



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Ανάπτυξη μεθοδολογίας προσδιορισμού φυτοφαρμάκων με οπτικό
συμβολομετρικό ανοσοαισθητήρα ολοκληρωμένο σε ψηφίδες πυριτίου**

**Ελευθερία Σταύρα
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

Οκτώβριος 2019



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS

SCHOOL OF SCIENCE

DEPARTMENT OF CHEMISTRY

DOCTORAL DISSERTATION

**Determination of pesticides with an optical interferometric
immunosensor integrated on silicon chips**

**Eleftheria Stavra
CHEMIST**

ATHENS

OCTOBER 2019

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη μεθοδολογίας προσδιορισμού φυτοφαρμάκων με οπτικό συμβολομετρικό ανοσοαισθητήρα ολοκληρωμένο σε ψηφίδες πυριτίου

Ελευθερία Σταύρα

A.M.: 14008

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗΣ:

Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.

Σωτήριος Κακαμπάκος, Ερευνητής Α', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Παναγιώτα Πέτρου, Ερευνήτρια Α', Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

**Αναστάσιος Οικονόμου, Καθηγητής,
Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.**

**Σωτήριος Κακαμπάκος, Ερευνητής Α',
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»**

**Παναγιώτα Πέτρου, Ερευνήτρια Α',
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»**

**Χρήστος Κόκκινος, Επίκουρος Καθηγητής,
Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α**

**Ευάγγελος Μπακέας, Αναπληρωτής Καθηγητής,
Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α.**

**Μαργαρίτα Χατζηχρηστίδη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια,
Τμήμα Χημείας, Ε.Κ.Π.Α**

**Ιωάννης Ράπτης, Ερευνητής Α',
Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»**

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 10/10/2019

Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλοί αποδοχή των γνώμων του συγγραφέα (Ν. 5343/1932, άρθρο 202).

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση φυτοφαρμάκων είναι εξαιρετικά διαδεδομένη στη σύγχρονη γεωργική πρακτική. Παρά ταύτα πολλά φυτοφάρμακα είναι ενώσεις με τοξική δράση τόσο για τα ζώα όσο και για τον άνθρωπο και για αυτό τον λόγο πολλά εξ' αυτών έχουν απαγορευτεί εντός της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Για το λόγο αυτό η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει σαφή όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων τόσο στο νερό όσο και στα τρόφιμα. Το ανώτατο όριο καταλοίπου (Maximum Residue Level, MRL) για έκαστη ουσία στο νερό είναι 0.1 ng/mL, ενώ για το σύνολο των ουσιών είναι 0.5 ng/mL. Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό δύο απαγορευμένων φυτοφαρμάκων του paraquat και του atrazine καθώς και μεμονωμένα του glyphosate, το οποίο είναι ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα, σε δείγματα πόσιμου νερού χρησιμοποιώντας οπτικό ανοσοαισθητήρα ο οποίος βασίζεται στη φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός (White Light Reflectance Spectroscopy, WLRS). Ο αισθητήρας επιτρέπει την καταγραφή του αναλυτικού σήματος σε πραγματικό χρόνο, χωρίς τη χρήση ιχνηθετών, παρακολουθώντας τη μετατόπιση του φάσματος συμβολής που δημιουργείται κατά την ανάκλαση λευκού φωτός από επιφάνεια Si/SiO₂ πάνω στην οποία πραγματοποιείται η εκάστοτε ανοσοαντίδραση. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν ενζυμοανοσοχημικοί προσδιορισμοί (ELISA) για κάθε αναλύτη καθώς και μέθοδοι ανίχνευσης μεμονωμένων αναλυτών με τον αισθητήρα. Η μέθοδος του ταυτόχρονου προσδιορισμού των δύο απαγορευμένων φυτοφαρμάκων ήταν ταχεία (12 min), δεν περιελάμβανε καμία κατεργασία του δείγματος προ της ανάλυσης και τα όρια ανίχνευσης αναλύτες ήταν 50 pg/mL και 40 pg/mL για το atrazine και το paraquat, αντίστοιχα. Όσον αφορά στη μέθοδο ανίχνευσης του glyphosate αυτή πραγματοποιήθηκε εντός 25 λεπτών με όριο ανίχνευσης (10 pg/mL) δέκα φορές χαμηλότερο από το MRL. Ο αισθητήρας αξιολογήθηκε με την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων πόσιμου νερού και νερού βρύσης και διαπιστώθηκε ότι οι τιμές που ελήφθησαν ήταν σε καλή συμφωνία με αυτές που ελήφθησαν από τις μεθόδους ELISA που αναπτύχθηκαν. Η χαμηλού κόστους και φορητή οπτική διάταξη παράλληλα με το μικρό μέγεθος καθιστούν το προτεινόμενο σύστημα κατάλληλο για επιτόπιες αναλύσεις φυτοφαρμάκων.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων με ανοσοαισθητήρες

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: οπτικοί ανοσοαισθητήρες, υπολείμματα φυτοφαρμάκων, πόσιμο νερό, ενζυμοανοσοχημικοί προσδιορισμοί

ABSTRACT

The widespread usage of pesticides in modern agricultural practice is due to their beneficial effects in controlling pests and plant disease vectors. Nevertheless, many substances have been found to exhibit toxic effects both on animals and humans and for that reason European Union under the framework of sustainable use of pesticides has established maximum residue levels (MRL) for pesticides in water as well as in food and animal feed. The MRL for each pesticide in water is 0.1 ng/mL while for the sum of all substances is 0.5 ng/mL. The purpose of this thesis was to develop an optical label-free immunosensor for the real-time and simultaneous determination of two banned herbicides, namely paraquat and atrazine as well as for the fast and sensitive determination of glyphosate all in drinking water. The immunosensor was based in the White Light Reflectance Spectroscopy and allows for real-time and label-free monitoring of immunoreactions by monitoring the shift in the interference spectrum created upon reflection of white light on a Si/SiO₂ surface, functionalized with recognition biomolecules, in the course of the binding reaction. In order to accomplish this goal, enzyme immunoassays were firstly developed and optimized for each analyte separately and then the respective methods were developed and optimized in the immunosensor for each analyte separately. The simultaneous determination of the two banned pesticides was fast (12 min), without any sample pretreatment prior to the analysis and with Limits of Detection 50 pg/mL and 40 pg/mL for atrazine and paraquat, respectively. Concerning the determination of glyphosate, it was completed within 25 min with LOD 10 pg/mL, which is 10 times lower than the corresponding MRL in drinking water. The immunosensor's ability for determination of targeted analytes in real samples was evaluated by analyzing fortified drinking and tap water samples. It was found that the results received with the immunosensor were in good agreement with those obtained by the respective ELISA methods. Taking into consideration the low cost of the optical setup and the small and portable instrumentation, we expect that the developed immunosensor can find wide application in the on-site detection of pesticides.

SUBJECT AREA: Pesticide Residue Analysis by Immunosensor

KEYWORDS: optical immunosensors, pesticide residues, drinking water, enzyme immunoassays

**«Πάντες ἄνθρωποι φύσει ὀρέγονται τοῦ εἰδέναι»,
Αριστοτέλης, 384-322 π.Χ.**

**«Μὴ πάντα ἐπίστασθαι προθύμεο, μὴ πάντων ἀμαθῆς γένη»,
Δημόκριτος, 470-370 π.Χ.**

**«Ἄρχὴ σοφίας ὀνομάτων ἐπίσκεψις»,
Αντισθένης, 445-360 π.Χ.**

Στους γονεῖς μου, Ρένα και Νίκο

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε κατά τα έτη 2014-2019 στο Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων – Ανοσοαισθητήρων του Ινστιτούτου Πυρηνικών & Ραδιολογικών Επιστημών & Τεχνολογίας, Ενέργειας & Ασφάλειας (Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α.) του Εθνικού Κέντρου Φυσικών Επιστημών «Δημόκριτος» υπό την επίβλεψη του Ερευνητή Α' Δρ. Σωτήριου Κακαμπάκου και της Ερευνήτριας Α' Δρ. Παναγιώτας Πέτρου σε συνεργασία με το Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας Δρ. Αναστάσιου Οικονόμου.

Θα ήθελα πρωτίστως να ευχαριστήσω το Εθνικό Κέντρο Έρευνας Φυσικών Επιστημών “Δημόκριτος” για την παροχή της εργαστηριακής υποδομής για την εκπόνηση της παρούσας εργασίας καθώς και τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας για την κατά μέρους χρηματοδότηση της διδακτορικής μου διατριβής μέσω των προγραμμάτων AURORA (EPAN II, No SYN11_5_1517) και ΚΡΗΠΙΣ (MIS 5002559).

Τις θερμές ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στον ακαδημαϊκό μου επιβλέποντα Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας Δρ. Αναστάσιο Οικονόμου, ο οποίος πριν τέσσερα χρόνια ως μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής του μεταπτυχιακού μου διπλώματος με προέτρεψε να συνεχίσω σε διδακτορικές σπουδές και με συνέστησε στο εργαστήριο όπου εκπονήθηκε η παρούσα διατριβή. Η ηθική και υλική υποστήριξη καθώς και η επιστημονική του καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια των διδακτορικών μου σπουδών με βοήθησαν σημαντικά και για αυτό τον ευχαριστώ θερμά.

Από καρδιάς θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη και τις θερμότερες ευχαριστίες μου στο Διευθυντή του Εργαστηρίου Ανοσοαναλύσεων – Ανοσοαισθητήρων Ερευνητή Α' Δρ. Σωτήριο Κακαμπάκο και στην Ερευνήτρια Α' Δρ. Παναγιώτα Πέτρου πρωτίστως για την αποδοχή τους ως μέλος της επιστημονικής ομάδας του εργαστηρίου και την ανάθεση του θέματος της διδακτορικής μου διατριβής. Κυρίως όμως θέλω να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου για το αμείωτο ενδιαφέρον, τις εύστοχες παρατηρήσεις, τη στοχευόμενη καθοδήγηση και τη de facto υποστήριξη των διαφόρων εγχειρημάτων μου σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Η γενναιοδωρία με την οποία μου προσέφεραν τις επιστημονικές τους γνώσεις, αφενός μεν αποτελεί παράδειγμα, αφετέρου δε συνέβαλλε καίρια στην προσωπική επιστημονική μου εξέλιξη και για αυτό θα είμαι πάντα ευγνώμων.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στους Ερευνητές Α' του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», Δρα. Ι. Ράπτη για την κατασκευή του οπτικοηλεκτρονικού μέρους του αισθητήρα, για το ενδιαφέρον του για την πορεία της ερευνητικής μου δραστηριότητας και τη συμμετοχή του ως μέλος της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής, όπως επίσης και

στο Δρα Κ. Μισιακό για τη συμβολή του στην κατασκευή του αισθητήρα, τις συμβουλές του και τις ευκαιρίες για φιλοσοφική ενδοσκόπηση. Θα ήθελα ακόμη να ευχαριστήσω την εταιρεία “Thetametrisis” και τους Δρες Δ. Γουστουρίδη και Δ. Δρυγιαννάκη για την ανάπτυξη του αισθητήρα και του λογισμικού του.

