	0,6	0,3	1,0
Fumonisin B1	0,8	2,7	0,6	1,8	0,9	2,8
Kasugamycin hydrochloride	1,9	5,7	7,0	21	4,5	14
Maleic hydrazide	1,1	3,4	3,6	11	0,4	1,2
Marbofloxacin	0,3	1,0	0,8	2,5	2,5	7,7
Mepiquat	0,2	0,7	0,3	1,0	2,4	7,4
Ochratoxin A	1,3	4,0	2,5	7,6	1,7	5,2
Oxolinic acid	0,4	1,2	0,4	1,7	0,4	1,2
Oxytetracycline	0,2	0,4	0,4	1,3	3,2	9,6
Paraquat	21	63	7,0	21	1,9	5,7
PTU [propylenethiourea]	0,3	0,9	0,9	2,7	1,4	4,1
Sulfachloropyridazine	0,5	1,4	0,9	2,6	0,6	1,9
Sulfadimethoxine	0,4	1,2	0,3	1,0	0,6	1,7
Sulfadimidine	0,3	1,0	0,6	1,8	0,4	1,1
Sulfamerazine	0,8	2,4	0,7	2,1	1,2	3,7
Sulfamethoxypyridazine	1,9	5,9	1,6	4,9	1,0	3,1

Πίνακας 10.20: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου στα υποστρώματα όσπρια (ρεβύθια), γάλα και κρέας.

Αναλύτης	Όσπρια (ρεβύθια)		Γάλα		Κρέας	
	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)	LOD (μg/Kg)	LOQ (μg/Kg)
Aflatoxin B1	0,5	1,5	1,3	3,8	0,3	1,0
Aflatoxin B2	0,5	1,6	1,1	3,7	0,3	0,8
Amitrole	6,5	20	1,9	5,8	6,6	20
Chlormequat	2,5	7,6	1,9	5,6	0,8	2,6
Chlortetracycline hydrochloride	2,4	7,3	2,3	7,0	2,1	6,5
Ciprofloxacin	0,9	2,6	2,3	7,1	0,4	1,1
Cyromazine	1,6	4,8	2,4	7,2	1,7	5,1
Daminozide	0,1	0,3	1,1	3,3	0,6	1,7
Danofloxacin	2,3	7,1	2,5	7,5	2,6	8,0
Diquat	2,3	7,0	2,2	6,7	1,1	3,3
Doxycycline hyclate	2,4	7,4	2,5	7,6	2,6	7,8
Enrofloxacin	1,6	4,9	2,4	7,3	1,5	4,6
Flumequine	0,6	1,9	2,3	6,9	0,4	1,3
Fumonisin B1	2,6	8,0	3,5	11	2,2	6,8
Kasugamycin hydrochloride	1,2	3,5	14	44	2,6	7,9
Maleic hydrazide	2,1	6,4	2,2	6,6	2,5	7,5
Marbofloxacin	0,2	0,7	2,5	7,7	1,3	3,9
Mepiquat	0,6	1,7	1,0	2,9	0,5	1,5
Ochratoxin A	2,6	7,8	2,6	8,0	2,6	7,8
Oxolinic acid	0,7	2,2	2,2	6,6	0,5	1,4
Oxytetracycline	2,5	7,5	2,4	7,3	1,9	5,6
Paraquat	16	47	42	129	9,8	30
PTU [propylenethiourea]	3,8	11	1,9	5,6	0,8	2,5
Sulfachloropyridazine	0,5	1,5	1,7	5,1	0,6	1,7
Sulfadimethoxine	0,6	1,9	1,4	4,4	0,4	1,2
Sulfadimidine	0,5	1,6	1,3	4,1	0,2	0,7
Sulfamerazine	1,0	2,9	2,3	7,0	0,4	1,2
Sulfamethoxypyridazine	0,7	2,2	1,4	4,3	0,7	2,1

10.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ (MATRIX EFFECT, ME)

Ο παράγοντας μήτρας (Matrix Factor, MF) είναι μία τιμή που μας επιτρέπει να κάνουμε μία εκτίμηση για το φαινόμενο της μήτρας της μεθόδου. Όταν ο παράγοντας μήτρας έχει τιμή μεγαλύτερη της μονάδας, τότε παρατηρείται ενίσχυση σήματος, ενώ όταν είναι μικρότερος της μονάδας έχουμε απόσβεση σήματος. Εάν το φαινόμενο της μήτρας θεωρείται σημαντικό, τότε τα δείγματα δεν ποσοτικοποιούνται από τα πρότυπα διαλύματα σε διαλύτη αλλά σε μήτρα.

Η τιμή του παράγοντα μήτρας δίνεται από την εξίσωση:

$$MF = (Κλίση\ καμπύλης\ προτύπων\ σε\ μήτρα\ (matrix - matched)) / (Κλίση\ καμπύλης\ προτύπων\ σε\ διαλύτη) \quad (9.5)$$

Ενώ για να υπολογιστεί η επίδραση της μήτρας (Πίνακες 10.21 – 10.22) χρησιμοποιείται ο παρακάτω τύπος:

$$ME \% = (MF - 1) \times 100 \quad (9.6)$$

Πίνακας 10.21: % Επίδραση της μήτρας σε υποστρώματα μήλα, βερίκοκα, μαρούλια, κρεμμύδια και παιδικές τροφές.

Αναλύτης	% Επίδραση μήτρας (Matrix Effect)				
	Μήλα	Βερίκοκα	Μαρούλια	Κρεμμύδια	Παιδικές Τροφές
Aflatoxin B1	-33,4	-59,5	-41,0	-97,7	-45,6
Aflatoxin B2	-42,7	-65,5	-49,9	-98,0	-51,1
Amitrole	8,7	-59,5	19,5	-91,9	-97,9
Chlormequat	12,9	-26,5	-79,9	-89,1	-16,3
Chlortetracycline hydrochloride	63,3	94,3	49,7	49,7	47,9
Ciprofloxacin	1,6	15,8	-26,8	-99,3	-42,3
Cyromazine	-62,6	-52,1	-89,5	-92,8	-60,0
Daminozide	-32,9	-39,1	48,0	-93,9	32,4
Danofloxacin	94,3	97,3	-88,5	-99,8	21,2
Diquat	-2,3	-17,0	-67,0	-87,6	-51,9
Doxycycline hyclate	98,9	91,7	-70,3	-52,1	97,3

Enrofloxacin	97,4	-12,3	-96,9	-78,8	98,7
Flumequine	-21,7	-40,3	-39,6	-98,2	-29,1
Fumonisin B1	63,7	49,3	67,9	-78,7	49,7
Kasugamycin hydrochloride	17,6	72,2	-12,4	-69,7	-5,6
Maleic hydrazide	-17,4	-15,3	-29,8	-90,4	-51,5
Marbofloxacin	38,0	18,7	-3,3	-80,1	-12,6
Mepiquat	-23,2	-39,1	-65,9	-89,2	-52,4
Ochratoxin A	-25,9	-40,5	-47,1	-95,8	-63,8
Oxolinic acid	-19,8	-40,3	-39,5	-96,6	-19,8
Oxytetracycline	99,8	99,0	-31,4	-19,2	2,6
Paraquat	93,4	18,9	97,3	-99,2	-36,7
PTU [propylenethiourea]	-3,6	-37,4	-83,3	-90,7	-29,2
Sulfachloropyridazine	-56,6	-59,1	-43,1	-96,1	-55,7
Sulfadimethoxine	-52,5	-58,1	-63,0	-95,8	-51,3
Sulfadimidine	-46,6	-57,1	-39,9	-96,0	-51,2
Sulfamerazine	-43,1	-41,6	-44,4	-96,3	-51,6
Sulfamethoxypyridazine	-69,4	-59,4	-76,3	-98,0	-72,5

Πίνακας 10.22: % Επίδραση της μήτρας σε υποστρώματα δημητριακά (αλεύρι), όσπρια (ρεβύθια), γάλα και κρέας

Αναλύτης	% Επίδραση μήτρας (Matrix Effect)			
	Δημητριακά	Όσπρια	Γάλα	κρέας
Aflatoxin B1	-54,6	-47,9	-62,7	-21,5
Aflatoxin B2	-63,4	-54,7	-63,3	-33,8
Amitrole	43,4	-34,4	43,7	53,7
Chlormequat	-16,8	60,0	-74,9	-72,6
Chlortetracycline hydrochloride	54,9	-13,3	-51,6	31,7
Ciprofloxacin	-4,0	-54,5	-86,4	-89,7
Cyromazine	-95,1	-95,8	-98,6	-75,9
Daminozide	-42,9	7,3	-58,0	-18,5
Danofloxacin	-32,7	21,4	-87,4	-48,7
Diquat	-55,3	-72,6	-64,1	-72,2
Doxycycline hyclate	-16,2	-77,1	-62,3	-67,8
Enrofloxacin	-23,9	-90,8	-95,9	-65,1
Flumequine	-50,5	-34,4	-57,1	-22,3
Fumonisin B1	-61,4	-37,4	-28,0	57,4

Kasugamycin hydrochloride	-5,5	25,8	-47,3	-37,5
Maleic hydrazide	-70,2	-45,5	-80,9	-79,1
Marbofloxacin	-58,0	-52,6	-90,8	-82,4
Mepiquat	-75,2	-53,5	-71,5	-76,2
Ochratoxin A	-63,9	-28,6	-62,2	-62,3
Oxolinic acid	-49,7	-29,7	-57,4	-24,3
Oxytetracycline	-74,2	-61,7	-93,8	-81,9
Paraquat	6,1	-89,5	-98,0	-66,8
PTU [propylenethiourea]	-27,3	25,8	-78,7	-76,9
Sulfachloropyridazine	-65,4	-38,0	-60,8	-49,6
Sulfadimethoxine	-70,3	-47,6	-64,1	-56,3
Sulfadimidine	-52,9	-34,9	-55,8	-27,9
Sulfamerazine	-56,1	-46,2	-53,7	-37,2
Sulfamethoxypyridazine	-76,4	-61,7	-71,4	-70,3

10.7 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Σύμφωνα με την EURACHEM η αβεβαιότητα (uncertainty) ορίζεται ως «μία παράμετρος που συνδέεται με το αποτέλεσμα της μέτρησης, η οποία χαρακτηρίζει την διασπορά των τιμών που λογικά μπορούν να αποδοθούν στο προσδιοριζόμενο συστατικό». Όταν η αβεβαιότητα εκφράζεται ως τυπική απόκλιση, τότε αναφέρεται ως τυπική αβεβαιότητα (standard uncertainty, u). Ως συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (combined standard uncertainty, u_c) ορίζεται η αβεβαιότητα που προκύπτει από τον συνδυασμό των τυπικών αβεβαιοτήτων και δίνεται ως η τετραγωνική ρίζα του αθροίσματος των τετραγώνων των τυπικών αβεβαιοτήτων κάθε συνιστώσας, σταθμισμένων ανάλογα με το πώς το αποτέλεσμα της μέτρησης μεταβάλλεται από τις συνιστώσες. Επειδή οι πηγές της αβεβαιότητας έχουν διαφορετικές μονάδες η συνδυασμένη αβεβαιότητα υπολογίζεται συνήθως ως σχετική τυπική αβεβαιότητα. Η εκτεταμένη αβεβαιότητα (expanded uncertainty, U) χρησιμοποιείται συνήθως για να καλύψει τις απαιτήσεις των τελικών χρηστών της μέτρησης και εκφράζει ένα μεγαλύτερο διάστημα από τη συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα, στο οποίο η τιμή του μετρούμενου μεγέθους έχει μεγαλύτερη πιθανότητα να υπάρξει. Υπολογίζεται πολλαπλασιάζοντας τη συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα με έναν συντελεστή κάλυψης (coverage factor) k , ο οποίος λαμβάνει την τιμή 2 στις χημικές μετρήσεις και αντιστοιχεί σε επίπεδο εμπιστοσύνης περίπου 95%.

Τα συστατικά της αβεβαιότητας χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, ανάλογα με τη μέθοδο εκτίμησής τους. Η αβεβαιότητα τύπου A εκτιμάται από μία σειρά επαναλαμβανόμενων μετρήσεων χρησιμοποιώντας στατιστικές μεθόδους. Η αβεβαιότητα τύπου B υπολογίζεται με άλλες τεχνικές εκτός στατιστικής, όπως δεδομένα από πιστοποιητικά διακριβώσεων, δεδομένα προηγούμενων πειραματικών μετρήσεων σε σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, εμπειρία και οποιαδήποτε άλλη σχετική πληροφορία.

Αβεβαιότητα τύπου A (από τα πειράματα επαναληψιμότητας)

Η αβεβαιότητα σε αυτή την περίπτωση παρέχεται από τις τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης, RSDr, που υπολογίστηκε στους πίνακες 10.9 - 10.17.