Επίσης τις θερμές μου ευχαριστίες απευθύνω προς τα υπόλοιπα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής τους Αναπληρωτές Καθηγητές του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ Δρ. Μαργαρίτα Χατζηρησιτίδη & Δρ. Ευάγγελο Μπακέα και τον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημείας ΕΚΠΑ Δρ. Χρήστο Κόκκινο για την πρόθυμη συμμετοχή τους, τον χρόνο που αφιέρωσαν για την αξιολόγηση της εργασίας και τις χρήσιμες παρατηρήσεις τους.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στους Ερευνητές Α' Δρ. Μηνά Παπαδόπουλο και Δρ. Ιωάννη Πιρμετή καθώς και τον μεταδιδακτορικό ερευνητή Χρήστο Κυρίτση από το Εργαστήριο Ραδιοφαρμακευτικής Χημείας του Ινστιτούτου Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α. του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε «Δημόκριτος» για την παροχή υλικοτεχνικής υποδομής και τη συμβολή τους στην πραγματοποίηση μέρους των πειραμάτων μου.

Τις πιο θερμές ευχαριστίες μου θα ήθελα να απευθύνω στο μεταδιδακτορικό ερευνητή Δρ. Γεώργιο Κουκουβίνο για την καθοριστική συμβολή του στην εκπαίδευσή μου στο εργαστήριο και ιδιαίτερα στον οπτικό αισθητήρα, καθώς επίσης και για τη συνεχή του στήριξη, το ενδιαφέρον και τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της διδακτορικής μου διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου και συγκεκριμένα τους υποψήφιους διδάκτορες Δήμητρα Τσουνίδα, Βασίλη Αναστασιάδη, Νατάσα Κανιούρα, τη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μικαέλα Αγγελοπούλου, τις Δρες Πάγκαλη Βαρβάρα και Αιμιλία Ψαρούλη, τη Ζωή Τσιάλλα και τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μαρία Αντωνίου, Σοφία Μπανού, Δημήτρη Λιβά και Δήμητρα Κούρη γιατί όλοι ξεχωριστά έκαναν με την παρουσία τους την καθημερινότητα πιο ενδιαφέρουσα, για τις ιδιαίτερες στιγμές γέλιου που θα μου μείνουν αξέχαστες και για την ποικιλότητα στήριξή τους.

Προς τους γονείς μου Νίκο και Ρένα, οι λέξεις δεν φτάνουν για να εκφράσω τη βαθύτερη αγάπη και ευγνωμοσύνη μου που μου συμπαραστέκονται τόσο ηθικά όσο και υλικά όλα τα χρόνια των σπουδών μου, που είναι δίπλα μου σε κάθε μου προσπάθεια και πάντα μου δίνουν, αμφότεροι, τις πιο εύστοχες συμβουλές επί παντός επιστητού. Τέλος στο σύντροφο μου Θάνο, θέλω να πω από καρδιάς ευχαριστώ για την ακούσια και εκούσια παρακίνηση να προχωρώ μπροστά σε προσωπικό και επιστημονικό επίπεδο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	1
ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ	1
1.1 Εισαγωγή	1
1.1.1 Φυτοπροστασία – Ιστορικά στοιχεία	1
1.1.2 Τα φυτοφάρμακα σήμερα-Στατιστικά στοιχεία.....	4
1.2 Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα	5
1.2.1 Κατηγοριοποίηση και Ιδιότητες Φυτοφαρμάκων.....	5
1.2.2 Η περίπτωση των ζιζανιοκτόνων	9
1.2.3 Πρόσληψη των φυτοφαρμάκων από τα φυτά, μηχανισμός δράσης.....	15
1.2.4 Μεταβολισμός και Περιβαλλοντική τύχη φυτοφαρμάκων	19
1.2.5 Επιπτώσεις φυτοφαρμάκων στον άνθρωπο & στο περιβάλλον.....	23
1.3 Νομοθεσία-Υπολείμματα φυτοφαρμάκων-Ποιότητα πόσιμου νερού	26
1.4 Παρουσία φυτοφαρμάκων σε επιφανειακό & πόσιμο νερό στην Ελλάδα και διεθνώς	29
2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	31
ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ	31
2.1 Εισαγωγή	31
2.2 Κλασσικές αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού φυτοφαρμάκων	32
2.2.1 Χρωματογραφικές αναλυτικές μέθοδοι	32
2.2.2 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι.....	37
2.2.3 Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί	39
2.3 Βιοαισθητήρες	46
2.3.1 Ταξινόμηση & αναλυτικά χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων.....	48
2.3.2 Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες.....	49
2.3.3 Πιεζοηλεκτρικοί ή Ακουστικοί Βιοαισθητήρες.....	53
2.3.4 Θερμικοί Βιοαισθητήρες.....	55
2.3.5 Οπτικοί βιοαισθητήρες.....	57

2.4	Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός	65
3	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	73
	ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	73
4	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	76
	ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ	76
4.1	Παρασκευή παραγώγων του paraquat	76
4.1.1	Αρχή Μεθόδου	76
4.1.2	Υλικά-Όργανα.....	77
4.1.3	Πορεία Εργασίας.....	78
4.2	Παρασκευή πρωτεϊνικών συζευγμάτων για τα paraquat & glyphosate	79
4.2.1	Αρχή Μεθόδου	79
4.2.2	Υλικά – Όργανα.....	80
4.2.3	Πορεία Εργασίας.....	81
4.3	Τροποποίηση αντισωμάτων με βιοτίνη (βιοτινυλίωση)	85
4.3.1	Αρχή μεθόδου	85
4.3.2	Υλικά – Όργανα.....	86
4.3.3	Πορεία Εργασίας.....	87
4.4	Ενζυμοανοδοχημικές μέθοδοι ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων.....	87
4.4.1	Αρχή Μεθόδου	87
4.4.2	Υλικά – Όργανα.....	89
4.4.3	Πορεία Εργασίας μεθόδων ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού για τα ζιζανιοκτόνα paraquat, atrazine και glyphosate σε φρεάτια μικροπιλοδότησης	90
4.5	Υδροφιλοποίηση αισθητήριας επιφάνειας	93
4.5.1	Αρχή Μεθόδου	93
4.5.2	Υλικά – Όργανα.....	93
4.5.3	Πορεία Εργασίας.....	93
4.6	Χημική τροποποίηση αισθητήριας επιφάνειας.....	94
4.6.1	Αρχή Μεθόδου	94
4.6.2	Υλικά – Όργανα.....	94

4.6.3	Πορεία Εργασίας.....	94
4.7	Μέθοδος εναπόθεσης πρωτεϊνικών συζευγμάτων φυτοφαρμάκων στην αισθητήρια επιφάνεια	96
4.7.1	Αρχή Μεθόδου	96
4.7.2	Υλικά - Όργανα	97
4.7.3	Πορεία Εργασίας.....	97
4.8	Ανίχνευση φυτοφαρμάκων με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός	98
4.8.1	Αρχή Μεθόδου	98
4.8.2	Υλικά – Όργανα	99
4.8.3	Ανίχνευση μεμονωμένου αναλύτη	103
4.8.4	Ταυτόχρονη ανίχνευση των paraquat & atrazine	105
5	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	108
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	108
5.1	Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση ενζυμοανοδοχημικών μεθόδων προσδιορισμού των φυτοφαρμάκων paraquat, atrazine, glyphosate σε φρεάτια μικροπιλοδότησης	108
5.1.1	Επιλογή και βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών συζευγμάτων και ειδικών αντισωμάτων των τριών φυτοφαρμάκων	109
5.1.2	Βελτιστοποίηση σύστασης ρυθμιστικών διαλυμάτων ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού	118
5.1.3	Μελέτη χρονικής διάρκειας ενζυμοανοδοχημικών προσδιορισμών	123
5.1.4	Μελέτη επίδρασης της προεπώασης και βελτιστοποίηση της τροποποίησης του glyphosate.....	127
5.1.5	Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού για το φυτοφάρμακο glyphosate σε φρεάτια μικροπιλοδότησης με ανίχνευση που βασίζεται στο σύστημα βιοτίνη-στρεπταβιδίνη	134
5.1.6	Αναλυτικά χαρακτηριστικά και αξιολόγηση ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού των paraquat, atrazine & glyphosate	137
5.2	Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού του φυτοφαρμάκου glyphosate με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός	144
5.2.1	Επιλογή μεθόδου υδροφιλοποίησης των αισθητήριων επιφανειών	145
5.2.2	Επιλογή και βελτιστοποίηση συγκέντρωσης πρωτεϊνικού συζεύγματος ακινητοποίησης.....	146
5.2.3	Επιλογή και βελτιστοποίηση τρόπου ενίσχυσης σήματος.....	148
5.2.4	Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ειδικού αντισώματος έναντι του glyphosate	150

5.2.5	Μελέτη χρονικής διάρκειας ανοσοχημικού προσδιορισμού	152
5.2.6	Βελτιστοποίηση της ταχύτητας ροής.....	154
5.2.7	Μελέτη της ικανότητας αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας και σταθερότητας κατά την φύλαξη.....	156
5.3	Αναλυτικά χαρακτηριστικά και αξιολόγηση μεθόδου προσδιορισμού του φυτοφαρμάκου glyphosate με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός	160
5.3.1	Καμπύλη βαθμονόμησης και αναλυτικά χαρακτηριστικά	160
5.3.2	Αξιολόγηση ακρίβειας ανοσοπροσδιορισμού	162
5.4	Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση ταυτόχρονου προσδιορισμού των φυτοπροστατευτικών προϊόντων paraquat, atrazine με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός	163
5.4.1	Επιλογή και βελτιστοποίηση συγκέντρωσης πρωτεϊνικού συζεύγματος ακινητοποίησης	164
5.4.2	Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ειδικών αντισωμάτων έναντι των paraquat και atrazine και των αντίστοιχων 2 ^{wv} αντισωμάτων	168
5.4.3	Μελέτη χρονικής διάρκειας ανοσοχημικού προσδιορισμού	170
5.4.4	Μελέτη της ικανότητας αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας και σταθερότητας κατά την φύλαξη.....	172
5.5	Αξιολόγηση μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού paraquat & atrazine με τον οπτικό αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.....	176
5.5.1	Καμπύλες βαθμονόμησης και αναλυτικά χαρακτηριστικά.....	176
5.5.2	Αξιολόγηση ειδικότητας μεθόδου	178
5.5.3	Αξιολόγηση ακρίβειας ταυτόχρονου ανοσοπροσδιορισμού atrazine/paraquat.....	180
6	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6	183
	ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	183
	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	197
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	198
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	200
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι.....	218

Κατάλογος Σχημάτων

- Σχήμα 1: Καμπύλες εκτόπισης που ελήφθησαν για καθένα από τα τρία πρωτεϊνικά συζεύγματα BSA-gly_1 (■), BSA-gly_2 (●) και Ova-gly_3 (▲) χρησιμοποιώντας 1 μg/mL για ακινητοποίηση στα φρεάτια σε συνδυασμό με συγκέντρωση ειδικού αντισώματος 5 μg/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.112
- Σχήμα 2: (A) Τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος έναντι του glyphosate. (B) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (■) και διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 1 ng/mL (●) για συγκέντρωση ειδικού αντισώματος 10 μg/mL συναρτήσει της συγκέντρωσης του συζεύγματος BSA-gly_2 στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.113
- Σχήμα 3: (A) Τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσει της αραίωσης του ειδικού έναντι του paraquat αντισώματος. (B) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (■) και για το πρότυπο διάλυμα paraquat συγκεντρώσεως 1ng/mL (●) για αραίωση ειδικού αντισώματος 1/ 30000 συναρτήσει της συγκέντρωσης του συζεύγματος PQ-VAL-BSA στο διάλυμα ακινητοποίησης. (Γ) Καμπύλες εκτόπισης για τα τρία διαφορετικά πρωτεϊνικά συζεύγματα του paraquat PQ-VAL-BSA (□), PQ-CN-BSA _1 (○), PQ-CN-BSA _2 (△). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.115
- Σχήμα 4: (A) Τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του ειδικού έναντι του atrazine αντισώματος. (B) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (■) και πρότυπο διάλυμα atrazine συγκέντρωσης 1ng/mL (●) για συγκέντρωση ειδικού αντισώματος 500 ng/mL συναρτήσει της συγκέντρωσης του συζεύγματος BSA-

atrazine στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 117

Σχήμα 5: (Α) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα glyphosate συγκέντρωσης 0, 2.5, 5 και 10 ng/mL όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4 (■), φωσφορικών pH 6 (◆), Tris/HCl 50 mM, pH 8.9 (▲), Tris/HCl 50 mM, pH 7.4 (▲), HEPES 50 mM, pH 7.4 (◀), MES 50 mM, pH 6 (▶) που περιείχαν 0.2% (w/v) BSA, 0.9% (w/v) NaCl, 0.05% (w/v) bIgG. (Β & Γ) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα paraquat συγκέντρωσης 0, 0.1, 0.5, 1 και πρότυπα διαλύματα atrazine 0, 0.05, 1, 2.5 ng/mL, αντίστοιχα, όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4 (■) ή TRIS/HCl 50 mM pH 7.4 (●), που περιέχουν 0.2% (w/v) BSA, 0.9% (w/v) NaCl. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 119

Σχήμα 6: Τιμές απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες), για πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 5 ng/mL (μωβ στήλες) glyphosate καθώς και το σήμα μη ειδικής δέσμευσης (ροζ στήλες) όταν για τον αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Na₂CO₃ 0.1 M, pH 8.5, που περιέχει BSA 1% (w/v) 0.5% (w/v) ζελατίνη. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 121

Σχήμα 7: (Α) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα atrazine μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) και οι αντίστοιχες τιμές μη ειδικής δέσμευσης (μωβ στήλες) και (Β) καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με διάλυμα χωρίς Tween 20 σε όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού (I) ή έκπλυση με διάλυμα που περιείχε 0.05% (v/v) Tween 20 σε όλα τα στάδια μετά την ακινητοποίηση του συζεύγματος BSA-atrazine (II), σε όλα τα στάδια μετά τον αποκλεισμό των ελεύθερων θέσεων (III), σε όλα τα στάδια μετά την ανοσοαντίδραση (IV) και τέλος στο στάδιο μετά την επώαση με το διάλυμα του δευτέρου αντισώματος (V). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD. 122

Σχήμα 8: Επίδραση της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στις τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπα διαλύματα μηδενικής συγκέντρωσης paraquat (■), atrazine (●) και glyphosate (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.	125
Σχήμα 9: Επί τοις εκατό ποσοστά που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα (A) paraquat, (B) atrazine και (Γ) glyphosate ως προς το σήμα του αντίστοιχου μηδενικού προτύπου για διάρκεια ανοσοαντίδρασης 15 min, 30 min & 60 min.	126
Σχήμα 10: Τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπα διαλύματα μηδενικής συγκέντρωσης του paraquat (■), atrazine (●) και glyphosate (▲) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του αντίστοιχου δευτέρου αντισώματος με τα ακινητοποιημένα στα φρεάτια ειδικά αντισώματα έναντι κάθε αναλύτη. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.	127
Σχήμα 11: Καμπύλες βαθμονόμησης atrazine (A), paraquat (B) και glyphosate (Γ) που ελήφθησαν χωρίς προεπώαση των προτύπων διαλυμάτων με το διάλυμα του αντίστοιχου ειδικού αντισώματος (□), ή με προεπώαση 30 min (○) ή 60 min (△). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.	129
Σχήμα 12: (A) Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού (●) και του ηλεκτρικού (■) ανυδρίτη στο σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης. (B) Καμπύλες βαθμονόμησης glyphosate που ελήφθησαν με πρότυπα διαλύματα τα οποία είχαν παραγωγοποιηθεί με μηλεϊνικό (●) ή ηλεκτρικό ανυδρίτη (■) σε τελική συγκέντρωση ανυδρίτη 20 mM καθώς και με πρότυπα διαλύματα χωρίς παραγωγοποίηση με ανυδρίτη (▲). (Γ) Επίδραση τριών διαφορετικών τελικών συγκεντρώσεων ηλεκτρικού ανυδρίτη (10 mM, 20mM, 50 mM) στην που λαμβάνεται για πρότυπα διαλύματα glyphosate συγκέντρωσης 0.5, 5 & 25 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.	131
Σχήμα 13: Επίδραση στην καμπύλη βαθμονόμησης της αναλογίας όγκων προτύπου διαλύματος glyphosate προς το διάλυμα του ειδικού αντισώματος	

- στο τελικό μίγμα της ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD. 133
- Σχήμα 14: Καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν είτε με επισημασμένο με HRP 2^ο αντίσωμα (■), είτε με βιοτινυλιωμένο 2^ο αντίσωμα σε συνδυασμό με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με HRP (●). Και στις δύο περιπτώσεις η συγκέντρωση του συζεύγματος BSA-Gly_2 είναι 2 μ g/mL και του ειδικού κατά του glyphosate αντισώματος 2 μ g/mL. Το επισημασμένο με HRP 2^ο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:1000 ενώ το βιοτινυλιωμένο 2^ο αντίσωμα σε συγκέντρωση 5 μ g/mL και η στρεπταβιδίνη-HRP σε συγκέντρωση 500 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD. 135
- Σχήμα 15: Τιμές οπτικής απορρόφησης για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης και διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 2 ng/mL συναρτήσεως της συγκέντρωσης του ειδικού έναντι του glyphosate αντισώματος για συγκέντρωση συζεύγματος BSA-gly_2 2 μ g/mL, βιοτινυλιωμένου 2^{ου} αντισώματος 5 μ g/mL και στρεπταβιδίνης-HRP 500 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD. 136
- Σχήμα 16: Καμπύλες βαθμονόμησης για τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό του (Α) atrazine, (Β) paraquat και (Γ) glyphosate σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης. Οι διάστικτες πράσινες γραμμές ανταποκρίνονται σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD. 138
- Σχήμα 17: Καμπύλες βαθμονόμησης των (Α) atrazine, (Β) paraquat και (Γ) glyphosate καθώς και των ουσιών που εξετάστηκαν ως προς τη διασταυρούμενη δραστηριότητα. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν την συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστό εκτόπισης 50% (IC₅₀) στην καμπύλη βαθμονόμησης του εκάστοτε αναλύτη. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD. 140
- Σχήμα 18: Καμπύλες βαθμονόμησης που λαμβάνονται με πρότυπα διαλύματα τα οποία έχουν παρασκευαστεί σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης (■), εμφιαλωμένο νερό (●) και σε νερό δικτύου (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD. 143

Σχήμα 19: Αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης από επιφάνειες οι οποίες είχαν υδροφιλοποιηθεί με κατεργασία σε 1) διάλυμα Piranha (γκρι γραμμή) ή 2) πλάσμα O ₂ (μωβ γραμμή). Οι επιφάνειες είχαν επικαλυφθεί με 50 μg/mL συζεύγματος BSA-gly και για τον ανοσοπροσδιορισμό διαβιβάστηκε διάλυμα ειδικού αντισώματος συγκέντρωσης 50 μg/mL για 15 min και 2 ^{ου} αντισώματος συγκέντρωσης 1 μg/mL για 10 min.....	145
Σχήμα 20: (A) Σήματα για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης που ελήφθησαν από επιφάνεια τροποποιημένη με 200 μg/mL Ova-gly_2 μετά από έξι διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης εντός της ίδιας ημέρας. (B) Σήματα για πρότυπο διάλυμα διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) και διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 2 ng/mL (πορτοκαλί στήλες) που ελήφθησαν για συγκεντρώσεις πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA_gly_2 10, 25, 50 & 100 μg/mL . Ο χρόνος ανοσοαντίδρασης ήταν 15 min και η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος 50 μg/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.....	147
Σχήμα 21 : Αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης με επιφάνεια στην οποία είχαν ακινητοποιηθεί 50 μg/mL πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA-gly_2 και η ενίσχυση σήματος πραγματοποιήθηκε με χρήση (A) 2 ^{ου} αντισώματος κουνελιού κατά των γ-σφαιρινών όρνιθας, (B) βιοτινυλιωμένου ειδικού έναντι του glyphosate αντισώματος και στρεπταβιδίνης, (Γ) βιοτινυλιωμένου 2 ^{ου} αντισώματος κουνελιού κατά των γ-σφαιρινών όρνιθας και στρεπταβιδίνης. Και στις τρεις περιπτώσεις η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος ήταν 25 μg/mL.	149
Σχήμα 22: Σήματα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (μπλε στήλες) και προτύπων διαλυμάτων glyphosate συγκέντρωσης 0.02 ng/mL (ροζ στήλες) & 1.6 ng/mL (πράσινες στήλες) για συγκεντρώσεις ειδικού αντισώματος, 5, 12.5, 25 και 50 μg/mL. Σε όλες τις περιπτώσεις ο χρόνος ανοσοαντίδρασης ήταν 15 min, η συγκέντρωση του συζεύγματος BSA-gly 50 μg/mL και το 2 ^ο αντίσωμα διαβιβάστηκε για 10 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.	151

Σχήμα 23: Αποκρίσεις που ελήφθησαν με το αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (μωβ στήλες) και διάλυμα glyphosate 5 ng/mL (πορτοκαλί στήλες) για χρόνους ανοσοαντίδρασης, 5, 15, 30, 60 λεπτά. Η συγκέντρωση του συζεύγματος BSA-gly ήταν 50 μg/mL, του ειδικού αντισώματος 50 μg/mL ενώ ο χρόνος διέλευσης του 2^{ου} αντισώματος ήταν 10 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD. 152