Αβεβαιότητα τύπου B (συστηματικά σφάλματα)

A. Για τα τρόφιμα με περιεκτικότητα σε νερό >80%, για γάλα και για κρέας

Αβεβαιότητα στον όγκο:

Πιπέτα 5 mL: από το πιστοποιητικό η ακρίβεια είναι 0,05%, οπότε η απόκλιση είναι $\pm (0,05 \times 5) / 100 = \pm 0,0025 \text{ mL}$

ενώ η πιπέτα χρησιμοποιείται 2 φορές γιατί θέλουμε 10 mL δηλαδή:

$$2 \times 5 \text{ mL} = 10 \text{ mL},$$

Η αβεβαιότητα υπολογίζεται θεωρώντας ότι υπακούει σε τετραγωνική κατανομή στην οποία η μέση τιμή έχει την ίδια πιθανότητα εμφάνισης με τις ακραίες τιμές, οπότε η τιμή της δίνεται ως $u(x) = a / \sqrt{3}$.

$$u_1(V) = \pm 0,0025 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0,00144 \text{ mL}$$

Η θερμοκρασία του εργαστηρίου από μετρήσεις παρακολούθησης έχει βρεθεί ότι κυμαίνεται σε εύρος $\pm 4^\circ\text{C}$, ενώ σύμφωνα με τον κατασκευαστή ο πιστοποιημένος όγκος είναι στους 20°C . Η αβεβαιότητα από την επίδραση αυτή υπολογίζεται από την εκτιμώμενη μέγιστη διακύμανση της θερμοκρασίας και από το συντελεστή διαστολής του όγκου. Ο συντελεστής διαστολής του όγκου για την μεθανόλη ισούται με $1,18 \times 10^{-3}$. Η αβεβαιότητα που οφείλεται στην επίδραση της θερμοκρασίας u_2 , θεωρείται ότι υπακούει σε τετραγωνική κατανομή, δηλαδή υπάρχει η ίδια πιθανότητα εμφάνισης της μέσης τιμής και των ακραίων τιμών, οπότε έχουμε και πάλι $u(x) = a / \sqrt{3}$.

$$\Delta V = V_{20} \times \alpha_{\text{MeOH}} \times \Delta T$$

$$\Delta V = 5 \times 1,18 \times 10^{-3} \times 4 = 0,02360 \text{ mL}$$

Άρα η αβεβαιότητα θα είναι αυτής της πηγής θα είναι

$$u_2(V) = 0,02360 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0,0136 \text{ mL}$$

Αβεβαιότητα από την επαναληψιμότητα: Κατά την εκτέλεση 10 κύκλων γέμισμα – ζύγιση, η τυπική απόκλιση του όγκου βρέθηκε 0,0101 mL

$$\text{Άρα } u_3(V) = 0,01010 \text{ mL}$$

Άρα η συνολική τυπική αβεβαιότητα στον όγκο είναι:

$$u_{\pi\pi}(V) = \sqrt{2(u_1(V))^2 + u_2(V)^2 + u_3(V)^2} = \sqrt{2(0,00144^2 + 0,0136^2 + 0,01010^2)}$$

$$u_{\pi\pi}(V) = 0,024066 \text{ mL}$$

Η αδιάστατη σχετική αβεβαιότητα θα είναι:

$$\alpha.\alpha. \pi\pi = 0,024066 / 10 = 0,002407$$

Αβεβαιότητα στη μάζα:

Η αβεβαιότητα στον προσδιορισμό της μάζας υπολογίζεται από τα δεδομένα της διακρίβωσης του ζυγού και υπάρχουν στο πιστοποιητικό διακρίβωσης. Επίσης εξαρτάται από τη μάζα που ζυγίζουμε.

Από το πιστοποιητικό λοιπόν έχουμε:

$$u_1(m) = 0,02 + (3,719 \times 10^{-5} \times m) = 0,02 + (3,719 \times 10^{-5} \times 10)$$

$$u_1(m) = 0,020372 \text{ g}$$

$$\text{Άρα } u(m) = \sqrt{u_1(m)^2} = 0,020372 \text{ g}$$

Η αδιάστατη σχετική αβεβαιότητα θα είναι:

$$\alpha.\alpha. \mu\alpha\zeta = 0,02037 / 10 = 0,002037$$

Αβεβαιότητα προτύπου υλικού αναφοράς:

Έχουμε την αβεβαιότητα από το πιστοποιητικό $\pm 0,5\%$ και ακόμη πάλι έχουμε τετραγωνική κατανομή οπότε:

$$u_{\text{std}} = 0,5 / (100 \times \sqrt{3}) = 0,002887$$

Η αδιάστατη σχετική αβεβαιότητα θα είναι:

$$\alpha.\alpha. \text{std} = 0,002887$$

Ολική αδιάστατη αβεβαιότητα τύπου Β της μεθόδου

$$u_B = \sqrt{(0,002407^2 + 0,002037^2 + 0,002887^2)} = 0,004275 \text{ ή αλλιώς } 0,43\%$$

Η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα δίνεται από τη σχέση

$$u_C = \sqrt{u_B^2 + u_{RSDr}^2}$$

Για ένα συντελεστή κάλυψης $k=2$ (95%), η διευρυμένη αβεβαιότητα U είναι:

$$U = 2 \times u_C$$

Με βάση τα πειραματικά δεδομένα έγινε υπολογισμός της συνδυασμένης τυπικής αβεβαιότητας και της διευρυμένης αβεβαιότητας (Πίνακες 10.23 – 10.29).

Πίνακας 10.23: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα μήλων, στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	17	34	5,7	11
Aflatoxin B2	17	33	6,7	13
Amitrole	19	39	9,7	19
Chlormequat	12	24	2,8	5,7
Chlortetracycline hydrochloride	14	28	8,0	16
Ciprofloxacin	12	24	2,8	5,7
Cyromazine	8,0	15	4,5	9,0
Daminozide	11	21	5,3	11
Danofloxacin	20	40	8,7	17
Diquat	16	32	6,1	12
Doxycycline hyclate	19	38	5,5	11
Enrofloxacin	18	36	4,8	9,6
Flumequine	17	34	2,8	5,7
Fumonisin B1	15	30	12	24
Kasugamycin hydrochloride	19	37	23	46
Maleic hydrazide	20	39	5,8	12

Marbofloxacin	15	31	3,6	7,3
Mepiquat	10	21	3,8	7,6
Ochratoxin A	13	26	5,7	11
Oxolinic acid	11	22	12	24
Oxytetracycline	14	28	5,3	11
Paraquat	26	52	6,6	13
PTU [propylenethiourea]	11	23	3,2	6,5
Sulfachloropyridazine	15	29	4,0	8,0
Sulfadimethoxine	8,1	16	7,1	14
Sulfadimidine	5,9	12	6,3	13
Sulfamerazine	18	36	11	22
Sulfamethoxypyridazine	11	23	7,9	16

Πίνακας 10.24: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα βερίκοκων. στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	13	27	5,5	11
Aflatoxin B2	17	34	7,3	15
Amitrole	14	29	18	37
Chlormequat	15	31	10	20
Chlortetracycline hydrochloride	17	35	15	30
Ciprofloxacin	5,8	12	3,7	7,4
Cyromazine	11	21	3,8	7,6
Daminozide	7,6	15	4,1	8,2
Danofloxacin	19	37	3,5	7,1
Diquat	7,1	14	2,1	4,3
Doxycycline hyclate	14	29	9,1	18
Enrofloxacin	9,0	18	4,6	9,2
Flumequine	4,4	8,8	4,3	8,6
Fumonisin B1	18	37	13	27
Kasugamycin hydrochloride	29	58	14	29
Maleic hydrazide	16	32	8,1	16
Marbofloxacin	6,5	13	2,1	4,3

Mepiquat	15	29	9,2	18
Ochratoxin A	7,2	14	12	23
Oxolinic acid	13	26	9,3	19
Oxytetracycline	17	33	16	32
Paraquat	12	24	7,1	14
PTU [propylenethiourea]	13	27	10	20
Sulfachloropyridazine	6,8	14	5,5	11
Sulfadimethoxine	7,1	14	12	23
Sulfadimidine	16	33	6,2	12
Sulfamerazine	17	33	13	26
Sulfamethoxypyridazine	21	43	4,5	9,0

Πίνακας 10.25: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα μαρουλιών, στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	14	27	3,2	6,5
Aflatoxin B2	13	27	6,6	13
Amitrole	9,1	18	9,6	19
Chlormequat	15	30	11	22
Chlortetracycline hydrochloride	13	25	4,1	8,2
Ciprofloxacin	7,8	16	8,1	16
Cyromazine	17	33	17	35
Daminozide	15	29	9,1	18
Danofloxacin	30	60	11	22
Diquat	14	29	15	30
Doxycycline hyclate	23	46	10	21
Enrofloxacin	27	54	24	48
Flumequine	8,5	17	3,6	7,3
Fumonisin B1	19	39	14	28
Kasugamycin hydrochloride	63	126	35	69
Maleic hydrazide	16	31	9,3	19
Marbofloxacin	12	24	11	22
Mepiquat	3,9	7,8	7,5	15

Ochratoxin A	17	34	11	22
Oxolinic acid	16	32	3,9	7,8
Oxytetracycline	14	29	17	33
Paraquat	17	35	22	44
PTU [propylenethiourea]	13	27	14	27
Sulfachloropyridazine	5,5	11	5,5	11
Sulfadimethoxine	5,8	12	4,9	9,8
Sulfadimidine	10	20	7,7	15
Sulfamerazine	18	36	12	25
Sulfamethoxypyridazine	6,7	13	8,6	17

Πίνακας 10.26: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα κρεμμυδιών, στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	9,9	20	8,4	17
Aflatoxin B2	16	32	8,1	16
Amitrole	13	27	31	63
Chlormequat	17	33	18	35
Chlortetracycline hydrochloride	13	27	13	25
Ciprofloxacin	19	39	18	35
Cyromazine	18	37	9,2	18
Daminozide	5,4	11	15	29
Danofloxacin	29	59	9,8	20
Diquat	9,6	19	15	29
Doxycycline hyclate	1,8	3,5	16	31
Enrofloxacin	2,4	4,9	6,0	12
Flumequine	2,2	4,5	4,1	8,2
Fumonisin B1	19	38	17	35
Kasugamycin hydrochloride	2,8	5,7	12	24
Maleic hydrazide	12	24	15	31
Marbofloxacin	7,6	15	14	28
Mepiquat	13	27	11	23
Ochratoxin A	6,3	13	17	33

Oxolinic acid	17	34	19	39
Oxytetracycline	4,6	9,2	18	35
Paraquat	26	51	30	60
PTU [propylenethiourea]	19	38	18	36
Sulfachloropyridazine	22	45	19	38
Sulfadimethoxine	19	37	17	34
Sulfadimidine	21	41	6,1	12
Sulfamerazine	12	24	15	30
Sulfamethoxypyridazine	6,1	12	19	38

Πίνακας 10.27: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα παιδικών τροφών, στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	16	33	10	21
Aflatoxin B2	11	22	7,8	16
Amitrole	20	41	10	20
Chlormequat	11	22	4,8	9,6
Chlortetracycline hydrochloride	14	27	5,1	10
Ciprofloxacin	13	26	7,5	15
Cyromazine	7,3	15	2,5	5,1
Daminozide	6,5	13	3,8	7,6
Danofloxacin	14	28	8,9	18
Diquat	8,6	17	6,5	13
Doxycycline hyclate	16	31	9,6	19
Enrofloxacin	16	33	10	21
Flumequine	6,1	12	4,4	8,8
Fumonisin B1	19	39	9,5	19
Kasugamycin hydrochloride	34	67	42	83
Maleic hydrazide	19	37	17	34
Marbofloxacin	12	23	7,9	16
Mepiquat	12	25	3,5	7,1
Ochratoxin A	13	27	14	28
Oxolinic acid	17	34	6,8	14

Oxytetracycline	14	28	18	35
Paraquat	12	24	11	22
PTU [propylenethiourea]	9,7	19	5,0	10
Sulfachloropyridazine	19	39	15	30
Sulfadimethoxine	11	22	11	21
Sulfadimidine	16	32	11	22
Sulfamerazine	11	22	13	26
Sulfamethoxypyridazine	9,4	19	20	40

Πίνακας 10.28: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος, στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	4,7	9,4	9,7	19
Aflatoxin B2	12	25	14	28
Amitrole	3,6	7,3	14	29
Chlormequat	13	26	9,9	20
Chlortetracycline hydrochloride	19	37	19	38
Ciprofloxacin	19	38	11	22
Cyromazine	9,8	20	15	29
Daminozide	10	20	11	21
Danofloxacin	17	35	17	35
Diquat	18	37	6,4	13
Doxycycline hyclate	18	36	17	33
Enrofloxacin	17	34	18	36
Flumequine	5,5	11	8,0	16
Fumonisin B1	19	38	17	35
Kasugamycin hydrochloride	50	100	15	29
Maleic hydrazide	17	35	13	25
Marbofloxacin	3,0	6,1	15	30
Mepiquat	6,0	12	12	23
Ochratoxin A	18	35	11	22
Oxolinic acid	14	29	13	26
Oxytetracycline	19	39	15	30

Paraquat	7,8	16	15	31
PTU [propylenethiourea]	12	25	9,9	20
Sulfachloropyridazine	1,8	3,5	7,8	16
Sulfadimethoxine	5,1	10	11	22
Sulfadimidine	11	22	7,1	14
Sulfamerazine	2,9	5,9	12	24
Sulfamethoxypyridazine	18	36	6,9	14

Στην περίπτωση της Kasugamycin hydrochloride στο 1ο επίπεδο υπάρχει μη αποδεκτή τιμή % διευρυμένης αβεβαιότητας, οπότε η μέθοδος δεν είναι κατάλληλη γι' αυτή την ουσία.

Πίνακας 10.29: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα κρέατος, στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	10	20	6,9	14
Aflatoxin B2	11	21	9,2	18
Amitrole	3,6	7,3	11	22
Chlormequat	18	36	9,7	19
Chlortetracycline hydrochloride	9,5	19	4,1	8,2
Ciprofloxacin	13	25	9,1	18
Cyromazine	11	21	19	37
Daminozide	3,9	7,8	2,8	5,7
Danofloxacin	12	23	8,7	17
Diquat	17	33	18	35
Doxycycline hyclate	17	35	15	30
Enrofloxacin	12	23	8,0	16
Flumequine	5,1	10	5,8	12
Fumonisin B1	18	37	14	29
Kasugamycin hydrochloride	0,5	0,9	19	38
Maleic hydrazide	17	34	11	22
Marbofloxacin	17	34	9,8	20
Mepiquat	17	35	7,3	15

Ochratoxin A	18	36	18	35
Oxolinic acid	19	38	7,2	14
Oxytetracycline	15	30	17	35
Paraquat	16	32	29	57
PTU [propylenethiourea]	17	33	3,9	7,8
Sulfachloropyridazine	10	21	8,1	16
Sulfadimethoxine	18	35	5,7	11
Sulfadimidine	8,1	16	9,9	20
Sulfamerazine	11	23	4,2	8,4
Sulfamethoxypyridazine	18	36	18	36

B) Για τα δημητριακά και τα όσπρια

Αβεβαιότητα στον όγκο:

Πιπέτα 5 mL: από το πιστοποιητικό η ακρίβεια είναι 0,05%, οπότε η απόκλιση είναι $\pm (0,05 \times 5) / 100 = \pm 0,0025$ mL

ενώ η χρησιμοποιείται 2 φορές γιατί θέλουμε 10 mL δηλαδή:

$$2 \times 5 \text{ mL} = 10 \text{ mL},$$

Η αβεβαιότητα υπολογίζεται θεωρώντας ότι υπακούει σε τετραγωνική κατανομή οπότε η τιμή της δίνεται ως $u(x) = \alpha / \sqrt{3}$.

$$u_1(V) = \pm 0,0025 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0,00144 \text{ mL}$$

Όπως και παραπάνω έχουμε $\Delta V = V_{20} \times \alpha_{MeOH} \times \Delta T$

$$\Delta V = 5 \times 1,18 \times 10^{-3} \times 4 = 0,02360 \text{ mL}$$

Η αβεβαιότητα που οφείλεται στην επίδραση της θερμοκρασίας u_2 , θεωρείται ότι υπακούει σε τετραγωνική κατανομή οπότε έχουμε και πάλι $u(x) = \alpha / \sqrt{3}$.

$$u_2(V) = 0,02360 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0,01362 \text{ mL}$$

Αβεβαιότητα από την επαναληψιμότητα: Κατά την εκτέλεση 10 κύκλων γέμισμα – ζύγιση, η τυπική απόκλιση του όγκου βρέθηκε 0,01010 mL

$$\text{Άρα } u_3(V) = 0,01010 \text{ mL}$$

Άρα η συνολική τυπική αβεβαιότητα είναι:

$$u_{\pi\pi1}(V) = \sqrt{2(u_1(V)^2 + u_2(V)^2 + u_3(V)^2)} = \sqrt{2(0,00144^2 + 0,01362^2 + 0,01010^2)}$$

$$u_{\pi\pi1}(V) = 0,024066 \text{ mL}$$

Η αδιάστατη σχετική αβεβαιότητα θα είναι:

$$\alpha.\alpha._{\pi\pi1} = 0,024066 / 10 = 0,002407$$

Πιπέτα (5 mL) που χρησιμοποιείται για την προσθήκη των 10 mL νερού στα δείγματα δημητριακών και οσπρίων:

Από το πιστοποιητικό η ακρίβεια είναι 0,05%, οπότε η απόκλιση είναι $\pm (0,05 \times 5) / 100 = \pm 0,0025 \text{ mL}$

ενώ η χρησιμοποιείται 2 φορές γιατί θέλουμε 10 mL δηλαδή:

$$2 \times 5 \text{ mL} = 10 \text{ mL},$$

Η αβεβαιότητα υπολογίζεται θεωρώντας ότι υπακούει σε τετραγωνική κατανομή οπότε η τιμή της δίνεται ως $u(x) = \alpha / \sqrt{3}$.

$$u_1(V) = \pm 0,0025 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0,00144 \text{ mL}$$

Όπως και παραπάνω (Α) έχουμε $\Delta V = V_{20} \times \alpha_{H_2O} \times \Delta T$

Ο συντελεστής διαστολής του όγκου για το νερό ισούται με $2,14 \times 10^{-4}$.

$$\Delta V = 5 \times 2,14 \times 10^{-4} \times 4 = 0,00428 \text{ mL}$$

Η αβεβαιότητα που οφείλεται στην επίδραση της θερμοκρασίας u_2 , θεωρείται ότι υπακούει σε τετραγωνική κατανομή οπότε έχουμε και πάλι $u(x) = \alpha / \sqrt{3}$.

$$u_2(V) = 0,004280 \text{ mL} / \sqrt{3} = 0,002471 \text{ mL}$$

Αβεβαιότητα από την επαναληψιμότητα: Κατά την εκτέλεση 10 κύκλων γέμισμα – ζύγιση, η τυπική απόκλιση του όγκου βρέθηκε 0,01010 mL

$$\text{Άρα } u_3(V) = 0,01010 \text{ mL}$$

Άρα η συνολική τυπική αβεβαιότητα είναι:

$$u_{\pi\pi2}(V) = \sqrt{2(u_1(V)^2 + u_2(V)^2 + u_3(V)^2)} = \sqrt{2(0,00144^2 + 0,002471^2 + 0,01010^2)}$$

$$u_{\pi\pi2}(V) = 0,014845 \text{ mL}$$

Η αδιάστατη σχετική αβεβαιότητα θα είναι:

$$\alpha.\alpha._{\pi\pi2} = 0,014845 / 10 = 0,001485$$

Αβεβαιότητα στη μάζα:

Η αβεβαιότητα στον προσδιορισμό της μάζας υπολογίζεται από τα δεδομένα της διακρίβωσης του ζυγού και υπάρχουν στο πιστοποιητικό διακρίβωσης. Επίσης εξαρτάται από τη μάζα που ζυγίζουμε.

Από το πιστοποιητικό λοιπόν έχουμε:

$$u_1(m) = 0,02 + (3,719 \times 10^{-5} \times m) = 0,02 + (3,719 \times 10^{-5} \times 5)$$

$$u_1(m) = 0,020186 \text{ g}$$

$$\text{Άρα } u(m) = \sqrt{u_1(m)^2} = 0,020186 \text{ g}$$

Η αδιάστατη σχετική αβεβαιότητα θα είναι:

$$\alpha.\alpha._{\mu\alpha\zeta} = 0,020186 / 10 = 0,002019$$

Αβεβαιότητα προτύπου υλικού αναφοράς:

Έχουμε την αβεβαιότητα από το πιστοποιητικό $\pm 0,5\%$ και ακόμη πάλι έχουμε τετραγωνική κατανομή οπότε:

$$u_{\text{std}} = 0,5 / (100 \times \sqrt{3}) = 0,002887$$

Η αδιάστατη σχετική αβεβαιότητα θα είναι:

$$\alpha.\alpha._{\text{std}} = 0,002887$$

Ολική αδιάστατη αβεβαιότητα τύπου B της μεθόδου

$$u_B = \sqrt{(0,002407^2 + 0,001485^2 + 0,002019^2 + 0,002887^2)} = 0,004518 \text{ ή αλλιώς } 0,45\%$$

Η συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα δίνεται από τη σχέση

$$u_C = \sqrt{u_B^2 + u_{\text{RSDr}}^2}$$

Για ένα συντελεστή κάλυψης $k=2$ (95%), η διευρυμένη αβεβαιότητα U είναι:

$$U = 2 \times u_C \text{ (Πίνακες 10.30 – 10.31)}$$

Πίνακας 10.30: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα δημητριακών (αλεύρι), στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	9,3	19	9,6	19
Aflatoxin B2	9,7	19	4,8	9,6
Amitrole	11	22	15	31
Chlormequat	11	22	3,0	6,1
Chlortetracycline hydrochloride	16	32	14	28
Ciprofloxacin	7,1	14	6,4	13
Cyromazine	18	35	12	24
Daminozide	17	33	11	22
Danofloxacin	13	27	15	29
Diquat	19	38	15	30
Doxycycline hyclate	17	33	7,8	16
Enrofloxacin	19	38	18	37
Flumequine	9,6	19	4,1	8,2
Fumonisin B1	17	35	17	35
Kasugamycin hydrochloride	30	59	62	125
Maleic hydrazide	19	37	17	33
Marbofloxacin	17	33	18	35
Mepiquat	17	35	4,9	9,8
Ochratoxin A	17	35	13	26
Oxolinic acid	14	28	11	22
Oxytetracycline	16	31	11	21
Paraquat	5,0	10	8,3	17
PTU [propylenethiourea]	18	36	3,8	7,7
Sulfachloropyridazine	17	35	6,9	14
Sulfadimethoxine	3,1	6,3	8,7	17
Sulfadimidine	18	37	2,1	4,1
Sulfamerazine	20	40	11	23
Sulfamethoxypyridazine	15	30	16	31

Πίνακας 10.31: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα ρεβυθιών, στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Aflatoxin B1	4,1	8,2	8,4	17
Aflatoxin B2	16	32	8,1	16
Amitrole	10	20	31	63
Chlormequat	9,1	18	18	35
Chlortetracycline hydrochloride	18	36	13	25
Ciprofloxacin	8,7	17	18	35
Cyromazine	17	33	9,2	18
Daminozide	4,8	9,6	15	29
Danofloxacin	18	37	29	59
Diquat	4,5	9,0	15	29
Doxycycline hyclate	12	23	16	31
Enrofloxacin	19	37	6,0	12
Flumequine	7,0	14	4,1	8,2
Fumonisin B1	18	37	17	35
Kasugamycin hydrochloride	47	95	12	24
Maleic hydrazide	19	38	15	31
Marbofloxacin	8,2	16	14	28
Mepiquat	17	34	11	23
Ochratoxin A	18	35	17	33
Oxolinic acid	18	37	19	39
Oxytetracycline	18	35	18	35
Paraquat	9,3	19	30	60
PTU [propylenethiourea]	4,1	8,2	18	36
Sulfachloropyridazine	14	29	22	45
Sulfadimethoxine	16	31	17	34
Sulfadimidine	12	23	21	41
Sulfamerazine	18	36	15	30
Sulfamethoxypyridazine	26	53	19	38

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11ο ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟ FOSETYL-ALUMINIUM

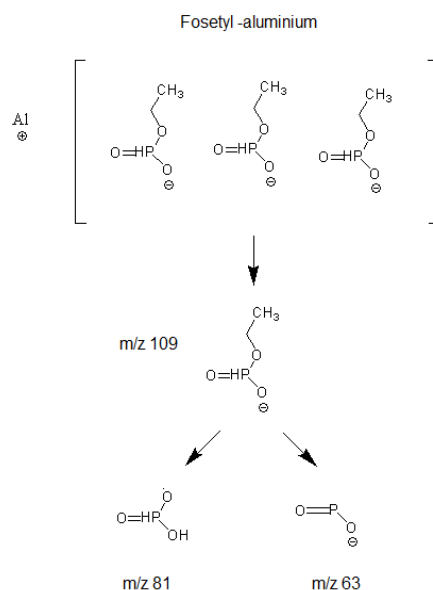
11.1 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΤΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΜΗΤΡΑ, ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΤΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΚΑΙ ΤΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ.

Η πορεία παραλαβής των ουσιών είναι η ίδια με πριν, όπως την περίπτωση που έχουμε τρόφιμα με περιεκτικότητα σε νερό >80%, αφού έχουμε μαρούλι. Επίσης βρέθηκαν τα μητρικά και θυγατρικά ιόντα στο φασματογράφο μάζας καθώς και οι βέλτιστες συνθήκες ιοντισμού για τις υπό προσδιορισμό ενώσεις, με την ίδια διαδικασία όπως στην πολύ-υπολειμματική μέθοδο (Πίνακας 11.1, Σχήμα 11.1).

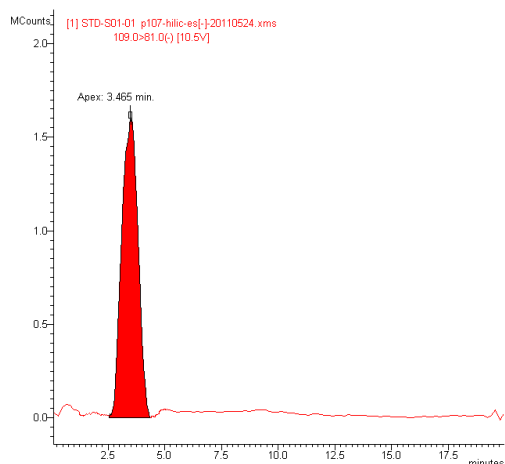
Πίνακας 11.1. Μητρικά, θυγατρικά ιόντα και παράμετροι MS/MS των ουσιών που μελετήθηκαν

Ουσία	Μητρικό Ιόν (m/z)	Θυγατρικά Ιόντα (m/z)	Ενέργεια Θραυσματοποίησης (V)	Τάση Τριχοειδούς (V)
Fosetyl-Aluminium	109	63	24,5	-58
		81*	10,5	

Με * επισημαίνονται το ιόν ποσοτικοποίησης



Σχήμα 11.1: Πιθανές δομές των θυγατρικών ιόντων του Fosetyl-aluminium.