Σχήμα 24: Σήματα που ελήφθησαν με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός για πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσεως του χρόνου διαβίβασης διαλύματος 2^{ου} αντισώματος συγκέντρωσης 1 μg/mL, υπό σταθερή ροή 30 μL/min. Η συγκέντρωση του συζεύγματος BSA-gly και του ειδικού έναντι του glyphosate αντισώματος ήταν 50 μg/mL και η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης 15 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD. 153

Σχήμα 25: Επίδραση της ταχύτητας ροής διέλευσης των αντιδραστηρίων κατά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (μωβ στήλες) καθώς και στο σήμα διαλύματος glyphosate συγκέντρωσης 5 ng/mL (πορτοκαλί στήλες). Τα σήματα αυτά προέρχονται από αισθητήρια επιφάνεια στην οποία είχαν ακινητοποιηθεί 25 μg/mL συζεύγματος BSA-gly, η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος ήταν 12.5 μg/mL, η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης 30 min και το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος διαβιβάστηκε για 10 min με ταχύτητα ροής 30 μL/min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD. 155

Σχήμα 26: A) Επί τοις εκατό ποσοστιαίο υπόλειμμα δεσμευμένων αντισωμάτων ως προς το σήμα προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης μετά από διαβίβαση για 2 min διαλύματος HCl 50 mM (I), HCl 100 mM (II), NaOH 100 mM (III), 0,5% (w/v) SDS, pH 1,9 (IV) και εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας (V). B) Αποκρίσεις που ελήφθησαν από αισθητήρια επιφάνεια για πρότυπο διάλυμα διαλύματος glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης (●) σε διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης με διάλυμα HCl 50 mM. Η συνεχής πορτοκαλί

γραμμή αντιστοιχεί στην μέση τιμή των 17 μετρήσεων και οι διακεκομμένες μαύρες γραμμές στην μέση τιμή $\pm 2SD$	157
Σχήμα 27: Αποκρίσεις που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης από μια επιφάνεια τροποποιημένη με 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA-gly σε διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 15 ημερών. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm SD$	159
Σχήμα 28: Καμπύλη βαθμονόμησης (πορτοκαλί γραμμή) για τον προσδιορισμό του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. Οι διάστικτες πράσινες γραμμές αντιστοιχούν σε επίπεδο εμπιστοσύνης 90%. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων $\pm SD$	160
Σχήμα 29: (Α) Αποκρίσεις που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσε της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού συζεύγματος PQ-VAL-BSA (κόκκινες γραμμές) και PQ-CN-BSA (μπλε γραμμές) μετά από διαβίβαση για 10 min διαλύματος anti-PQ Ab συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\square), 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\circ) και 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (\triangle). (Β) Επί τοις εκατό ποσοστά ως προς το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) τα οποία αντιστοιχούν σε διαλύματα paraquat συγκέντρωσης 0.1 (στήλες μ κόκκινη διαγράμμιση) και 1 ng/mL (στήλες με μπλε διαγράμμιση) που ελήφθησαν από αισθητήριες επιφάνειες επικαλυμμένες με 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PQ-VAL-BSA ή 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PQ-CN- BSA. Και στις δύο περιπτώσεις διαβιβάστηκε για 10 min διάλυμα ειδικού αντισώματος συγκέντρωσης 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και ακολουθούμενο από διαβίβαση για 5 min διαλύματος 2 ^{ου} αντισώματος 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών μετρήσεων $\pm SD$	165
Σχήμα 30: Αποκρίσεις που ελήφθησαν για πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσε της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά του atrazine για συγκέντρωση πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA-atrazine 10 (μαύρη γραμμή), 25 (κόκκινη γραμμή), 50 (μπλε γραμμή) και 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (πράσινη γραμμή). Το διάλυμα του αντισώματος διαβιβάστηκε για 10 min διαλύματος και ακολούθησε	

διαβίβαση για 5 min 2^{0u} αντισώματος συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών μετρήσεων \pm SD..... 167

Σχήμα 31: Επί τοις εκατό ποσοστό εκτόπισης (A) πρότυπου διαλύματος 0.25 ng/mL paraquat (κόκκινες μπάρες) και (B) πρότυπου διαλύματος 0.25 ng/mL atrazine (κόκκινες μπάρες) ως προς πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (μπλε μπάρες) που ελήφθησαν από αισθητήριες επιφάνειες βιολογικά τροποποιημένες με 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PQ-VAL-BSA ή 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ATR-BSA συναρτήσει της συγκέντρωσης του εκάστοτε ειδικού αντισώματος. Σε όλες τις περιπτώσεις το ειδικό αντίσωμα διαβιβάστηκε για 10 min και ακολούθησε ενίσχυση σήματος με διαβίβαση για 5 min είτε διαλύματος anti-rabbit IgG είτε anti-mouse IgG και τα δύο συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD..... 169

Σχήμα 32: Επίδραση του χρόνου αντίδρασης με τα ειδικά αντισώματα mouse anti-PQ (A) και rabbit anti-atrazine (B) στο σήμα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (\square) καθώς και του αντίστοιχου προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 1 ng/mL του αντίστοιχου φυτοφαρμάκου (\circ). Ο χρόνος διαβίβασης του διαλύματος των 2^{uv} αντισωμάτων ήταν 10 min. (Γ, Δ) Επίδραση του χρόνου αντίδρασης με τα 2^a αντισώματα, anti-mouse IgG (Γ) & anti-rabbit IgG (Δ) στο σήμα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης για χρόνο ανοσοαντίδρασης 7 min..... 171

Σχήμα 33: A) Επί τοις εκατό ποσοστιαίο υπόλειμμα δεσμευμένων αντισωμάτων ως προς το σήμα διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης για το atrazine (μωβ στήλες) & το paraquat (πράσινες στήλες), μετά από διαβίβαση για 2 min διαλύματος HCl 50 mM (I), HCl 100 mM (II), NaOH 100 mM (III), 0,5% (w/v) SDS, pH 1,9, (IV) και εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας (V). B) Αποκρίσεις που ελήφθησαν από αισθητήρια επιφάνεια με δύο βιοδραστικές ζώνες, PQ-VAL-BSA & ATR-BSA, για πρότυπο διάλυμα atrazine & paraquat μηδενικής συγκέντρωσης σε διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης με διάλυμα 0,5% (w/v) SDS, pH 1,9. Η συνεχής γραμμή (μωβ για το atrazine ή πράσινη για το paraquat) αντιστοιχεί στην μέση τιμή των 20 μετρήσεων και οι αντίστοιχου χρώματος διακεκομμένες γραμμές στην μέση τιμή \pm 2SD. 174

Σχήμα 34: Αποκρίσεις που ελήφθησαν για διάλυμα προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης atrazine (μωβ στήλες) και paraquat (πράσινες στήλες) από επιφάνεια τροποποιημένη με 10 μg/mL ATR-BSA και 50 μg/mL PQ-VAL-BSA για διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 15 ημερών. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.....175

Σχήμα 35: Καμπύλες βαθμονόμησης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των atrazine (πράσινη γραμμή) και paraquat (ροζ γραμμή) με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. Οι διάστικτες γραμμές αντιστοιχούν σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.....176

Σχήμα 36: Αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός από αισθητήρια επιφάνεια η οποία έφερε δύο βιοδραστικές ζώνες, μία για κάθε αναλύτη, κατά την διαβίβαση είτε (Α) μίγματος προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης που περιέχει μόνο το anti-ATR Ab (βέλη 1 - 2) και ακολούθως διαλύματος του αντίστοιχου 2^{ου} αντισώματος (βέλη 2 - 3) είτε (Β) μίγματος προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης που περιέχει μόνο το anti-PQ antibody (βέλη 1 - 2) και ακολούθως διαλύματος του αντίστοιχου 2^{ου} αντισώματος (βέλη 2 - 3). Οι μπλε γραμμές αντιστοιχούν στις αποκρίσεις από την βιοδραστική ζώνη όπου είναι ακινητοποιημένο το σύζευγμα ATR-BSA, οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν σε αποκρίσεις από την βιοδραστική ζώνη όπου είναι ακινητοποιημένο το σύζευγμα PQ-VAL-BSA και οι μαύρες στην μεταξύ των δύο ζωνών περιοχή.....179

Σχήμα 37: (Α) Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για προσδιορισμό μόνο του atrazine (μπλε γραμμή) ή ταυτόχρονο προσδιορισμό atrazine/paraquat (ροζ γραμμή) με τον οπτικό αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. (Β) Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για προσδιορισμό μόνο του paraquat (σκούρα μπλε γραμμή) ή ταυτόχρονο προσδιορισμό atrazine/paraquat (κόκκινη γραμμή) με τον οπτικό αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.180

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

- Εικόνα 1: Ποσοστά κατανομής πωλήσεων ζιζανιοκτόνων διαφορετικών χημικών τάξεων σε 17 κράτη μέλη της Ευρωπαϊκή Ένωσης για το έτος 2016 [10]. Φαινόξυ-φυτοορμόνες (■), ατραζίνες/τριαζινόνες (■), αμίδια/ανιλίδια (■), καρβαμιδικά/δικαρβαμιδικά (■), παράγωγα δινιτροανιλίνης (■), παράγωγα ουρίας/ουρακίλης/σουλφονουρίας (■), άλλα φυτοφάρμακα (■).....5
- Εικόνα 2: Τρία από τα πιο συχνά ζιζάνια στην Ελλάδα: Α) λουβουδιά (*chenopodium album*), Β) μουχρίτσα (*Echinochloa crus-galli*), Γ) αγριάδα (*Cynodon dactylon*) [14].....10
- Εικόνα 3: Α) Διάγραμμα του Z-σχήματος της αντίδρασης Hill όπου το χρώμα των ηλεκτρονίων είναι ενδεικτικό της ενέργειας τους βάση του βέλους αναφοράς ενεργειών αριστερά. Με πορτοκαλί βέλη φαίνονται σχηματικά τα σημεία στα οποία παρεμβάλλονται τα μόρια των atrazine και paraquat παρεμποδίζοντας τη ροή ηλεκτρονίων [28]. Β) Οξειδοαναγωγικός κύκλος paraquat μετά από πρόσληψη ηλεκτρονίων από το PS I και παραγωγή δραστικών ελευθέρων ριζών [όπου SOD (superoxide dismutase)υπεροξειδική δισμουτάση] [29].....17
- Εικόνα 4: Βιοσύνθεση του χλωρισμικού οξέος, του ενδιάμεσου της σύνθεσης των αρωματικών αμινοξέων σε φυτά & βακτήρια. Το βήμα 6, το οποίο καταλύεται από το ένζυμο συνθάση του 3-φωσφο-5-ενολοπυροσταφυλοσικιμικού οξέος αναστέλλεται πλήρως από το ζιζανιοκτόνο glyphosate. Αναπροσαρμογή από Principles of Biochemistry Leningher [30]18
- Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων διεργασιών που επηρεάζουν την τύχη ενός φυτοφαρμάκου στο περιβάλλον. Αναπροσαρμογή από [32, 34].22
- Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων μεθόδων QuEChERS [77].34
- Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση (Α) του φαινομένου FRET μεταξύ των τροποποιημένων με θειογλυκολικό οξύ (TGA) κβαντικών κηλίδων CdTeQDs και των τροποποιημένων με κυστεαμίνη νανοσωματιδίων χρυσού AuNPs και

(B) αναστολή του φαινομένου FRET από το glyphosate και ανάκτηση του φθορισμού των QDs [101].	38
Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της δομής μιας ανοσοσφαιρίνης. Αναπροσαρμογή από [30].	41
Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση μιας ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου πλευρικής ροής ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση του atrazine με ιχνηθέτη νανοσωματίδια χρυσού [123].	46
Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ενός βιοαισθητήρα (αναπροσαρμογή από [131]).	48
Εικόνα 11: (A) Στάδια κατασκευής ενός ακουστικού αισθητήρα με χρήση μονοκρυστάλλου QCM για την διαδοχική ανίχνευση των atrazine και carbofuran. (B) Φωτογραφία του κρυστάλλου QCM πριν και μετά την εναπόθεση των ειδικών αντισωμάτων καθώς και η αντίστοιχη φωτογραφία SEM [160].	55
Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση ενός ενζυμικού θερμίστορ συνεχούς ροής [161].	56
Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών αρχών της ανάκλασης φωτεινής δέσμης στη μεσεπιφάνεια δύο στρωμάτων διαφορετικού δείκτη διάθλασης και του φθίνοντος κύματος.	59
Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας ενός αισθητήρα SPR στον οποίο το αναλυτικό σήμα είναι η μεταβολή της γωνίας συντονισμού λόγω της αλληλεπίδρασης του αναλύτη με τα ακινητοποιημένα στην μεταλλική επιφάνεια βιομόρια αναγνώρισης [172].	61
Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση ενός συμβολόμετρου Mach-Zendher (A) και ενός συμβολόμετρου Young (B) [182].	63
Εικόνα 16: Αρχή μεθόδου τεχνικής RIFS: (1) Ο μεταλλάκτης ακτινοβολείται με την πηγή φωτός τοποθετημένη στην πίσω πλευρά του υάλινου πλακιδίου και οι ανακλώμενες δέσμες σχηματίζουν χαρακτηριστικό φάσμα συμβολής, (2) Η δέσμευση του αναλύτη στην αισθητήρια επιφάνεια προκαλεί μετατόπιση του	

φάσματος συμβολής προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, (3) η οποία παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο [190].....	64
Εικόνα 18: (Α) Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (προσαρμογή από [200]). (Β) Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας των βιοαισθητήρων φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός.....	67
Εικόνα 19: (Α) Τυπικό φάσμα ανάκλασης από επιφάνεια Si με υμένιο SiO ₂ πάχους 1000 nm SiO ₂ (μπλε γραμμή) ή Si (μαύρη γραμμή). Η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στο φάσμα υποβάθρου δηλαδή στο φάσμα που λαμβάνεται από επιφάνεια Si με κλειστή την οπτική πηγή. (Β) Φάσμα ανάκλασης το οποίο έχει ληφθεί καθώς διέρχεται διάλυμα έκπλυσης μέσα από τη μικρορευστομηχανική κυψελίδα πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) από μια βιοαντίδραση. Η ένθετη εικόνα είναι μεγέθυνση του φάσματος για την περιοχή μηκών κύματος 500-560 nm [202].	69
Εικόνα 20: Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας για την παρασκευή των δύο παραγώγων του paraquat με βρωμοβαλερικό εστέρα και κυανουρικό χλωρίδιο. Φαίνονται επίσης οι ονομασίες κατά IUPAC των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων και οι κωδικές ονομασίες των απτενίων.	77
Εικόνα 21: Τα στάδια σύζευξης paraquat αλβουμίνη ορού βοός με χρήση του αντιδραστηρίου EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride).....	82
Εικόνα 22: Στάδια σύζευξης του glyphosate με οβαλβουμίνη ορού βοός με χρήση των αντιδραστηρίων EDC & S-NHS.	84
Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης βιοτινυλίωσης του ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος όρνιθας έναντι του ζιζανιοκτόνου glyphosate.	86
Εικόνα 24: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανσοχημικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκου σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης.	89

Εικόνα 25: Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροπιλοδότησης, Victor ³ Multilabel Readers (PerkinElmer, USA).....	92
Εικόνα 26: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων υδροφιλοποίησης και χημικής τροποποίησης με 3-(αμινοπρόπυλο)-τριαιθόξυ σιλάνιο επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου. Επίσης απεικονίζεται και η υδρόλυση του αντιδραστηρίου APTES.....	95
Εικόνα 27: Συσκευή εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories Inc).Τα μέρη της συσκευής είναι: i) θάλαμος ελεγχόμενης υγρασίας, ii) ρομποτικός βραχίονας κίνησης κεφαλής, iii) αντλία διοχέτευσης αέρα και μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας του θαλάμου, iv) πλαστικές φιάλες υγρού έκπλυσης ακίδας και συλλογής αποβλήτων.	96
Εικόνα 28: Α) Βιολογικά ενεργοποιημένη αισθητήρια επιφάνεια, μικρορευστομηχανική κυψελίδα και βάση ελλιμενισμού και Β) το σύνολο αυτών μετά από κατάλληλη συναρμολόγηση με προσαρμογή των σωλήνων εισόδου και εξόδου υγρών τοποθετημένα κάτω από το σύστημα των οπτικών ινών.....	101
Εικόνα 29: Διάταξη οπτικού αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός για την ανίχνευση ενός αναλύτη (Α) και για την ταυτόχρονη ανίχνευση των αναλυτών (Β).	102
Εικόνα 30: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανοσοχημικού προσδιορισμού του ζιζανιοκτόνου glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός όπου μετά την ακινητοποίηση του πρωτεϊνικού συζεύγματος και τον αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων η αισθητήρια επιφάνεια συναρμολογείται στον οπτικό αισθητήρα και πραγματοποιούνται τα εξής: 1) εξισορρόπηση γραμμής βάσης με διαβίβαση διαλύματος ανοσοαντίδρασης πάνω από την αισθητήρια επιφάνεια, 2) ανοσοαντίδραση με διαβίβαση μίγματος, πρότυπου διαλύματος glyphosate και διαλύματος anti-glyphosate αντισώματος σε αναλογία όγκων 1:1, 3) ενίσχυση του σήματος με διαβίβαση 2 ^{ου} αντισώματος rabbit anti-IgY, 4) αναγέννηση της αισθητήριας επιφάνειας με διαβίβαση διαλύματος HCl 50 mM.....	104
Εικόνα 31: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων του ταυτόχρονου ανοσοπροσδιορισμού των ζιζανιοκτόνων paraquat και atrazine (επάνω) και	

μεταβολή του φαινόμενου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας κατά τη διάρκεια διαβίβασης μηδενικού προτύπου διαλύματος κατά τα διάφορα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού (κάτω).....	106
Εικόνα 32: Αντίδραση του glyphosate με μηλεϊνικό (maleic anhydride) ή ηλεκτρικό (succinic anhydride) ανυδρίτη.....	130

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Χημικές τάξεις φυτοφαρμάκων οι οποίες μπορούν να δράσουν ως ακαρεοκτόνα (A), μυκητοκτόνα (M), ζιζανιοκτόνα (Z) ή εντομοκτόνα (E). Η χρήση του συμβόλου ✓ αποσκοπεί στο να επισημάνει σε ποια/ποιες κατηγορίες φυτοπαρασίτων βρίσκει εφαρμογή η κάθε χημική τάξη, ενώ ο αριθμός εντός της παρένθεσης υποδηλώνει τον αριθμό των υποομάδων εντός κάθε χημική τάξης [12].	8
Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες εξεταζόμενων ζιζανιοκτόνων [23, 24].	14
Πίνακας 3: Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση των ζιζανιοκτόνων atrazine, paraquat, glyphosate.	52
Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων των τελικών πρωτοκόλλων για τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό των ζιζανιοκτόνων atrazine, paraquat & glyphosate σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης	92
Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, ταχύτητα ροής, όγκος προτύπων διαλυμάτων και συνολικός χρόνος ανάλυσης για την ανίχνευση καθενός από τα τρία φυτοφάρμακα μεμονωμένα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.	104
Πίνακας 6: Συνοπτικός πίνακας πρωτεϊνικών συζευγμάτων για τα ζιζανιοκτόνα glyphosate, paraquat μαζί με τις μοριακές αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν.	110
Πίνακας 7: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης των τριών φυτοφαρμάκων.	139
Πίνακας 8: Συντελεστές διασταυρούμενης δραστηριότητας δομικά όμοιων ουσιών με τους προσδιοριζόμενους αναλύτες atrazine, paraquat και glyphosate.	142
Πίνακας 9: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.	161
Πίνακας 10: Επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης εμβολιασμένων με glyphosate δειγμάτων νερού δικτύου και εμφιαλωμένου νερού.	163

Πίνακας 11: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ταυτόχρονου προσδιορισμού atrazine & paraquat με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.....	177
Πίνακας 12: Επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης εμβολιασμένων με atrazine & paraquat δειγμάτων νερού δικτύου και εμφιαλωμένου νερού.	181
Πίνακας 13: Σύγκριση του προτεινόμενου βιοαισθητήρα με οπτικούς βιοαισθητήρες χωρίς χρήση ιχνηθετών που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των ζιζανιοκτόνων atrazine & paraquat.	189
Πίνακας 14: Σύγκριση του προτεινόμενου βιοαισθητήρα με οπτικούς βιοαισθητήρες με ή χωρίς τη χρήση ιχνηθετών που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό του glyphosate.	192

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

1.1 Εισαγωγή

1.1.1 Φυτοπροστασία – Ιστορικά στοιχεία

Οι φυτικές καλλιέργειες και τα αγροτικά προϊόντα είναι εκτεθειμένα, τόσο στον αγρό όσο και κατά την αποθήκευση ή διακίνηση, σε ένα μεγάλο αριθμό φυτοπαρασίτων διαφόρων κατηγοριών αλλά και σε περιβαλλοντικές καταπονήσεις λόγω των ενίοτε ακραίων κλιματολογικών συνθηκών. Πολλά είναι τα γεγονότα στη νεότερη ιστορία όπου, εξαιτίας της προσβολής καλλιεργειών από παράσιτα, υπήρξαν σοβαρές συνέπειες τόσο οικονομικές όσο και κοινωνικές. Το 1845-1846 ο μεγάλος λοιμός στην Ιρλανδία αποδίδεται ως επί το πλείστον στην προσβολή των καλλιεργειών πατάτας από περονόσπορο, έναν μύκητα του είδους *Phytophthora infestans* [1] ενώ το 1942 παρόμοια περίπτωση υπήρξε στην Ινδία όπου επλήγησαν οι ορυζοκαλλιέργειες στην περιοχή της Βεγγάλης από τον μύκητα του γένους *Cochliobolus miyabeanus*. Αξίζει επίσης να αναφερθεί ότι στο διάστημα 1870-1879 οι φυτείες καφεόδεντρων στην Κεϋλάνη (σημερινή Σρι Λάνκα) καταστράφηκαν ολοσχερώς από σκωρίαση (*Hemileia vastatrix*) [2] γεγονός το οποίο οδήγησε στην αντικατάσταση της καλλιέργειας του καφεόδεντρου από καλλιέργεια τσαγιού. Την περίοδο εκείνη η Κεϋλάνη ήταν μέρος της ευρύτερης Βρετανικής Κοινοπολιτείας και αποτέλεσμα της καταστροφής των καφεόδεντρων ήταν η αλλαγή των συνηθειών στη Βρετανία, από το να πίνουν καφέ στο να πίνουν τσάι.