Εικόνα 11.1: Ανακατασκευή χρωματογραφήματος για την ουσία Fosetyl-aluminium σε πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 100 µg/L. Χρόνος κατακράτησης $t_R = 3,465$ min

Δοκιμάστηκαν διάφορα προγράμματα βαθμιδωτής έκλουσης με αρχικό ποσοστό οργανικού διαλύτη (B) 75%-80%-85% ώστε να βρεθεί η βέλτιστη αναλογία οργανικού διαλύτη. Επίσης εξετάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις HCOONH_4 στον διαλύτη (A) 25-50-75 mM. Ακόμη δοκιμάστηκαν οι εξής τιμές για τη θερμοκρασία της στήλης: 25°C, 30°C και 35°C και οι εξής τιμές για την ροή της κινητής φάσης: 0,4, 0,5 και 0,6 mL/min. Στο τέλος έχει προστεθεί και μία περίοδος 6 λεπτών για την εξισορρόπηση της στήλης για την επόμενη ένεση. Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων που εξετάστηκαν δίνονται παρακάτω:

Κινητή φάση: A: H₂O (100 v/v) – 50 mM HCOONH₄

B: CH₃CN / H₂O (90:10 v/v)

Ροή της κινητής φάσης: 0,5 mL/min

Θερμοκρασία στήλης: 30°C

Τύπος πηγής: ESI-

Το τελικό πρόγραμμα διαρκεί 21 λεπτά συμπεριλαμβανομένων 6 λεπτών για την εξισορρόπηση της στήλης. Το τελικό πρόγραμμα έκλουσης παρουσιάζεται στον πίνακα 11.2

Πίνακας 11.2: Συνθήκες χρωματογραφικού συστήματος

Χρόνος (λεπτά)	% A: H ₂ O (100 v/v) – 50 mM HCOONH ₄	%B: CH ₃ CN / H ₂ O (90:10 v/v)	Ροή κινητής φάσης (mL/min)
0:00	20,0	80,0	0,5
1:00	20,0	80,0	0,5
10:00	90,0	10,0	0,5
15:00	90,0	10,0	0,5
15:06	20,0	80,0	0,5
21:00	20,0	80,0	0,5

11.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑΣ

Πίνακας 11.3: Αποτελέσματα γραμμικότητας και της καμπύλης βαθμονόμησης για το πρότυπο σε διαλύτη

Αναλύτης	Γραμμική περιοχή (μg/L)	Κλίση, (b ± S _b) (x10 ⁷)	Τομή στον άξονα y, (a ± S _a) (x10 ⁵)	Συντελεστής Συσχέτισης (r ²)
Fosetyl-Aluminium	2-100	6,4 ± 0,2	4,4 ± 1,1	0,995

Πίνακας 11.4: Αποτελέσματα γραμμικότητας για το πρότυπο σε μήτρα (μαρούλια)

Αναλύτης	Γραμμική περιοχή (μg/L)	Συντελεστής Συσχέτισης (r^2)
		Μαρούλια
Fosetyl-Aluminium	2-100	0,982

11.3 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΚΡΙΒΕΙΑΣ (ΟΡΘΟΤΗΤΑΣ)

Πίνακας 11.5: Μέση τιμή των ανακτήσεων του Fosetyl-Aluminium για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού σε υπόστρωμα μαρουλιών (N=5).

Αναλύτης	Μέση Τιμή Ανάκτησης %	
	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg	2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg
Fosetyl-Aluminium	106,5	95,0

Πίνακας 11.6: Τυπική απόκλιση (SD) και % σχετική τυπική απόκλιση (% RSD) για τα δύο επίπεδα εμβολιασμού (1^ο επίπεδο εμβολιασμού 0,01 mg/kg και 2^ο επίπεδο εμβολιασμού 0,1 mg/kg) σε υπόστρωμα μαρουλιών (N=5).

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD	Τυπική απόκλιση, SD	Σχετική Τυπική Απόκλιση, % RSD
Fosetyl-Aluminium	6,4	6,5	6,5	6,9

11.4 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗΣ

Πίνακας 11.7: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε υπόστρωμα μαρουλιών.

Αναλύτης	Μαρούλια	
	LOD (µg/Kg)	LOQ (µg/Kg)
Fosetyl-Aluminium	1,1	3,2

11.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΜΗΤΡΑΣ (MATRIX EFFECT, ME)

Πίνακας 11.8: % Επίδραση της μήτρας σε υπόστρωμα μαρουλιών.

Αναλύτης	% Επίδραση μήτρας (Matrix Effect)
Fosetyl-Aluminium	-17,2

11.6 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΗΣ ΑΒΕΒΑΙΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ο υπολογισμός της Αβεβαιότητας τύπου Β, έγινε με την ίδια διαδικασία με την περίπτωση Α της πολύ-υπολειμματικής μεθόδου (για τα τρόφιμα με περιεκτικότητα σε νερό >80%) αφού έχουμε σαν υπόστρωμα μαρούλια και η πορεία παραλαβής των ουσιών είναι η ίδια (Πίνακας 11.9).

Πίνακας 11.9: Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα (%) και διευρυμένη τυπική αβεβαιότητα (%) της μεθόδου σε εμβολιασμένα δείγματα μαρουλιών, στα δύο επίπεδα συγκεντρώσεων, για $N = 5$ επαναλήψεις.

Αναλύτης	1 ^ο Επίπεδο 0,01 mg/kg		2 ^ο Επίπεδο 0,1 mg/kg	
	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %	Συνδυασμένη Αβεβαιότητα %	Διευρυμένη Αβεβαιότητα %
Fosetyl-Aluminium	6,5	13	6,9	14

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12ο ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία έγινε ανάπτυξη μιας πολύ-υπολειμματικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό 26 ξενοβιοτικών ουσιών (πολικών και υδρόφιλων) με την τεχνική υγροχρωματογραφίας υδρόφιλων αλληλεπιδράσεων (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) συζευγμένη με φασματομετρία μαζών, τεχνολογίας τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) με πηγή ιόντων ESI. Οι αναλύτες αυτοί ήταν οι φυτορρυθμιστικές ουσίες: chlormequat, daminozide, diquat, maleic hydrazide, meriquat, το εντομοκτόνο: cyromazine, το ptu (μεταβολίτης του μυκητοκτόνου propineb), τα αντιβιοτικά: chlorotetracycline, doxycycline, oxytetracycline (τετρακυκλίνες), sulfamerazine, sulfadimidine, sulfamethoxypyridazine, sulfachloropyridazine, sulfadimethoxine (σουλφοναμίδια), ciprofloxacin, danofloxacin, enrofloxacin, flumequine, marbofloxacin, oxolinic acid (κινολόνες) καθώς και οι μυκοτοξίνες: αφλατοξίνη B1, B2, η φουμονισίνη B1 και η ωχρατοξίνη A. Επίσης έγινε ανάπτυξη μιας ειδικής μεθόδου για τον μεμονωμένο προσδιορισμό του μυκητοκτόνου fosetyl-aluminium με ESI-.

Η πορεία παραλαβής των αναλυτών από τη μήτρα επιτυγχάνεται με μια εύχρηστη, γρήγορη και αποτελεσματική τεχνική για τα υποστρώματα που εξετάστηκαν. Αυτά ανήκαν σε διαφορετικές κατηγορίες: φρούτα-λαχανικά (μήλα, βερίκοκα, μαρούλια και κρεμμύδια), δημητριακά-όσπρια (αλεύρι και ρεβύθια), ζωικά προϊόντα (γάλα και κρέας (χοιρινός κιμάς)) και παιδικές τροφές (φρουτόκρεμα του εμπορίου).

Οι μέθοδοι επικυρώθηκαν σύμφωνα με το έγγραφο SANCO/12495/2011 και παρουσιάζουν ικανοποιητική ορθότητα και πιστότητα με εξαίρεση τις ουσίες paraquat, amitrole και kasugamycin. Η επικύρωση της πολύ-υπολειμματικής μεθόδου έγινε στα επίπεδα: 10 µg/kg και 100 µg/kg.

Τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου σε όλες τις περιπτώσεις είναι χαμηλότερα από τα αντίστοιχα MRLs για τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και τα μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα για τα αντιβιοτικά και τις μυκοτοξίνες. Εξαίρεση αποτελούν η Αφλατοξίνη B1 όσον αφορά τις παιδικές τροφές, όπου το μέγιστο επιτρεπτό επίπεδο είναι 0,10 µg/kg σύμφωνα με τον Κανονισμό ΕΚ/165/2010 και η Ωχρατοξίνη A όσον αφορά τις παιδικές τροφές και το αλεύρι, όπου το μέγιστο επιτρεπτό επίπεδο είναι 0,50

μg/kg σύμφωνα με τον Κανονισμό ΕΚ/1881/2007. Σύμφωνα με την οδηγία SANCO/12495/2011 το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου είναι 10 μg/kg.

Έγινε εκτίμηση της επίδρασης της μήτρας για τα υποστρώματα που εξετάστηκαν. Κατά την επικύρωση των μεθόδων, η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με βάση καμπύλη προτύπων προσαρμοσμένη στη μήτρα μειώνοντας έτσι την επίδραση της μήτρας. Τέλος υπολογίστηκαν η συνδυασμένη και η διευρυμένη αβεβαιότητα των μεθόδων για κάθε ουσία ανά υπόστρωμα.

Συμπερασματικά, οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν είναι σύντομες και απλές, χαρακτηρίζονται από αξιοπιστία και ευαισθησία και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την προστασία των καταναλωτών.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Ζαμπετάκης, Γ., Γδοντέλης, Ν., HACCP, Από το Η έως το Ρ, P.I. Publishing, Αθήνα, 2006, σελ. 28, 43-44.
2. Ζιώγας, Β., Μαρκόγλου, Α., Γεωργική Φαρμακολογία, Έκδοση Α', Ελληνικής Έκδοσης, Αθήνα, 2007, σελ. 12,18,120-124, 215-219, 227-228, 393, 554-557, 576-577, 742-743, 745-748, 752-755.
3. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1991L0414:20051201:EL:PDF> Οδηγία 91/414 ΕΟΚ (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012).
4. Γεωργόπουλος Σ. Γ., Ζιώγας Β. Ν., Αρχές και Μέθοδοι Καταπολέμησης των Ασθενειών των Φυτών, [Επιμέλεια Έκδοσης Ζιώγας] σελ.73-77, 82, 115, 160, 207-209
5. Μάργαρης, Ν.Σ., Θεοδωράκης, Μ., Καϊναδάς, Η., Φυτοφάρμακα, Υγεία – Περιβάλλον, Εκδόσεις Φιλιππότη, Αθήνα, 2000, σελ. 206-208, 212-213, 264-267.
6. <http://www.esyf.gr/ekdoseis.php?id=23> Το Αλφαβητάρι της Φυτοπροστασίας (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
7. Δημόπουλος Β., Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα, Αθήνα, 1998, σελ. 28-32, 35, 50-51, 53-57.
8. Τζάμος, Ε., Φυτοπαθολογία, Έκδοση Β', Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα, 2007, σελ. 476-479, 484, 489, 490, 491.
9. Ηλιόπουλος Α. Γ., Γενική Φυτοπαθολογία, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, 2004, σελ. 287, 289.
10. Γιαννοπολίτης, Κ., Οδηγός Γεωργικών Φαρμάκων, Αγρότυπος Α.Ε., Αθήνα, 1997, σελ. 45-46, 129-130, 238-239, 304.
11. Αλμπάνης Τ. Α., Πρακτικά 3^{ου} Ευρωπαϊκού Συνεδρίου με θέμα: Φυτοφάρμακα και Συναφείς Οργανικές Ενώσεις στο περιβάλλον, 2004, σελ. 33
12. Ware G. W., The Pesticide Book, 4th Edition, THOMSON PUBLICATIONS, United States of America, 1994, p.p. 41, 110, 119, 130-131, 136, 148, 151-152.
13. Horst L., Modern Selective Fungicides – Properties, Applications, Mechanisms of Action, 2nd revised and enlarged Edition, Gustav Fischer Verlag, Germany, 1995, p.p. 415-417, 420-421, 425-426, 554-556.
14. Παναγόπουλος Χ. Γ., Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου, 4^η Έκδοση, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα, 2007, σελ. 578-579.

15. Παναγόπουλος Χ. Γ., Ασθένειες Κηπευτικών Καλλιεργειών, Β' Έκδοση, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα, 2000, σελ. 304-305.
16. Ελευθεροχωρινός Η. Γ., Ζιζανιολογία, 3^η έκδοση, Αγρότυπος Α.Ε., Αθήνα, 2008, σελ. 17, 60, 89-91, 98-102, 242.
17. Kirkwood R. C., Target sites for herbicide Action, Plenum Press, New York, 1991, p.p. 43-44, 114, 141.
18. Πρακτικά 4^{ης} Πανελλήνιας Συνάντησης Φυτοπροστασίας, Η φυτοπροστασία Σήμερα, Αγρότυπος Α.Ε., Αθήνα 2004, σελ. 155, 159, 160-162, 189-192, 195-197, 249
19. Λυκουρέσης Δ. Π., Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Εντόμων – Εχθρών Καλλιεργειών, (Πανεπιστημιακές Παραδόσεις), Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εργαστήριο Γεωργικής Ζωολογίας και Εντομολογίας, Αθήνα, 1995, σελ. 31-32, 61-62.
20. Πασπάτης, Ε., Φυτορρυθμιστικές Ουσίες (Φυτορμόνες), ΑγροΤύπος Α.Ε., Αθήνα, 1998, σελ. 26-31, 217-230.
21. Παπακώστα – Τασοπούλου Δ., Σιτηρά (Χειμερινά, Εαρινά), Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, 2008, σελ. 46-50.
22. Georgacasis, E., Khan, M., *Nature*, **223**, 1971, pp. 120.
23. Frank den Hond, Peter Groenewegen and Nico M. van Straalen, PESTICIDES Problems, Improvements, Alternatives, Blackwell Science, Berlin, 2003, p.p. 6-9.
24. Hunter-Fujita F. R., Entwistle P. F., Evans H. F., Crook N. E., Insect Viruses and Pest Management, John Wiley & Sons, Chichester, 1998, p.p. 3-4.
25. Lu F.C., *Residues Review*, **45**, 1973, pp. 81-93.
26. Pimentel, D., Techniques for Reducing Pesticide Use, John Wiley & Sons, Chichester, p.p. 13-30, 60-61.
27. Maredia, K.M., Dakouo, D., Mota-Sanchez, D., Integrated Pest Management in the Global Arena, CABI Publishing, Cambridge, 2003, p.p. 74-75, 79-80.
28. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0071:0086:EL:PDF>
Οδηγία 2009/128/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
29. Koul, O., Dhaliwal, G.S., Cuperus, G.W., Integrated Pest Management, Potential, Constraints and Challenges, CABI Publishing, Cambridge, 2004, p.p. 169-170.
30. [http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/EFSA/Eurobarometer GR.pdf](http://www.efet.gr/images/efet_res/docs/EFSA/Eurobarometer_GR.pdf) (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012).

31. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:309:0001:0050:EL:PDF>
Κανονισμός 1107/2009/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
32. Frehse, H., Pesticide Chemistry, Proceedings of the Seventh International Congress of Pesticide Chemistry (IUPAC) Hamburg 1990, VCH, Weinheim, 1991, p.p. 267-268, 564-575.
33. Holland, P.T., Hamilton, D., Ohlin, B., Skidmore, M.W., *Pure & Applied Chemistry*, **66**, 1994, pp. 335-356.
34. Zabik, M.E., Pesticides and other Industrial Chemicals, Toxicological Aspects of Foods, Elsevier, London, 1987, σελ. 73-102.
35. Nagayama, T., *J. of Agric. and Food Chem.*, **44** (8), 1996, pp. 2388-2393.
36. Λέντζα-Ρίζου, X., Επίδραση των μεταποιητικών διαδικασιών στα Υπολείμματα των Γεωργικών Φαρμάκων στα Φυτικά Προϊόντα, Γεωτεχνικά Επιστημονικά Θέματα, **8** (2), 1997, σελ. 83-94.
37. Frehse, H., Pesticide Chemistry, Advances in International Research, Development and Legislation, VCH, Weinheim, 1991, p.p. 361-371, 383-394.
38. Brooks, G., Roberts, T.R., Pesticide Chemistry and Bioscience, The Food-Environment Challenge, Royal Society of Chemistry, 1999, p.p. 421-428.
39. <http://www.gezondheidsraad.nl/sites/default/files/Pesticides%20in%20food.pdf>
(Τελευταία επίσκεψη: Φεβρουάριος 2012).
40. Committee on the Future Role of Pesticides in US Agriculture, The Future Role of Pesticides in US Agriculture, National Academy Press, Washington, D.C., 2000, p.p. 60-61, 123-126.
41. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2005R0396:20060222:EL:PDF>
Κανονισμός 396/2005/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
42. http://www.safeuse.gr/~esyf/docs/The_final_upoleimmata.pdf Οδηγός για τα Υπολείμματα Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων στα Προϊόντα Φυτικής Προέλευσης
(Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
43. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:155:0127:0175:EL:PDF>
Κανονισμός 546/2011/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)

44. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31993L0071:EL:HTML>
Οδηγία 93/71/EOK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
45. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:234:0001:0216:EL:PDF>
Κανονισμός 839/2008/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
46. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2008R0149:20080901:EL:PDF>
Κανονισμός 149/2008/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
47. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:029:0003:0025:EL:PDF>
Κανονισμός 178/2006/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
48. http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012).
49. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31999L0039:EL:HTML>
Οδηγία 1999/39/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
50. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31999L0050:EL:HTML>
Οδηγία 1999/50/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
51. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:041:0033:0036:EL:PDF>
Οδηγία 2003/13/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
52. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:339:0016:0035:EL:PDF>
Οδηγία 2006/125/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
53. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:097:0067:0071:el:PDF>
Κανονισμός 299/2008/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
54. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:187:0030:0043:EL:PDF>
Οδηγία 2002/63/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)

55. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20060428:EL:PDF> Κανονισμός 178/2002/EK (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
56. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:019:0023:0029:EL:PDF> Σύσταση της Επιτροπής της 18ης Ιανουαρίου 2006 (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012).
57. <http://crl-pesticides.eu> (Τελευταία επίσκεψη: Απρίλιος 2012)
58. Μηλιάδης, Γ.Ε., Υπολείμματα φυτοπροστατευτικών προϊόντων και... αμπελόφυλλα, 4ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Φεβρουάριος 2012.
59. Γιαννοπολίτης, Κ. Ν., Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα , Αγρότυπος Α.Ε., Αθήνα, 2000, σελ. 68- 69, 71, 82, 115, 161,-163, 171, 185-186, 198-201.
60. Gareth Jones D., Clifford B. C., Cereal Diseases: Their Pathodology and Control, 2nd ed., John Wiley & Sons, Chichester, 1983, p.p. 177-178.
61. Casida J. E., Pesticides and Alternatives: Innovative Chemical and Biological Approaches to Pest Control, Elsevier Science Publishers, New York, 1990, p.p. 58-61.
62. Ferree D. C., Warrington I. J., Apples Botany, Production, Uses, CAB I Publishing, Cambridge, 2003, p.p. 339, 537.
63. Ολυμπίου Χ. Μ., Τα Βολβώδη Λαχανικά, Εκδόσεις Σταμούλη Α.Ε., Αθήνα, 2008, σελ. 103-104
64. Brewster J. L., Onions and Other Vegetable Alliums, CAB International, Cambridge, 1994, p.p. 158-159.
65. Rabinowitch H. D., Currah L., Allium Crop Science: Recent Advances, CAB I Publishing, London, 2002, p.p. 251.
66. Harris P. M., The Potato Crop, 2nd ed., Chapman & Hall, London, 1992, p.p. 649, 670-671.
67. Jealott' s H., Fifty Years of Agricultural Research 1928-1978, F C Peacock, Birmingham, 1978, p.p. 71,75.
68. Τόλη Ι. Δ., Βαμβάκι: Εχθροί, Ασθένειες, Ζιζάνια, Εκδοτική Επιμέλεια Α. Τριανταφύλλης, Αθήνα, 1986, σελ. 536-538.
69. Hutson D., Miyamoto J., Fungicidal Activity, Chemical and Biological Approaches to Plant Protection, Wiley, New York, 1998, p.p. 62, 67-68.

70. Hewitt H. G., Fungicides in Crop Protection, CAB International, London, 1998, p.p. 121-122.
71. Παπαδοπούλου – Μουρκίδου Ε., Γεωργικά Φάρμακα, Χημεία, Φαρμακολογία (Φαρμακοκινητική/ Μεταβολισμός/ Τρόπος δράσης), Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και Συμπεριφορά και Τύχη στο Περιβάλλον, Εκδόσεις μέθεξις, Θεσσαλονίκη, 2008, σελ. 380, 499.
72. Schumann G. L., D' Acry C. J., Essential Plant Pathology, APS Press, Minnesota, 2006, p.p. 281.
73. Webster, J., and Weber, R.W.S., Introduction to Fungi, 3rd ed., Cambridge University Press, New York, 2007, pp. 113, 119, 297-298, 302-306.
74. Σταμόπουλος Δ. Κ., Έντομα αποθηκών και μεγάλων καλλιεργειών και λαχανικών, Εκδόσεις ΖΗΤΗ, Θεσσαλονίκη, 1995, σελ. 206.
75. Tortora, G.J., Funke, B.R., and Case, C.L., Microbiology, An Introduction, 6th ed, Benjamin/Commings, USA, 1998, pp. 10, 15, 225, 327-328, 453, 531-534, 550-551, 651, 677, 744, 748-749, 754.
76. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2009/10/WC500005166.pdf (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
77. <http://www.agbioforum.org/v3n23/v3n23a13-follet.htm> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
78. <https://www.uni-hohenheim.de/i410b/download/gewisola/papers/boecker.pdf> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
79. <http://www.public.asu.edu/~laserweb/woodbury/classes/bch561/papers/antibiotic%20resistance%20general.pdf> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
80. http://www.avma.org/public_health/antimicrobial_use.pdf (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
81. <http://europa.eu/rapid/pressReleasesAction.do?reference=MEMO/11/792> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
82. Howland, R.D., Mycek, M.J., Φαρμακολογία, 3rd ed., Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα, 2007, p.p. 405-408, 421-429.
83. Evans, W.C., Trease and Evans' Pharmacognosy, 14th ed., London, 1998, p.p. 150, 452.
84. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M., Moore, P.K., Φαρμακολογία, 5th ed., Επιστημονικές Εκδόσεις Παρισιάνου Α.Ε., Αθήνα, 2007, p.p. 671, 674-688, 693-694, 698-699, 730.

85. Μούζουρα, Σ. Γ., Κτηνιατρική Φαρμακολογία, Αθήνα, 1996, p.p 48-60, 89-106.
86. Durckheimer, W., Angew. Chem. Internat. Edit., **14**, 1975, 721-774.
87. Liang, Y., Centon, M., Bates, R., J. Chromatogr. A. **827**, 1998, 45-55.
88. Chopra, I., Roberts, M., Microbiol. Mol. Biol. Rev., **65**, 2001, 232-260.
89. <http://www.sigmaaldrich.com/european-export.html> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
90. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31970L0524:en:NOT> Οδηγία 70/524 EOK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
91. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC99026/> Tetracycline Antibiotics: Mode of Action, Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
92. <http://www.tetoros.gr/> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
93. <http://www.virbac.gr/p-virbacgrpugr/pdf/ProductCatalogue/Vademecum5thEdition2010.pdf> σελ 78-79,115-116, 130-131(Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
94. <http://cmr.asm.org/content/16/2/175.full> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
95. http://pneumonologia.gr/articlefiles/20070131_ANTIBIOTICS_PNEUMONOLOGY.pdf (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
96. Andriole, V.T., The Quinolones, 3rd ed., Academic Press, California, 2000, p.p. 2-6, 13-21, 23-24, 63-79, 139-142, 151, 154-156, 477-482, 489-491.
97. Domagala, J.M., Journal of Antimicrobial Chemotherapy, **33**, 1994, 685–706.
98. Samanidou, V.F., Christodoulou, E.A., Papadoyannis, I.N., Current Pharmaceutical Analysis, **1**, 2005, 155-193.
99. Naber, K., Adams, D., International Journal of Antimicrobial Agents, **10**, 1998, 255-257.
100. <http://www.chemicaland21.com/arokorhi/fc/FLUOROQUINOLONES.htm> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
101. Schwarz, S.E., Chaslus-Dancla, INRA, EDP Sciences, **32**, 2001, 201-225.
102. <http://www.eufic.org/article/el/artid/Meat-lot-little/> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
103. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2009-470/reg_470_2009_el.pdf Κανονισμός 470/2009/EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)

104. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2002R0178:20060428:EL:PDF> Κανονισμός 178/2002/EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
105. <http://www.google.gr/url?sa=t&rct=j&q=%CE%B4%CE%B7%CE%BC%CE%B9%CE%BF%CF%85%CF%81%CE%B3%CE%AF%CE%B1+%CF%84%CE%B7%CF%82+EFSA%2C+FARM+TO+FORK&source=web&cd=2&ved=0CCkQFjAB&url=http%3A%2F%2Fec.europa.eu%2Fpublications%2Fbooklets%2Fmove%2F46%2Fel.doc&ei=2gVmT6bGG8Oo8QOmjPX8Dg&usg=AFQjCNG2fmIc5K3pjmLD80gNFAjBmNqQaQ> (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
106. http://ec.europa.eu/food/efsa_en.htm (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
107. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1996:235:0039:0058:EL:PDF> Οδηγία 96/51 EOK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
108. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:268:0029:0043:EL:PDF> Κανονισμός 1831/2003/EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
109. McEvoy, J.D.G., *Analytica Chimica Acta*, 2002, **473**, 3-26.
110. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2001L0082:20090720:EL:PDF> Οδηγία 2001/82/EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
111. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/dir_2004_28/dir_2004_28_el.pdf Οδηγία 2004/28/EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
112. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:168:0033:0034:el:PDF> Οδηγία 2009/53/EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
113. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:011:0075:0079:EL:PDF> 14 ΙΟΥΝΙΟΥ 2011 Σύσταση της Επιτροπής (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
114. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_1990_2377_cons_2008/reg_1990_2377_consol_el.pdf Κανονισμός 2337/90 EOK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
115. http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_el.pdf Κανονισμός 37/2010/EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)

116. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31990L0167:EL:HTML>
Οδηγία 90/167 EOK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
117. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1996L0023:20090807:EL:PDF>
Οδηγία 96/23/EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
118. Stolker A., Brinkman U., J. Chromatogr. A., 2005, **1067**, 15-23.
119. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:221:0008:0036:EL:PDF>
Απόφαση 2002/657 EK (Τελευταία επίσκεψη Φεβρουάριος 2012)
120. Kokkonen, M., Jestoi, M., Rizzo, A., *Int. J. Food Microbiol.*, 2005, **99**, 207-214.
121. Harrigan, W.F., *Laboratory Methods in Food Microbiology*, 3rd ed., Academic Press, USA, 1998, p.p. 207-208, 234, 289.
122. Μπαλατσούρας, Γ., *Μικροβιολογία Τροφίμων*, Εκδόσεις Έμβρυο, Αθήνα, 2006, σελ. 261-272, 526-531
123. Wood, B.J.B., *Microbiology of Fermented Foods*, 2nd ed., vol.2, Blackie Academic & Professional, London, 1998, pp. 469-470, 825-827, 830
124. Θωμαΐδης Νικόλαος, Αναδυόμενοι Χημικοί Κίνδυνοι, http://trams.chem.uoa.gr/docs/EmergChemRisks_EXPO_20032010.pdf (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
125. http://www.pharmacy.upatras.gr/index.php/el/latest-news/doc_download/109----4
(Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
126. <http://parasites.czu.cz/food/parasite.php?idParasite=88> (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
127. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/topics/Mycotoxins/Pages/Fumonisin.aspx> (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
128. Eaton, D.L., Groopman, J.D., *The Toxicology of Aflatoxins, Human Health, Veterinary, and Agricultural Significance*, Academic Press, Inc., California, 1994, pp. 3- 20, 27-40, 45-50, 137-142, 149-151, 309-316, 327-340, 513-514
129. [http://www.moa.gov.cy/moa/agriculture.nsf/All/64E1E65F4C2DE70CC2257667002F3F0B/\\$file/09.%20MYKOTOKSINES.pdf?OpenElement](http://www.moa.gov.cy/moa/agriculture.nsf/All/64E1E65F4C2DE70CC2257667002F3F0B/$file/09.%20MYKOTOKSINES.pdf?OpenElement) (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
130. Γιαννάκης, Ι., *Μυκοτοξίνες στα Τρόφιμα – Κίνδυνοι και Τρόποι Αντιμετώπισης, Υγιεινή και Ασφάλεια Τροφίμων*, 1998, **8**, 13-18.