Γίνεται επομένως προφανές ότι πάντα υπήρχε η ανάγκη για την προστασία των καλλιεργούμενων φυτών και τη λήψη μέτρων για την προστασία της γεωργικής παραγωγής. Τα μέτρα αυτά μπορεί να είναι διοικητικά και να αφορούν στην προσπάθεια εξάλειψης ή περιορισμού ενός φυτοπαρασίτου μέσω π.χ. της υποχρεωτικής καταστροφής προσβεβλημένων καλλιεργειών και προϊόντων, ή καλλιεργητικά τα οποία συνδέονται με το σύνολο των γεωργικών πρακτικών π.χ. αμειψισπορά, κλάδεμα, χρήση ανθεκτικών ποικιλιών κ.ά. που

στοχεύουν στη δημιουργία δυσμενών συνθηκών για την ανάπτυξη φυτοπαράσιτων. Βέβαια, ο πιο διαδεδομένος τρόπος αντιμετώπισης, ειδικά σε περιοχές με ανεπτυγμένη γεωργία, είναι η χρήση χημικών ενώσεων οι οποίες μπορούν να θανατώσουν ή να επιβραδύνουν την ανάπτυξη όλων των κατηγοριών φυτοπαράσιτων, πλην των ιών. Τα προϊόντα που χρησιμοποιούνται για την προστασία των φυτών από τα φυτοπαράσιτα ονομάζονται φυτοπροστατευτικά προϊόντα (plant protection products) ή φυτοφάρμακα (pesticides). Ως φυτοπροστατευτικό προϊόν θεωρείται κάθε ουσία ή μίγμα ουσιών που έχει ως στόχο τον έλεγχο, την παρεμπόδιση ή την καταστροφή ενός φυτοπαράσιτου, καθώς και τη ρύθμιση της ανάπτυξης και εξέλιξης των φυτών [3].

Η χημική καταπολέμηση των φυτοπαράσιτων χρονολογείται ιστορικά πιθανώς ακόμη και πριν το 1000 π.Χ.. Στην Ομήρου Οδύσσεια (Ραψωδία Χ: 481-482) ο ήρωας αναφέρει απευθυνόμενος στην Ευρίκλεια «οἷσε θέειον, γρηῦ, κακῶν ἄκος, οἷσε δέ μοι πῦρ, ὄφρα θεειώσω μέγαρον» δηλαδή «φέρε μου θειάφι εδώ, γερόντισσα, που το κακό ξορκίζει, και φέρε και φωτιά, την κάμαρα τριγύρα να θειαφίσω» το οποίο αποδεικνύει ότι οι απολυμαντικές ιδιότητες του θείου ήταν γνωστές. Ο Δημόκριτος (~460-370 π.Χ.) συνιστούσε τον ψεκάσμο των φυτών με κατσίγαρο (υγρό ελαιουργικό απόβλητο) για την προστασία από ωίδιο, ενώ ο Θεόφραστος (370 -286 π.Χ.) στο έργο του «Περί φυτών αιτιών» συνοψίζει πολλές από τις ασθένειες των φυτών και τρόπους αντιμετώπισής τους.

Σχεδόν μέχρι και τον 18^ο αιώνα η χρήση χημικών φυτοπροστατευτικών στην Ευρώπη ακολουθούσε την παράδοση των ελληνιστικών χρόνων ενώ στα επόμενα χρόνια το ενδιαφέρον στράφηκε κυρίως σε ανόργανες ενώσεις. Παραδείγματα ανόργανων ενώσεων είναι ο βορδιγάλειος πολτός (Bordeaux mix), ένα μίγμα γαλαζόπετρας (CuSO_4) με ασβέστη (Ca(OH)_2), ο οποίος εισήχθη από τον βοτανολόγο Pierre-Marie-Alexis Millardet για την καταπολέμηση μυκητιάσεων σε αμπελοκαλλιέργειες, το πράσινο των Παρισίων ή οξικοαρσενικώδης χαλκός ένα σύμπλοκο με δομή $[\text{Cu}(\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2)_2 \cdot 3\text{Cu}(\text{AsO}_2)_2]$ αλλά και αρσενικικά άλατα του μολύβδου, βορικά άλατα, οργανικές ενώσεις του υδραργύρου όπως ο 3-χλωρο-2-υδροξυφαινυλ-υδράργυρος, ένα μυκητοκτόνο της Bayer με εμπορικό όνομα Uspulun [4], καθώς και ποικίλα άλλα ανόργανα άλατα.

Σταθμό τομή όμως στην εξέλιξη της χημικής φυτοπροστασίας αποτελούν οι δεκαετίες των 1930 – 1940 όπου ταυτόχρονα ανά τον κόσμο παρουσιάζονται τα πρώτα συνθετικά φυτοφάρμακα. Ενδεικτικά το 1934 ανακαλύπτονται οι μυκητοκτόνες ιδιότητες των διθειοκαρβαμιδικών και το 1939 ο ελβετός χημικός Paul Hermann Müller των εργαστηρίων Geigy παρατήρησε της εντομοκτόνες ιδιότητες της ουσίας 1,1'-(2,2,2-Trichloroethane-1,1-diyl)bis(4-chlorobenzene), γνωστότερη ως DDT. Το DDT χρησιμοποιήθηκε κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου για την καταπολέμηση της ελονοσίας και του τυφοειδούς πυρετού χαρίζοντας έτσι στον P.H. Müller το Νόμπελ Φυσιολογίας και Ιατρικής το 1948 [5]. Επίσης περίπου την ίδια περίοδο έγινε γνωστή η ιδιότητα της δινιτροορθοκρεσόλης (DNOC) ως ζιζανιοκτόνο ενώ ταυτόχρονα από τέσσερεις διαφορετικές επιστημονικές ομάδες σε Μεγάλη Βρετανία και Ηνωμένες Πολιτείες ανακαλύφθηκαν τα ζιζανιοκτόνα 2,4-δίχλωροφαινόξυ οξικό οξύ (2,4D), 2,4,5-τριχλωροφαινόξυ οξικό οξύ και 4-μέθυλο-4-χλώροφαινόξυ οξικό οξύ [6].

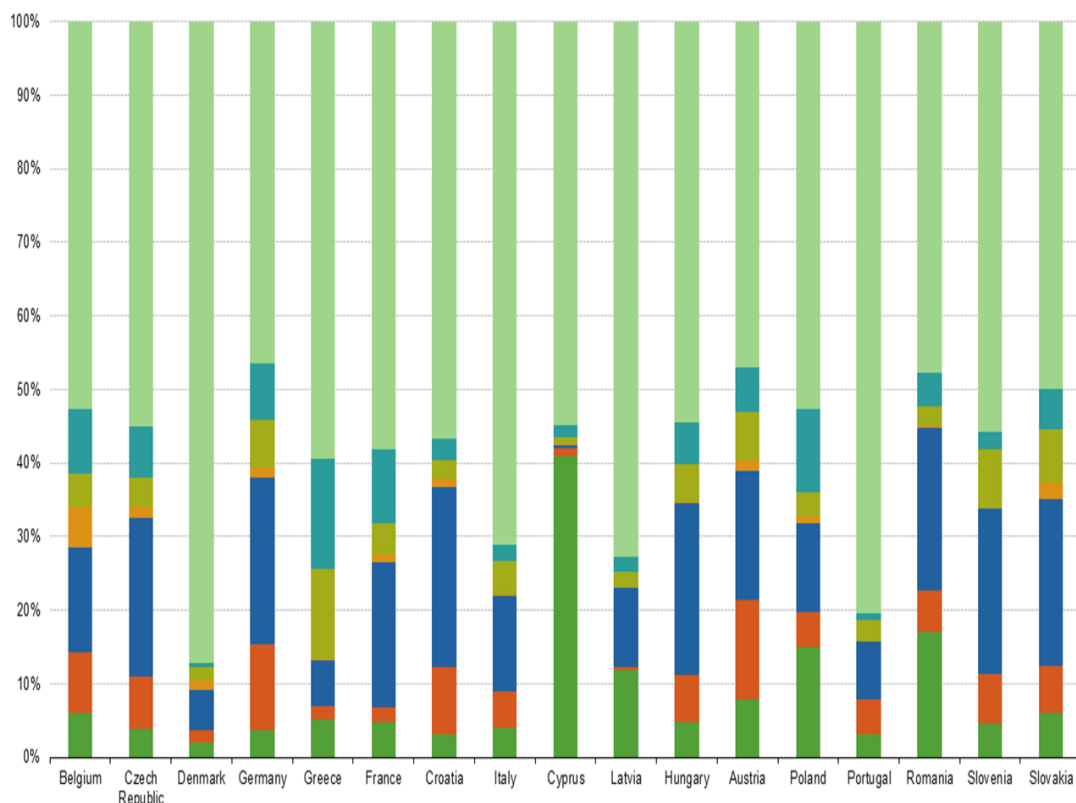
Η περίοδος 1940-1960 χαρακτηρίστηκε ως «Η πράσινη επανάσταση» και είχε ως γνώρισμα την ανάπτυξη μιας μεγάλης ποικιλίας καλλιεργειών με αυξημένη συγκομιδή, την τεχνολογική πρόοδο στα συστήματα άρδευσης και φυσικά την εκτεταμένη σε όλο τον κόσμο χρήση συνθετικών φυτοφαρμάκων. Έως τότε η χρήση φυτοφαρμάκων θεωρούνταν πανάκεια και οι αρνητικές επιπτώσεις τους υποσκελίζονταν χάριν της συμβολής τους στην καταπολέμηση ασθενειών όπως η ελονοσία και η βουβωνική χολέρα. Πρώτη η βιολόγος Rachel Carson με το βιβλίο της "Silent Spring", το οποίο εκδόθηκε το 1962, κατέδειξε τις επιβλαβείς δράσεις στο περιβάλλον λόγω της αλόγιστης χρήσης φυτοφαρμάκων, τονίζοντας την ικανότητα βιοσυσσώρευσης σε ανώτερους οργανισμούς και την πιθανή καρκινογόνο δράση βάση εργαστηριακών δοκιμών σε ποντίκια. Τις επόμενες δεκαετίες υπήρξε συνεχώς αυξανόμενο ενδιαφέρον για ανακάλυψη νέων ουσιών με εξειδικευμένη και εκλεκτική δράση, ώστε να αποφευχθούν επιβλαβείς επιπτώσεις σε άλλους μη παθογόνους φυτικούς ή ζωικούς οργανισμούς, η οποία δράση, ταυτόχρονα, θα μείωνε τα προβλήματα ανθεκτικότητας και επικράτησης στον αγρό φυτοπαρασίτων με μειωμένη ευαισθησία σε ορισμένες χημικές κατηγορίες φυτοφαρμάκων. Έτσι την δεκαετία του 1970 ξεκίνησε η παραγωγή των πρώτων συνθετικών πυρεθρινοειδών

εντομοκτόνων, η ανακάλυψη της ζιζανιοκτόνου δράσης παραγώγων ουρίας και η εμφάνιση του καθολικού ζιζανιοκτόνου φυλλώματος glyphosate.