131. Creppy, E.E., *Toxicology letters*, 2002, **127**, 19-28.
132. Filtenborg, O., Frisvad, J.C., Thrane, U., *Int. J. Food Microbiol.*, 1996, **33**, 85-102.
133. Egmond, V.H.P., *Food Additives and Contaminants*, 1995, **12**(3), 321-330.
134. Shibamoto, T., Bjeldanes, L.F., *Introduction to Food Toxicology*, Academic Press, Inc, San Diego, 1993, pp. 97,103-110, 142-143
135. http://www.doctorfungus.org/thefungi/Aspergillus_flavus.php (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
136. http://www.fermentek.co.il/ochratoxin_A.htm (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
137. [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(hyaline\)/Penicillium/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(hyaline)/Penicillium/) (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
138. http://www.pf.chiba-u.ac.jp/gallery/fungi/f/Fusarium_verticilloides_macroconidia.htm (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
139. http://jcm.asm.org/content/48/1/338.full_f.pdf (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
140. [http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_\(dematiaceous\)/Alternaria/](http://www.mycology.adelaide.edu.au/Fungal_Descriptions/Hyphomycetes_(dematiaceous)/Alternaria/) (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
141. Bresinsky, A., Besl, H., *A colour Atlas of Poisonous Fungi*, Wolfe Publishing Ltd, London, 1990, pp. 7-8.
142. Sridhar, K.R., *Frontiers in Fungal Ecology, Diversity and Metabolites*, I.K. International Publishing House, New Delhi, 2009, pp. 189-190, 198-207, 213-215-224, 287
143. Wood, B.J.B., *Microbiology of Fermented Foods*, 2nd ed., vol.1, Blackie Academic & Professional, London, 1998, pp. 241, 404-405.
144. Lim, D., *Microbiology*, 2nd ed., WCB Mc Graw-Hill, Boston, 1998, pp. 368-369
145. Townsend, C.A., Christensen, S.B., and Trautwein, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, **106**, 3868-3869.
146. Guzman-de Pena, D., Herrera, J., *J. Fungal Genetics and Biology*, 1997, **21**, 198-205.
147. Yu J, Payne G., Bruce C., Cambell C., *Mycology*, **27**, 2008, 457-472
148. Bennett J. W., *Trichothecenes and Other Mycotoxins*, Edited by J. Lacey, 1985, p. 271-280

149. Reiss, J., *Arch. Microbiol.*, 1982, **133**, 236-238.
150. Obrian, G.R., Ahmad, M.F., and Payne G.A., *Fungal genetics and Biology*, 2003, **39**, 118-127.
151. Fanelli, C., Fabbri, A.A., Finotti, E., Fasella, P., and Passi, S., *Experientia*, 1984, **40**, 191-193.
152. Fabbri, A.A., Fanelli, C., Panfili, G., Passi, S., Fasella, P., *Journal of General Microbiology*, 1983, **129**, 3447-3452.
153. Luchese, R.H., and Harrigan, W.F., *Journal of Applied Bacteriology*, 1993, **74**, 5-14.
154. Passi, S., Nazzaro-Poro, M., Fanelli, C., Fabbriand, A.A., Fasella, P., *Appl.Microbiol. Biotechnol.*, 1984, **19**, 186-190.
155. Luca, C.D., Passi, S., Fabbri, A.A., and Fanelli, C., *Food Additives and Contaminants*, 1995, **3**, 445-450.
156. Fanelli, C., Fabbri, A.A., Finotti, E., and Passi, S., *Journal of General Microbiology*, 1983, **129**, 1721-1723.
157. Jaskiewicz, K., Close, P.M., Thiel, P.G., and Cole, R.G., *Toxicology*, 1988, **3**, 297-307.
158. Mantle, P.G., *Biodeterioration & biodegradation*, 2002, **50**, 143-146.
159. Marquardt, R.R., and Frochlich, A.A., *Journal of Animal Sciences*, 1992, **70**, 3968-3988.
160. Krogh, P., *Food and Chemical Toxicology*, 1992, **30**, 213-224.
161. Osborne, B., Ibe, F., Brown, G., Petagine, F., Scudamore, K., Banks, J., Hetmanski, M., Russo, A., and Brera, C., *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, 2001, **8**, 265-269.
162. Hohler, D., *Zeitschrift fur ernahrungswissenschaft*, 1998, **37**, 2-12.
163. Dirheimer, G., *Food Additives and Contaminants*, 1996, **13**, 45-48.
164. Steyn, P.S., *Toxicology Letters*, 1995, **82-83**, 843-851.
165. Oswald, I.P., Desautels, C., *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(10), 5870-5874.
166. Harrison L.H., Colvin B.M., Greene J.T., Newman L.E., Cole J.R., *J. Vet. Diagn. Invest.* **2**, 1990, 217.
167. Gelderblom W.C.A., Kriek N.P.J., Marasas W.F.O., Thiel P.G., *Carcinogenesis* **12**, 1991, 1247.

168. Sydenham E.W., Shephard G.S., Thiel P.G., Marasas W.F.O, Stockenstorm S., *J Agric Food Chem*,1991, **39**, 2014-2018
169. Foreman J.H., onstable P.D., Waggoner A.L., Levy L., Eppley R.M., Smith G.W., Tumbleson M.E., Haschek W.M., *J Vet Intern Med*, 2004, **18**, 223-230.
170. Rheeder J.P., Marasas W.F.O., Thiel P.G., Sydenham E.W., Shephard G.S., Schalkwyk D.J., *Phytopathologia* **82**, 1992, 353.
171. Harrison L.R., Colvin J.T., Greene L.E., Newman L.E., Cole Jr. *J Vet Diagn Investig*,1990, **2**, 217-221
172. Bucci T., Hansen D.K., LaBorde J.B.: *Nat Toxins*,1996, **4**, 51-52.
173. Thakur R.A., Smith J.S., *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1996, 1047
174. Jackson L.S., Hlywka J.J., Senthil K.R., Bullerman L.B., Musser S.M., *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1996, 906
175. Constable, P.D., Geoffrey, W.S., *American Journal of Physiology and Heart Circulation Physiology*, **284**, 2034-2044.
176. Ramasami, S., Wang, E., *Toxicological Applied Pharmacology*, **133**, 343-348.
177. Creppy, E.E., *Toxicology Letters*, 2002, **127**, 19-28.
178. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/NaturalToxins/ucm212899.htm> (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
179. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EL:PDF>
Κανονισμός 1881/2006/EK (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
180. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:070:0012:0034:EL:PDF>
Κανονισμός 401/2006/EK (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
181. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:052:0032:0043:EL:PDF>
Κανονισμός 178/2010/EK (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
182. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:255:0014:0017:EL:PDF>
Κανονισμός 1126/2007/EK (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
183. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:035:0007:0008:EL:PDF>
Κανονισμός 105/2010/EK (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)

184. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:229:0007:0009:EL:PDF>
Σύσταση της Επιτροπής 2006/576/EK (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
185. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2010:050:0008:0012:EL:PDF>
Κανονισμός 165/2010/EK (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
186. [http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/FAC945DEFCA2A688C22578E700271E77/\\$file/Kanonismos574_2011.pdf?OpenElement](http://www.moa.gov.cy/moa/da/da.nsf/All/FAC945DEFCA2A688C22578E700271E77/$file/Kanonismos574_2011.pdf?OpenElement) Κανονισμός 574/2011/EK
(Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
187. http://europa.eu/legislation_summaries/food_safety/contamination_environmental_factors/l21290_el.html (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
188. Strobel, H.A., Heineman, W.R., Chemical Instrumentation: A Systematic Approach, 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd, New York, 1989, pp 673, 686-688, 698, 705-710, 863-875, 927-938.
189. Braithwaite, A., Smith, F.J., Chromatographic Methods, 5th edition, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London (1996).
190. Dong, M.W., Modern HPLC for Practicing Scientists, John Wiley & Sons Inc., New Jersey, 2006, pp 1-13, 15-40, 78-86
191. A. Wilkowska, M. Biziuk, Food Chemistry **125**, 2011, 803–812.
192. Skoog A., Holler F., Nieman T.A., Απόδοση στα ελληνικά Καραγιάννης Μ.Ι., Ευσταθίου Κ.Η., Χανιωτάκης Ν., Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, Εκδόσεις Κωσταράκη, Αθήνα, 2002, 301-323, 577-604, 785-812, 844-860, 881
193. Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Glajch, J.L., Practical HPLC Method Development, 2nd ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 1997, pp 21-30, 41-43, 46-50, 175-203, 205-212, 268-282, 317-320
194. Μηλιάδης, Γ.Ε., Υγρή Χρωματογραφία, Θεωρία-Εφαρμογές, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Σεμινάριο.
195. Μηλιάδης, Γ.Ε., Υγρή Χρωματογραφία, Αριστοποιημένη Χρήση Φυτοφαρμάκων-Λιπασμάτων, Επιπτώσεις στο περιβάλλον & Προστασία του Καταναλωτή, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Κηφισιά, 1998, σελ. 6-16, 25-32, 34-52.
196. *A Practical Guide to HILIC, A Tutorial and Application book*, 1st ed., SeQuant AB, Umeå, Sweden, 2008, pp. 3-11

197. Χατζηιωάννου, Θ.Π., Κουππάρης, Μ.Α., Ενόργανη Ανάλυση, 6η έκδ., Αθήνα, 2005, σελ. 334-349.
198. E.K. Paleologos, M.G. Kontominas, *J. Chromatogr. A*, **1077**, 2005, 128-135
199. L. Pang, Q. Liang, Y.Wang, L. Ping, G. Luo, *J. Chromatogr. B*, **869**, 2008, 118-125
200. Y. Zhang, C. Caporuscio, J. Dai, M. Witkus, A. Rose, J. Santella, C. D'Arienzo, D. B.Wang-Iverson, A. A. Tymiak, *J. Chromatogr. B*, **875**, 2008, 154-160
201. B. Shao, J. Hu, M. Yang, *J. Chromatogr. A*, **950**, 2002, 167-174
202. X. Wang, P.W. Carr, *J. Chromatogr. A*, **1154**, 2007, 165-173
203. Ardrey, R.E., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An introduction*, John Wiley & Sons Ltd, Cornwall, 2003, pp 46-48, 129-138, 185-188, 203-222.
204. Macrae, R., *HPLC in Food Analysis*, 2nd ed., Academic Press Ltd, San Diego, 1988, pp 414-416, 436-439, 471-475, 485, 489.
205. http://www.chem.uoa.gr/courses/analtechn/SAT_02_Mass_Spectrometry_pt1.pdf
(Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
206. Meyers, R.A., *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 1st ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2011, vol. S1, pp 521-557
207. Hofman, E., Stroobant, V., *Mass Spectrometry, Principles and Applications*, 3rd ed., John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 2007, pp 6-12, 20-56.
208. Gross, M.L., Caprioli, R.M., *The Encyclopedia of Mass Spectrometry*, 1st ed., Elsevier, Oxford, 2005, pp 585- 591.
209. Pasilis, S., ,A. Somogyi, Herrmann, Pemberton, J.E., *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **17** (2), 2006, 230-240.
210. Sparkman, O.D., *Mass Spectrometry Desk Reference*, 2nd ed., Global View Publishing, Pittsburgh, 2006, pp 55, 103-105
211. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/esi-ionisation.html> (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
212. http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/tools/ionization_esi.html
(Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
213. Λιαπής Κ.Σ., Σεμινάριο Διαπίστευση εργαστηρίων σύμφωνα με το πρότυπο ISO/IEC 17025:2005, EEX
214. http://www.chem.uoa.gr/courses/analtechn/SAT_03_Mass_Spectrometry_pt2.pdf
(Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)

215. Cappiello A, Famiglini G, Pierini E, Palma P, Trufelli H., *Anal Chem* **79**, 2007, 5364-5372
216. D. Zimmer, *Chromatographia*, **57**, 2003, S325- S332.
217. http://tccc.iesl.forth.gr/AMS_EPEAEK/courses/LazPap/MSLab_AMS.htm
(Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
218. Fernández-Alba A.R., García-Reyes J.F., *Trends Anal Chem* vol. 27, 2008, pp. 973-990
219. <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/theory/detection.html> (Τελευταία επίσκεψη Μάρτιος 2012)
220. Ikegami, T., Tomomatsu, K., Tabuko H., Horie, K., Tanaka, N., *Journal of Chromatography A*, **1184**, 2008, 474-503.
221. Nguyen, H.P., Schug, K.A., *J. of Separation Science*, **31**, 2008, 1465-1480.
222. <http://www.scopus.com/> (τελευταία επίσκεψη Οκτώμβριος 2012).
223. Alpert, A.J., *J. Chromatogr.*, **499**, 1990, 177-197
224. Wang, P. G., He, W., *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) and Advanced Applications*, 1st ed., CRC Press, Taylor & Francis, New York, 2011, pp. 1-25, 27-29, 48-50, 77-78, 89-90, 95-96, 105-106, 133, 150-153, 158-160, 225-256, 309- 341, 401-423, 428, 492.
225. Niessen, W. M. A., *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*, 3rd ed., CRC Taylor & Francis, **97**, pp.14-15, 161, 305- 306, 318, 558
226. Neue, U. D., *HPLC COLUMNS, Theory, Technology, and Practice*, Wiley-WCH, New York, pp. 217-223
227. Bernal, J., Ares, A. M., Pól, J., Wiedmer, S. K., *Journal of Chromatography A*, **1218**(42), 2011, 7438-7452.
228. Langrock, T., Czihal, P., and Hoffmann, R., *Amino Acids*, **30**, 2006, 291–297.
229. http://www.sielc.com/Technology_HILIC.html (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2012).
230. <http://www.sequant.com/files/documents/support/MerckSeQuant.ZIC-HILIC.Brochure.For All Who Expect More - SeQuant ZIC-HILIC HPLC Columns.pdf> (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2012).
231. Lecomte, F., Hubert, C., Demarche, S., De Bleye, C., Dispas, A., Jost, M., Frankenne, F., Ceccato, A., Rozet, E., Hubert, Ph., *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **57**, 2012, 153-165

232. Ruta, J., Boccard, J., Cabooter, D., Rudaz, S., Desmet, G., Veuthey, J.-L., Guilleme, D., *J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **63**, 2012, 95-105
233. Xiong, Z., Zhang, Y., Qin, F., Qin, T., Yang, S., Li, F., *J. Chromatogr. B*, **878**(23), 2010, 2111-2116
234. [Tölgyesi](#), L., [Kele](#), P. and [Torkos](#), K., *Chromatographia*, **71**(1), 2010, 75-80.
235. Chiao Chan C., Koesukwiwat U., Yudthavorasit S., Leepipatpiboon N., *Analytica Chimica Acta*, **682**(1-2), 2010, 117-129
236. Kinsella, B., O'Mahony, J., Malone, E., Moloney, M., Cantwell, H., Furey, A., Danaher, M., *J. Chromatogr. A*, **1216**(46), 2009, 7977-8015
237. Borràs, S., Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Pérez-Vendrell, A.M., Brufau, J., Medina, M., Bosch, J., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **30** (7), 2011, 1042-1064
238. Gremilogianni, A. M., Megoulas, N. C., Koupparis, M. A., *J. Chromatogr. A*, **1217**(43), 2010, 6646-6651
239. Alpert, A.J., *Anal. Chem.*, **80**, 2008, 62-76
240. Yoshioka, N., Asano, M., Kuse, A., Mitsuhashi, T., Nagasaki, Y., Ueno, Y., *J. Chromatogr. A*, **1218**(23), 2011, 3675-3680
241. Esparza, X., Moyano, E., Galceran, M.T., *J. Chromatogr. A*, **1216**(20), 2009, 4402-4406
242. Lindh, C. H., Littorin, M., Johannesson, G., Jonsson, B. A.G., *Journal of Chromatography B*, **879**(19), 2011, 1551-1556.
243. Bicker, W., Wu J., Lämmerhofer, M., Lindner, W., *J. Sep. Sci.*, **31**, 2008, 2971-2987
244. Kirsch, S. H., Herrmann, W., Rabagny, Y., Obeid, R., *Journal of Chromatography B*, **878**(32), 2010, pp. 3338-3344.
245. Spagou, K., Wilson, I. D., Masson, P., Theodoridis, G., Raikos, N., Coen, M., Holmes, E., Lindon, J. C., Plumb, R. S., Nicholson, J. K., and Want, E. J., *Anal. Chem.*, **83**, 2011, 382-390.
246. Van Nuijs, A.L.N., Tarcomnicu, I., Covaci, A., *Journal of Chromatography A*, **1218**(35), 2011, 5964-5974.
247. McCalley, D.V., *J. Chromatogr. A*, **1171**, 2007, 46-56
248. Grumbach, E. S., Wagrowski-Diehl, D. M., Mazzeo, J. R., Alden, B., Iraneta P.C., *LCGC North America*, **22**(10), 2004, 1010-1023.
249. McCalley, D.V., Neue, U.D., *J. Chromatogr. A* **1192**, 2008, 225-229

250. Dejaegher, B., Mangelings, D., Vander Heyden, Y., *J. Separation Science*, **31**, 2008, 1438-1448.
251. <http://www.chromacademy.com/> (τελευταία επίσκεψη Απρίλιος 2012).
252. Novakova, L., Solichova, D., Pavlovikova, S., Solich, P., *J. of Separation Science*, **31**, 2008, 1634-1644.
253. Liu, M., Ostovic, J., Chen, E. X., Cauchon, N., *Journal of Chromatography A*, **1216**, 2009, 474-503.
254. Hao, Z., Xiao, B., Weng, N., *J. of Separation Science*, **31**, 2008, 1449-1464.
255. Guo, Y., Gaiki, S., *J. of Chromatogr. A*, **1218**(35), 2011, 5920-5938.
256. Chirita R.-I., West C., Zubrzycki S., Finaru A.-L., Elfakir C., *J. Chromatogr. A*, **1218**(35), 2011, 5939-5963.
257. Tomlin C. D. S., *The Pesticide Manual*, 13th Edition, British Crop Protection Council, UK, 2003, p.p. 30, 163, 261, 341, 500, 593, 603, 625, 742.

Παράρτημα 1: Τα ανώτατα όρια καταλοίπων για τα φυτοποστατευτικά προϊόντα που μελετήθηκαν σε διάφορα τρόφιμα σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία. [55]

Φυτοποστα- τευτικά προϊόντα	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (ΑΟΚ) (MRLs) (mg/kg)									ΚΑΝΟΝΙ ΣΜΟΙ (ΕΚ)
	Μηλοει- -δή (Μήλα)	Πυρηνόκαρ- πα (Βερίκοκα)	Βολβώδη λαχανικά (Κρεμμύ- δια)	Φυλλώδη λαχανικά (Μαρούλια)	Παιδικές Τροφές (φρουτό- κρεμα) 99/39/ΕΚ	Όσπρια (Ρεβίθια)	Δημητρι- ακά (Αλεύρι)	Κρέας (Χοιρινός Κιμάς)	Γάλα (Αγε- λάδας)	
Amitrole	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	-	-	149/2008
Chlormequat chloride	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01	0,05	0,05	0,05	0,05	822/2009
Cyromazine	0,05	0,05	0,05	3	0,01	0,05	0,05	0,05	0,02	559/2011
Diquat	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01	0,2	0,05	0,05	0,05	149/2008
Daminozide (άθροισμα daminozide και 1,1- διμεθυλοϋδροζι- νης εκφραζόμενο ως daminazide)	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02	0,05	0,05	149/2008

Fosetyl- aluminium (άθροισμα fosetyl + φωσφορώ- δους οξέος και των αλάτων τους, εκφραζόμενο ως fosetyl)	75	2	50	75	0,01	2	2	0,5	0,1	459/2010
Maleic hydrazide	0,2	0,2	15	0,2	0,01	0,2	0,2	0,05	0,2	149/2008
Mepiquat chloride	0,05	0,05	0,05	0,05	0,01	0,05	2	0,05	0,1	839/2008
Paraquat	0,02	0,02	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02			520/2011
Propineb	0,3	0,05	0,05	0,05	0,01	0,05	0,05			149/2008
Kasugamycin	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	396 / 2005
Oxytetracy- cline	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01			396 / 2005

Παράρτημα 2: Τα ανώτατα όρια καταλοίπων για τα αντιβιοτικά που μελετήθηκαν σε διάφορα τρόφιμα ζωικής προέλευσης σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία. [125,136]

Φαρμακολογικώς δραστική ουσία	Κατάλοιπο-δείκτης	Ζωικά είδη	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (ΑΟΚ) µg/kg	Ιστοί-στόχοι	Άλλες διατάξεις (σύμφωνα με το άρθρο14 παράγραφος7 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 470/2009)	Θεραπευτική ταξινόμηση
Τετρακυκλίνη, Χλωροτετρακυκλίνη	Άθροισμα του μητρικού φαρμάκου και του 4-επιμερούς του	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 300 600 100 200	Μύες Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια.	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Αντιβιοτικά
Οξυτετρακυκλίνη	Άθροισμα του μητρικού φαρμάκου και του 4-επιμερούς του	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 300 600 100 200	Μύες Ήπαρ Νεφροί Γάλα Αβγά	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, για το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια.	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Αντιβιοτικά
Δοξυκυκλίνη	Δοξυκυκλίνη	Βοοειδή	100 300 600	Μύες Ήπαρ Νεφροί	Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν γάλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο.	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Αντιβιοτικά
		Χοίροι, πουλερικά	100 300 300 600	Μύες Δέρμα (και λιπώδης ιστός) Ήπαρ Νεφροί	Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.	

Φαρμακολογικώς δραστική ουσία	Κατάλοιπο- δείκτης	Ζωικά είδη	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (ΑΟΚ) µg/kg	Ιστοί-στόχοι	Άλλες διατάξεις (σύμφωνα με το άρθρο14 παράγραφος7 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 470/2009)	Θεραπευτική ταξινόμηση
Δανοφλοξακίνη	Δανοφλοξακίνη	Βοοειδή, πρόβατα, αίγες, πουλερικά	200 100 400 400	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια. Για τους χοίρους, το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία». Για τα πουλερικά το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία». Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν γάλα ή αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Αντι- βιοτικά
		Όλα τα άλλα είδη παραγωγής τροφίμων	100 50 200 200	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί		
		Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	30	Γάλα		

Φαρμακολογικώς δραστική ουσία	Κατάλοιπο- δείκτης	Ζωικά είδη	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (ΑΟΚ) µg/kg	Ιστοί-στόχοι	Άλλες διατάξεις (σύμφωνα με το άρθρο14 παράγραφος7 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 470/2009)	Θεραπευτική ταξινόμηση
Ενροφλοξακίνη	Άθροισμα της ενροφλοξακίνης και της κιπροφλοξακί- νης	Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	100 100 300 200 100	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί Γάλα	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία».	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Αντι- βιοτικά
		Χοίροι, κουνέλια	100 100 200 300	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια.	
		Πουλερικά	100 100 200 300	Μύες Δέρμα (και λιπώδης ιστός) Ήπαρ Νεφροί	Για τους χοίρους, το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία».	
		Όλα τα άλλα είδη παραγωγής τροφίμων	100 100 200 200	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.	
Μαρβοφλοξα- κίνη	Μαρβοφλοξα- κίνη	Βοοειδή, χοίροι	150 50 150 150	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Για τους χοίρους, το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία».	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Αντι- βιοτικά
		Βοοειδή	75	Γάλα		

Φαρμακολογικώς δραστική ουσία	Κατάλοιπο- δείκτης	Ζωικά είδη	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (ΑΟΚ) µg/kg	Ιστοί-στόχοι	Άλλες διατάξεις (σύμφωνα με το άρθρο14 παράγραφος7 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 470/2009)	Θεραπευτική ταξινόμηση
Φλουμεκίνη	Φλουμεκίνη	Βοοειδή, πρόβατα, αίγες, χοίροι	200 300 500 1 500	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Για τους χοίρους, το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία». Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Αντι- βιοτικά
		Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	50	Γάλα		
		Πουλερικά	400 250 800 1 000	Μύες Δέρμα (και λιπώδης ιστός) Ήπαρ Νεφροί		
		Ψάρια	600	Μύες και δέρμα σε φυσική αναλογία		
		Όλα τα άλλα είδη παραγωγής τροφίμων	200 250 500 1 000	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί		
Οξολινικό οξύ	Οξολινικό οξύ	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 50 150 150	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια. Για τους χοίρους και τα	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Αντι- βιοτικά

					πουλερικά το ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό αφορά το «δέρμα και το λιπώδη ιστό σε φυσική αναλογία». Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν γάλα ή αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.	
Φαρμακολογικώς δραστική ουσία	Κατάλοιπο-δείκτης	Ζωικά είδη	Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (ΑΟΚ) µg/kg	Ιστοί-στόχοι	Άλλες διατάξεις (σύμφωνα με το άρθρο14 παράγραφος7 του κανονισμού (ΕΚ) αριθ. 470/2009)	Θεραπευτική ταξινόμηση
Σουλφοναμίδες (Όλες οι ουσίες που ανήκουν στην ομάδα των σουλφοναμιδών) Σουλφαδιμιδίνη, Σουλφαμεραζίνη, Σουλφαμεθόξυπυριδαζίνη, Σουλφαχλώροπυριδαζίνη, Σουλφαντιμεθοξίνη	Μητρικό φάρμακο	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 100 100 100	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Το σύνολο των καταλοίπων από όλες μαζί τις ουσίες της ομάδας των σουλφοναμιδών δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 µg/kg. Για τα ψάρια τα ΑΟΚ για τους μύες αφορούν τους «μύες και το δέρμα σε φυσική αναλογία». Τα ΑΟΚ για το λιπώδη ιστό, το ήπαρ και τους νεφρούς δεν ισχύουν για τα ψάρια. Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν αβγά για κατανάλωση από τον άνθρωπο.	Φάρμακα κατά των λοιμώξεων/Χημειοθεραπευτικά
		Βοοειδή, πρόβατα, αίγες	100	Γάλα		
Κυρομαζίνη	Κυρομαζίνη	Πρόβατα	300 300 300 300	Μύες Λιπώδης ιστός Ήπαρ Νεφροί	Να μην χρησιμοποιείται σε ζώα που παράγουν γάλα για κατανάλωση από τον άνθρωπο.	Παρασιτοκτόνα/Φάρμακα κατά των εκτοпараσιτών

Παράρτημα 3: Τα μέγιστα επιτρεπτά όρια μυκοτοξινών για διάφορες κατηγορίες τροφίμων και ζωοτροφών σύμφωνα με την ευρωπαϊκή νομοθεσία. [246,249,250,251,252,253,254]

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Αφλατοξίνες	Τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και άλλοι ελαιόσποροι, που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα με εξαίρεση: τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και τους άλλους ελαιόσπορους για σύνθλιψη για την παραγωγή εξευγενισμένου φυτικού ελαίου	Αφλατοξίνη B1	8,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	15,0	
		Αφλατοξίνη M1	-	
Αφλατοξίνες	Αμύγδαλα, φυστίκια και πυρήνες βερίκοκων που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	Αφλατοξίνη B1	12,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	15,0	
		Αφλατοξίνη M1	-	
Αφλατοξίνες	Φουντούκια και καρύδια Βραζιλίας, που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	Αφλατοξίνη B1	8,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	15,0	
		Αφλατοξίνη M1	-	