1.1.2 Τα φυτοφάρμακα σήμερα-Στατιστικά στοιχεία

Η θετική συμβολή των φυτοφαρμάκων στην καταπολέμηση φυτοπαρασίτων, στην αύξηση της γεωργικής παραγωγής και στην εξάλειψη ασθενειών που προσβάλλουν και τον άνθρωπο είναι σχεδόν αυταπόδεικτη. Μάλιστα, οι Jerry Cooper και Hans Dobson σε άρθρο τους το 2007 στο περιοδικό Crop Protection συνόψισαν τα πλεονεκτήματα της χρήσης φυτοφαρμάκων στην ανθρωπότητα και το περιβάλλον [7]. Σήμερα η παγκόσμια αγορά φυτοφαρμάκων συνεχίζει να μεγαλώνει, παρά την απόσυρση πολλών παλαιών και περισσότερο τοξικών δραστικών ουσιών είτε τοπικά είτε παγκοσμίως με συνθήκες όπως η Συνθήκη της Στοκχόλμης για τους έμμονους οργανικούς ρύπους (Persistent Organic Pollutants, POPs) [8].

Οι συνολικές πωλήσεις φυτοφαρμάκων παγκοσμίως αυξήθηκαν στα 54 εκατομμύρια δολάρια για το έτος 2013 από 26.7 εκατομμύρια δολάρια για το έτος 2003 [9]. Σύμφωνα με στοιχεία της Eurostat, μεταξύ 20 χωρών μελών της Ε.Ε. για τις οποίες υπάρχουν στοιχεία, στις Ισπανία, Γαλλία, Ιταλία και Γερμανία αντιστοιχεί η πλειοψηφία των πωλήσεων φυτοφαρμάκων (79%) για το έτος 2016. Οι χώρες αυτές συνεισφέρουν το 46% της συνολικής αγροτικής παραγωγής της Ε.Ε. και αθροιστικά οι γεωργικές τους εκτάσεις αποτελούν περίπου το 50% της συνολικής καλλιεργήσιμης γης της Ε.Ε. Μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών φυτοφαρμάκων μεγαλύτερα ποσοστά πωλήσεων έχουν τα μυκητοκτόνα/βακτηριοκτόνα φυτοφάρμακα (46%) και ακολουθούν τα ζιζανιοκτόνα. Ενδεικτικά παρατίθεται η Εικόνα 1 στην οποία φαίνονται τα ποσοστά κατανομής πωλήσεων φυτοφαρμάκων με ζιζανιοκτόνο δράση από διαφορετικές χημικές τάξεις μεταξύ 17 κρατών μελών της Ε.Ε. [10].



Εικόνα 1: Ποσοστά κατανομής πωλήσεων ζιζανιοκτόνων διαφορετικών χημικών τάξεων σε 17 κράτη μέλη της Ευρωπαϊκή Ένωσης για το έτος 2016 [10]. Φαινόξυ-φυτοορμόνες (■), ατραζίνες/τριαζινόνες (■), αμίδια/ανιλίδια (■), καρβαμιδικά/δικαρβαμιδικά (■), παράγωγα δινιτροανιλίνης (■), παράγωγα ουρίας/ουρακίλης/σουλφονουρίας (■), άλλα φυτοφάρμακα (■).

1.2 Φυτοπροστατευτικά Προϊόντα

1.2.1 Κατηγοριοποίηση και Ιδιότητες Φυτοφαρμάκων

Στη σύγχρονη γεωργία υπάρχουν διαθέσιμες και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τροφίμων πάνω από 1600 δραστικές ουσίες οι οποίες ανήκουν σε πάνω από 100 διαφορετικές χημικές τάξεις. Είναι επομένως προφανές ότι η συστηματική κατηγοριοποίηση των δραστικών ενώσεων που δρουν ως φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι αναγκαία. Τα φυτοφάρμακα λοιπόν μπορούν να κατηγοριοποιηθούν με βάση τη χημική τους τάξη, π.χ. οργανοφωσφορικά, οργανοχλωριωμένα, καρβαμιδικά, με βάση τον οργανισμό στόχο ή τέλος με βάση τον μηχανισμό δράσης τους. Η συνηθέστερη κατηγοριοποίησή τους, κυρίως για

εμπορικούς λόγους, είναι αυτή με βάση τον οργανισμό στόχο, σύμφωνα με την οποία συναντάμε τις παρακάτω κατηγορίες [11] :

- Ακαρεοκτόνα (acaricides)
- Βακτηριοκτόνα (bactericides)
- Μυκητοκτόνα (fungicides)
- Ζιζανιοκτόνα (herbicides)
- Εντομοκτόνα (insecticides)
- Νηματωδοκτόνα (nematicides)
- Τρωκτικοκτόνα (rodenticides)
- Κοχλιοειμακοκτόνα (molluscicides)
- Αλγοκτόνα (algicides)
- Ωοκτόνα (ovicides)
- Ρυθμιστές αύξησης (plant growth regulators)
- Ελκυστικά (attractants)
- Απωθητικά (repellents)
- Αποφυλλωτικά (defoliantes)
- Αποξηραντικά (desiccants)
- Απολυμαντικά (disinfectants)
- Υποκαπνιστικά (fumigants)
- Μη κατηγοριοποιημένα (miscellaneous)

Στον Πίνακα 1 παρατίθενται οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες χημικές τάξεις φυτοφαρμάκων σε συνδυασμό με τη χρήση τους ανάλογα με τον οργανισμό στόχο. Παρατηρούμε ότι η ίδια χημική τάξη, όπως π.χ. τα καρβαμιδικά, μπορεί να έχει δράσει συγχρόνως έναντι των ακάρεων, των μυκήτων, των ζιζανίων και των εντόμων. Όσον αφορά στη συστηματική ονοματολογία των φυτοφαρμάκων, αυτή προκύπτει από τους κανονισμούς της IUPAC και της CAS η οποία δίνει σε κάθε ουσία ένα μοναδικό κωδικό αριθμό. Λόγω της πληθώρας των δραστικών ουσιών και της δύσχρηστης στην πράξη συστηματικής ονομασίας ο οργανισμός ISO έχει εκδώσει σχετικά πρότυπα (ISO 257:2004, ISO 1750:1981, ISO 765:1976) τα οποία ρυθμίζουν τις κοινές ονομασίες των ήδη υπαρχόντων φυτοφαρμάκων, των νέων δραστικών ουσιών αλλά και την ονομασία των δραστικών χωρίς κοινή ονομασία.

Ο χαρακτηρισμός των φυτοφαρμάκων περιλαμβάνει τον πλήρη προσδιορισμό των φυσικών και χημικών ιδιοτήτων τους, καθώς η γνώση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων είναι προαπαιτούμενο, ώστε να μπορεί να προβλεφθεί η συμπεριφορά της εκάστοτε δραστικής ουσίας, σε συνδυασμό και με τα έκδοχα που μπορεί να υπάρχουν σε μια φαρμακοτεχνική μορφή, κατά τον μεταβολισμό της στα φυτά, κατά τον αναλυτικό προσδιορισμό της όπως επίσης και η τύχη της

στο περιβάλλον μετά την εφαρμογή στον αγρό. Οι φυσικοχημικές παράμετροι που χαρακτηρίζουν μια δραστική ουσία με φυτοπροστατευτική δράση είναι η διαλυτότητά της στο νερό, η τάση ατμών (V_p), η σταθερά Henry (K_H), η σταθερά ιοντισμού (pK_a) και ο συντελεστής κατανομής οκτανόλης-νερού (K_{ow}). Φυτοφάρμακα με υψηλή διαλυτότητα στο νερό δύναται να μεταφερθούν είτε από το βρόχινο είτε από το αρδεύσιμο νερό, σε επιφανειακά νερά σε μεγάλη απόσταση από το σημείο εφαρμογής τους, ενώ φυτοφάρμακα με μεγάλες τιμές $\log K_{ow}$, ο οποίος είναι δείκτης λιποφιλικότητας, τείνουν να βιοσυσσωρεύονται στους ανώτερους οργανισμούς. Η τάση ατμών και η σταθερά Henry είναι δύο παράμετροι που σχετίζονται με την πτητικότητα μιας ουσίας, οπότε η εφαρμογή σκευασμάτων με υψηλή K_H πρέπει να αποφεύγεται σε ημέρες με υψηλή θερμοκρασία ενώ δείγματα προς ανάλυση που περιέχουν δραστικές με υψηλή K_H πρέπει να χειρίζονται προσεκτικά ώστε να αποφευχθούν τυχόν απώλειες των περιεχόμενων πτητικών ουσιών. Όσον αφορά τέλος τη σταθερά ιοντισμού είναι σημαντικό να γνωρίζουμε ποιες δραστικές μπορούν να ιοντιστούν στο pH του εδάφους ή του νερού (pH 5-8), ώστε να προβλεφθεί η έκπλυση ή η κατακράτηση τους από σωματίδια του χώματος.

Πίνακας 1: Χημικές τάξεις φυτοφαρμάκων οι οποίες μπορούν να δράσουν ως ακαρεοκτόνα (A), μυκητοκτόνα (M), ζιζανιοκτόνα (Z) ή εντομοκτόνα (E). Η χρήση του συμβόλου ✓ αποσκοπεί στο να επισημάνει σε ποια/ποιες κατηγορίες φυτοπαρασίτων βρίσκει εφαρμογή η κάθε χημική τάξη, ενώ ο αριθμός εντός της παρένθεσης υποδηλώνει τον αριθμό των υποομάδων εντός κάθε χημική τάξης [12].