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Αφλατοξίνες	Ακρόδρυα, (εκτός από τα ακρόδρυα που αναφέρονται παρακάτω) που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	Αφλατοξίνη Β1	5,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	10,0	
		Αφλατοξίνη Μ1	-	
Αφλατοξίνες	Τα αράπικα φιστίκια (αραχίδες) και οι άλλοι ελαιόσποροι και τα επεξεργασμένα προϊόντα αυτών που προορίζονται για την άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα, με εξαίρεση: Α) τα ακατέργαστα φυτικά έλαια που προορίζονται για εξευγενισμό και Β) τα εξευγενισμένα φυτικά έλαια	Αφλατοξίνη Β1	2,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	4,0	
		Αφλατοξίνη Μ1	-	
Αφλατοξίνες	Αμύγδαλα, φιστίκια και πυρήνες βερίκοκων, προοριζόμενοι για την άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	Αφλατοξίνη Β1	8,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	10,0	
		Αφλατοξίνη Μ1	-	

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Αφλατοξίνες	Φουντούκια και καρύδια Βραζιλίας, προοριζόμενα για την άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	Αφλατοξίνη B1	5,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	10,0	
		Αφλατοξίνη M1	-	
Αφλατοξίνες	Ακρόδρυα, εκτός από τα ακρόδρυα που αναφέρονται παρακάτω, και μεταποιημένα προϊόντα αυτών, που προορίζονται για την άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα	Αφλατοξίνη B1	2,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	4,0	
		Αφλατοξίνη M1	-	
Αφλατοξίνες	Ξηρά φρούτα που υφίστανται κατεργασία διαλογής ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα.	Αφλατοξίνη B1	5,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	10,0	
		Αφλατοξίνη M1	-	

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Αφλατοξίνες	Ξηρά φρούτα και μεταποιημένα προϊόντα τους που προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο ή για χρήση ως συστατικά σε τρόφιμα.	Αφλατοξίνη Β1	2,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	4,0	
		Αφλατοξίνη Μ1	-	
Αφλατοξίνες	Όλα τα δημητριακά και όλα τα παράγωγα προϊόντα αυτών, συμπεριλαμβανομένων των μεταποιημένων προϊόντων δημητριακών, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται παρακάτω	Αφλατοξίνη Β1	2,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	4,0	
		Αφλατοξίνη Μ1	-	
Αφλατοξίνες	Ο αραβόσιτος και το ρύζι που υπόκεινται σε διαλογή ή άλλη φυσική κατεργασία πριν από την κατανάλωση από τον άνθρωπο ή τη χρήση ως συστατικό σε τρόφιμα.	Αφλατοξίνη Β1	5,0	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	10,0	
		Αφλατοξίνη Μ1	-	

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Αφλατοξίνες	Νωπό γάλα, γάλα που υφίσταται θερμική επεξεργασία και γάλα για την παρασκευή προϊόντων με βάση το γάλα	Αφλατοξίνη Β1	-	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	-	
		Αφλατοξίνη Μ1	0,050	
Αφλατοξίνες	Τα εξής είδη καρυκευμάτων: Capsicum spp (αποξηραμένοι καρποί, ολόκληροι ή αλεσμένοι, συμπεριλαμβανομένου του τσίλι, του τσίλι σε σκόνη, του καγιέν και της πάπρικας) Piper spp (καρποί, συμπεριλαμβανομένου του λευκού και του μαύρου πιπεριού) Myristica fragrans (μοσχοκάρυδο) Zingiber officinale (ζιγγίβερη) Curcuma longa (κούρκουμα) Μείγμα καρυκευμάτων που περιέχει ένα ή περισσότερα από τα προαναφερόμενα καρυκεύματα	Αφλατοξίνη Β1	5,0	
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	10,0	
		Αφλατοξίνη Μ1	-	
Αφλατοξίνες	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	Αφλατοξίνη Β1	0,10	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών Β1, Β2, G1 και G2	-	
		Αφλατοξίνη Μ1	-	

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Αφλατοξίνες	Παρασκευάσματα για βρέφη και παρασκευάσματα δεύτερης βρεφικής ηλικίας, συμπεριλαμβανομένου του γάλακτος για βρέφη και του γάλακτος δεύτερης βρεφικής ηλικίας	Αφλατοξίνη B1	-	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	-	
		Αφλατοξίνη M1	0,025	
Αφλατοξίνες	Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη	Αφλατοξίνη B1	0,10	165/2010
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	-	
		Αφλατοξίνη M1	0,025	
Αφλατοξίνες	Παιδικές τροφές και τις τροφές που προορίζονται για βρέφη και μικρά παιδιά	Αφλατοξίνη B1	0,10	Οδηγίες 2006/125 και 2006/141
		Άθροισμα των αφλατοξινών B1, B2, G1 και G2	-	
		Αφλατοξίνη M1	0,025	

Ομάδα Μυκοτοξίνων	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Αφλατοξίνες	Πρώτες ύλες ζωοτροφών	Αφλατοξίνη Β1	0,02 Μέγιστη περιεκτικότητα σε mg/kg που αφορά ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %	574/2011
Αφλατοξίνες	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές, εκτός από: Α) σύνθετες ζωοτροφές για βοοειδή γαλακτοπαραγωγής και μόσχους, πρόβατα γαλακτοπαραγωγής και αμνούς, αίγες γαλακτοπαραγωγής και ερίφια, χοιρίδια και κοτόπουλα, και Β) σύνθετες ζωοτροφές για βοοειδή (εκτός από τα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής και τους μόσχους), πρόβατα (εκτός από τα πρόβατα γαλακτοπαραγωγής και τους αμνούς), αίγες (εκτός από τις αίγες γαλακτοπαραγωγής και τα ερίφια) και χοίρους (εκτός από τα χοιρίδια) και πουλερικά (εκτός από τα κοτόπουλα)	Αφλατοξίνη Β1	0,01 Μέγιστη περιεκτικότητα σε mg/kg που αφορά ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %	574/2011
Αφλατοξίνες	Σύνθετες ζωοτροφές για βοοειδή γαλακτοπαραγωγής και μόσχους, πρόβατα γαλακτοπαραγωγής και αμνούς, αίγες γαλακτοπαραγωγής και ερίφια, χοιρίδια και κοτόπουλα.	Αφλατοξίνη Β1	0,005 Μέγιστη περιεκτικότητα σε mg/kg που αφορά ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %	574/2011

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Αφλατοξίνες	Σύνθετες ζωοτροφές για βοοειδή (εκτός από τα βοοειδή γαλακτοπαραγωγής και τους μόσχους), πρόβατα (εκτός από τα πρόβατα γαλακτοπαραγωγής και τους αμνούς), αίγες (εκτός από τις αίγες γαλακτοπαραγωγής και τα ερίφια) και χοίρους (εκτός από τα χοιρίδια) και πουλερικά (εκτός από τα κοτόπουλα)	Αφλατοξίνη Β1	0,02 Μέγιστη περιεκτικότητα σε mg/kg που αφορά ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %	574/2011
Ωχρατοξίνες	Σταφίδες (κορινθιακή, ξανθή σταφίδα και σουλτανίνα)	Ωχρατοξίνη Α	10,0	1881/2006
Ωχρατοξίνες	Διαλυτός καφές (στιγμιαίος καφές)	Ωχρατοξίνη Α	10,0	1881/2006
Ωχρατοξίνες	Οίνοι (συμπεριλαμβανομένων των αφρωδών οίνων, εξαιρουμένων των οίνων λικέρ και των οίνων με αλκοολικό τίτλο όχι μικρότερο του 15 % vol) και ποτά που προέρχονται από ζύμωση φρούτων	Ωχρατοξίνη Α	2,0	1881/2006
Ωχρατοξίνες	Αρωματισμένοι οίνοι, αρωματισμένα ποτά με βάση τον οίνο και αρωματισμένα κοκτέιλ αμπελοοινικών προϊόντων	Ωχρατοξίνη Α	2,0	1881/2006

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Ωχρατοξίνες	Χυμός σταφυλιών, συμπυκνωμένος χυμός σταφυλιών, όπως αυτός ανασυστάθηκε, νέκταρ σταφυλιών, γλεύκος σταφυλιών και συμπυκνωμένος γλεύκος σταφυλιών όπως αυτός ανασυστάθηκε, οι οποίοι προορίζονται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο	Ωχρατοξίνη Α	2,0	1881/2006
Ωχρατοξίνες	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τα δημητριακά και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	Ωχρατοξίνη Α	0,50	1881/2006
Ωχρατοξίνες	Διαιτητικά τρόφιμα για ειδικούς ιατρικούς σκοπούς που προορίζονται ειδικά για βρέφη	Ωχρατοξίνη Α	0,50	1881/2006
Ωχρατοξίνες	Ωμός καφές, ξηρά φρούτα εκτός από τις σταφίδες, μπίρα, κακάο και προϊόντα με βάση το κακάο, λικέρ, προϊόντα με βάση το κρέας, καρυεύματα και γλυκόριζα	Ωχρατοξίνη Α	-	1881/2006
Ωχρατοξίνες	Καρυεύματα: Capsicum spp.(αποξηραμένοι καρποί, ολόκληροι ή αλεσμένοι, συμπεριλαμβανομένου του τσίλι, του τσίλι σε σκόνη, του καγιέν και της πάπρικας) Piper spp. (καρποί, συμπεριλαμβανομένου του λευκού και του μαύρου πιπεριού) Myristica fragrans (μοσχοκάρυδο) Zingiber officinale (ζιγγίβερη) Curcuma longa (κούρκουμα) Μείγμα μπαχαρικών που περιέχει ένα ή περισσότερα από τα προαναφερόμενα μπαχαρικά	Ωχρατοξίνη Α	30 µg/kg από την 1/7/2010 έως τις 30/6/2012 15 µg/kg από την 1/7/2012	105/2010

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Ωχρατοξίνες	Γλυκύρριζα (<i>Glycyrrhiza glabra</i> , <i>Glycyrrhiza inflata</i> και άλλα είδη) Ρίζα γλυκύρριζας, συστατικό για φυτικό αφέψημα	Ωχρατοξίνη Α	20	105/2010
Ωχρατοξίνες	Εκχύλισμα γλυκύρριζας, για χρήση στα τρόφιμα ιδίως στα ποτά και στη ζαχαροπλαστική	Ωχρατοξίνη Α	80	105/2010
Ωχρατοξίνες	Παιδικές τροφές και τις τροφές που προορίζονται για βρέφη και μικρά παιδιά καθώς και για τα διαιτητικά τρόφιμα που προορίζονται για ειδικές ιατρικές χρήσεις ειδικά για βρέφη	Ωχρατοξίνη Α	0,5	Οδηγίες 2006/125 και 2006/141
Ωχρατοξίνες	Πρώτες ύλες ζωοτροφών Δημητριακά και προϊόντα δημητριακών	Ωχρατοξίνη Α	0,25 (Καθοδηγητική τιμή σε mg/kg για ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %)	576/2006
Ωχρατοξίνες	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για χοίρους	Ωχρατοξίνη Α	0,05 (Καθοδηγητική τιμή σε mg/kg για ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %)	576/2006
Ωχρατοξίνες	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για πουλερικά	Ωχρατοξίνη Α	0,1 (Καθοδηγητική τιμή σε mg/kg για ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %)	576/2006

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (μg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Φουμονισίνες	Μη μεταποιημένος αραβόσιτος, εξαιρουμένου του μη μεταποιημένου αραβόσιτου που προορίζεται για επεξεργασία με υγρή άλεση	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	4000	1126/2007
Φουμονισίνες	Αραβόσιτος που προορίζεται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο, εξαιρουμένων των τροφίμων που παρατίθενται παρακάτω	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	1000	1126/2007
Φουμονισίνες	Δημητριακά για πρωινό με βάση τον αραβόσιτο και σνακ με βάση τον αραβόσιτο	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	800	1126/2007
Φουμονισίνες	Μεταποιημένα τρόφιμα με βάση τον αραβόσιτο και παιδικές τροφές για βρέφη και μικρά παιδιά	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	200	1126/2007
Φουμονισίνες	Κλάσματα άλεσης αραβόσιτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 μικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1103 13 ή 1103 20 40 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβόσιτου με μέγεθος σωματιδίων > 500 μικρόμετρα που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	1400	1126/2007

Ομάδα Μυκοτοξινών	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Φουμονισίνες	Κλάσματα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων ≤ 500 µικρόμετρα που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1102 20 και άλλα προϊόντα άλεσης αραβοσίτου με μέγεθος σωματιδίων ≤ 500 µικρόμετρα που δεν χρησιμοποιούνται για άμεση κατανάλωση από τον άνθρωπο και που υπάγονται στον κωδικό ΣΟ 1904 10 10	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	2000	1126/2007
Φουμονισίνες	Πρώτες ύλες ζωοτροφών αραβόσιτος και προϊόντα αραβοσίτου	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	60 (Καθοδηγητική τιμή σε mg/kg για ζωτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %)	576/2006
Φουμονισίνες	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για χοίρους, άλογα (Equidae), κουνέλια και ζώα συντροφιάς	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	5 (Καθοδηγητική τιμή σε mg/kg για ζωτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %)	576/2006
Φουμονισίνες	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για ιχθύες	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	10 (Καθοδηγητική τιμή σε mg/kg για ζωτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %)	576/2006
Φουμονισίνες	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για πουλερικά, μόσχους (< 4 μηνών) και αμνοερίφια	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	20 (Καθοδηγητική τιμή σε mg/kg για ζωτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %)	576/2006

Ομάδα Μυκοτοξίνων	Τρόφιμα	Μυκοτοξίνες	Μέγιστα επιτρεπτά επίπεδα (µg/kg)	ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΙ (ΕΚ)
Φουμονισίνες	Συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές για ενήλικα μηρυκαστικά (> 4 μηνών) και ικτίδες (βιζόν)	Άθροισμα των φουμονισινών B1 και B2	50 (Καθοδηγητική τιμή σε mg/kg για ζωοτροφή με ποσοστό υγρασίας 12 %)	576/2006