Χημική Τάξη	A	M	Z	E	Χημική Τάξη	A	M	Z	E
Amides		✓(7)	✓(3)		Phenoxy acids			✓(3)	
Aromatics		✓	✓(4)		Pthalimides	✓			✓
Benzimidazoles		✓			Pyrazoles	✓(1)		✓(2)	✓(1)
Benzothiazoles		✓	✓		Pyrethroids	✓(2)			✓(3)
Benzoylcyclohexanediones			✓		Pyridazines			✓	
Benzoylfuranyl alkylsulfonates			✓		Pyridazinones			✓	
Bridged diphenyls	✓	✓			Pyridines		✓(1)		
Carbamates	✓(1)	✓(2)	✓(1)	✓(4)	Pyrimidinamines	✓			✓
Carbonates			✓		Pyrimidines		✓		
Carbazates	✓				Pyrroles	✓			✓
Cyanoacrylates		✓			Quaternary Ammoniums		✓		
Diamides				✓	Quinolines		✓		
Dicarboximides		✓(2)	✓		Quinones		✓		
Dinitroanilines			✓		Quinoxalines	✓	✓		
Dinitrophenols	✓	✓	✓	✓	Strobilins	✓	✓(4)		
Dithiocarbamates		✓(2)	✓		Sulfoximines				✓
Dithiolates		✓			Tetrazines	✓			
Formamides	✓			✓	Tetronic acids	✓			✓
Hydrazides	✓				Thiazoles		✓		
Imidazoles		✓			Thiazolidines	✓	✓		✓
Imidazolinones			✓		Thiocarbamates	✓	✓	✓	
Macrocyclic lactones	✓(2)			✓(3)	Thiocarbonates			✓	
Morpholines		✓			Thiophenes		✓		
Neonicotinoids				✓(3)	Thioureas	✓		✓	✓
Nitriles			✓		Triazines		✓(4)	✓	
Organochlorines	✓			✓(1)	Triazinones			✓	
Organophosphorus	✓(5)		✓	✓(7)	Triazoles		✓	✓	
Organotins	✓	✓			Triazolones			✓	
Oxadiazines				✓	Triazolopyrimidines		✓	✓	
Oxadiazolones			✓	✓	Ureas		✓(3)	✓	✓
Oxazoles		✓	✓		Uracils			✓	

1.2.2 Η περίπτωση των ζιζανιοκτόνων

1.2.2.1 Ζιζάνια και τρόποι αντιμετώπισης

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. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η παρουσία ζιζανίων έχει ως συνέπεια την αύξηση του κόστους παραγωγής, προβλήματα στην εφαρμογή των λιπασμάτων, των ψεκασμών και της άρδευσης καθώς και προβλήματα στη συγκομιδή και την επεξεργασία των γεωργικών προϊόντων.

Οι ζημιογόνες επιπτώσεις των ζιζανίων εξαρτώνται από διάφορες παραμέτρους, όπως είναι το είδος του ζιζανίου, ο χρόνος εμφάνισης στην καλλιέργεια, ο τύπος του εδάφους, κ.α., και δεν περιορίζονται αποκλειστικά στην άμεση αλληλεπίδρασή τους με τα καλλιεργητικά φυτά. Πολλά ζιζάνια είναι εναλλακτικοί ξενιστές εντόμων, φυτοπαθογόνων οργανισμών και ιών, άλλα πάλι περιέχουν δηλητηριώδης ουσίες, στους σπόρους ή στα βλαστικά τους μέρη, δημιουργώντας προβλήματα στην κτηνοτροφία όπως δηλητηριάσεις ή παραγωγή γάλακτος με δυσάρεστη οσμή. Επίσης, πολλά ζιζάνια προκαλούν αλλεργικές αντιδράσεις στον άνθρωπο ενώ οι σπόροι μερικών ζιζανίων έχουν άμεση τοξική δράση. Πέραν αυτών, η παρουσία ζιζανίων στο γεωργικό περιβάλλον έχει σε ορισμένες περιπτώσεις και ωφέλιμες επιδράσεις. Για παράδειγμα πολλά ζιζάνια συμβάλλουν στην ισορροπία των τοπικών οικοσυστημάτων φιλοξενώντας ωφέλιμα έντομα ή μικροοργανισμούς, διαθέτοντας νηματωδοκτόνες ιδιότητες ή/και περιορίζοντας τη διάβρωση του εδάφους.

Στην Ελλάδα έχουν καταγραφεί πάνω από 200 ζιζάνια εκ των οποίων τα δέκα με τη μεγαλύτερη αρνητική επίπτωση στις καλλιέργειες και τη μεγαλύτερη δυσκολία στην αντιμετώπιση είναι η αγριάδα (*Cynodon dactylon*), το βλήτο (*Amaranthus spp.*), η μουχρίτσα (*Echinochloa crus-galli*), η αγριοβρώμη (*Avena spp.*), η λουβουδιά (*Chenopodium album*), η κύπερη (*Cyperus rotundus*), ο βέλιουρας (*Sorghum halepense*), το αγριοσινάπι (*Sinapis spp.*), η αγριοντομάτα (*Solanum nigrum*) και η περικοκλάδα (*Convolvulus arvensis*) [13].

A**B****Γ**

Εικόνα 2: Τρία από τα πιο συχνά ζιζάνια στην Ελλάδα: **A)** λουβουδιά (*chenopodium album*), **B)** μουχρίτσα (*Echinochloa crus-galli*), **Γ)** αγριάδα (*Cynodon dactylon*) [14].

Οι μέθοδοι αντιμετώπισης των ζιζανίων μπορεί να είναι καλλιεργητικές, φυσικές ή μηχανικές, βιολογικές και χημικές. Οι καλλιεργητικές μέθοδοι ελέγχου των ζιζανίων αφορούν ένα σύνολο πρακτικών όπως είναι η αμειψισπορά, η χρήση σπόρων απαλλαγμένων από σπόρους ζιζανίων, η πυκνότητα και η εποχή της σποράς αλλά και ο περιορισμός των λιπασμάτων και η συχνότητα άρδευσης. Στις φυσικές ή μηχανικές μεθόδους αντιμετώπισης των ζιζανίων περιλαμβάνεται το ξεβοτάνισμα, το όργωμα και το σκάλισμα. Η βιολογική αντιμετώπιση των ζιζανίων αφορά κυρίως στην εισαγωγή εντός του αγρο-οικοσυστήματος ενός βιολογικού παράγοντα π.χ. εντόμου ή μύκητα ο οποίος ιδανικά προσβάλλει μόνο το ζιζάνιο-στόχο.

Στη σύγχρονη βέβαια γεωργία η χημική αντιμετώπιση των ζιζανίων, δηλαδή η χρήση συνθετικών ή φυσικών ζιζανιοκτόνων, είναι ο κύριος τρόπος αντιμετώπισης των ζιζανίων και οι υπόλοιποι τρόποι δρουν συμπληρωματικά. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης ζιζανιοκτόνων είναι πολλαπλά, καταρχάς τα ζιζάνια ελέγχονται στα πρώτα στάδια ανάπτυξής τους και επιτυγχάνεται καταπολέμηση ζιζανίων που είναι δύσκολο να διακριθούν από την κύρια καλλιέργεια. Με τη

χρήση ζιζανιοκτόνων είναι δυνατό να καταπολεμηθούν πολυετή ζιζάνια με βαθύ ριζικό σύστημα και αποφεύγεται η διάβρωση επικλινών εδαφών αφού το όργανο μπορεί να παραληφθεί. Τέλος μειώνεται το κόστος της καλλιέργειας λόγω αφενός μικρότερων απαιτήσεων σε εργατικό δυναμικό, αφετέρου δε λόγω της εκμηχάνισης της γεωργικής παραγωγής κυρίως αροτραίων καλλιεργειών όπως τα σιτηρά, το καλαμπόκι, το βαμβάκι [15]. Ένα ζιζανιοκτόνο ανάλογα με τον χρόνο εφαρμογής του μπορεί να διακριθεί σε προ-φυτρωτικό (pre-emergence), το οποίο εφαρμόζεται στο έδαφος πριν το φύτευμα των ζιζανίων, οπότε τα καταπολεμά πριν ή μόλις φυτρώσουν και βλαστήσουν, σε μετά-φυτρωτικό (post-emergence) το οποίο εφαρμόζεται σε ήδη υπάρχοντα ζιζάνια και σε προ-φυτευτικό ή προσοσπαρτικό (pre-plant) το οποίο εφαρμόζεται στο έδαφος συνήθως ημέρες ή και εβδομάδες πριν τη σπορά ή τη μεταφύτευση της καλλιέργειας [16]. Ανάλογα δε με τη επιφάνεια του εδάφους που καλύπτεται, οι επεμβάσεις με ζιζανιοκτόνα διακρίνονται σε καθολικές, κατευθυνόμενες, κατά λωρίδες και κατά κηλίδες. Οι καθολικές καλύπτουν όλοι την επιφάνεια της καλλιέργειας ενώ οι κατευθυνόμενες εφαρμόζονται μόνο στα ζιζάνια ή στο έδαφος, αποφεύγοντας την επαφή με το καλλιεργούμενο φυτό.

1.2.2.2 Τα ζιζανιοκτόνα atrazine, paraquat & glyphosate

Το ζιζανιοκτόνο atrazine ανήκει στην οικογένεια των υποκατεστημένων 1,3,5 συμμετρικών τριαζινών και είναι ίσως το πιο διαδεδομένο ζιζανιοκτόνο της συγκεκριμένης χημικής τάξης. Χρησιμοποιείται προ- ή μετά-φυτρωτικά για την καταπολέμηση ετήσιων πλατύφυλλων ή αγρωστωδών ζιζανίων σε καλλιέργειες αραβόσιτου, σιταριού, σόργου, ζαχαροκάλαμου, κ.α. [17]. Συντέθηκε για πρώτη φορά το 1958 στα εργαστήρια της εταιρίας J. R. Geigy Ltd όπου και αποδείχθηκε η δράση του ως ζιζανιοκτόνο. Σήμερα η κύρια παραγωγός εταιρία είναι η Syngenta και το προϊόν διατίθεται είτε ως παρασκεύασμα μιας ουσίας με εμπορικά ονόματα όπως AAtrex 4L®, AAtrex® Nine-0® ή ως μείγμα με άλλα ζιζανιοκτόνα με εμπορικά ονόματα όπως πχ Lumax® κ.α. [18].

Η συνθετική ένωση 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride dichloride ή paraquat, όπως είναι η κοινή ονομασία, περιγράφηκε για πρώτη φορά από τους

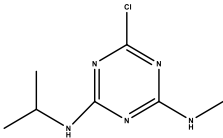
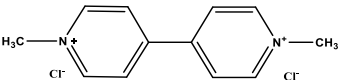
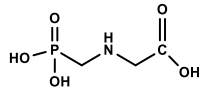
H.Weidel & M.Russo το 1882 αλλά εισήχθη στην αγορά ως ζιζανιοκτόνο το 1962 από τη βρετανική εταιρία Imperial Chemical Industries [19]. Το 1993 η εταιρία συγχωνεύτηκε με τη Zeneca η οποία το 2000 συγχωνεύτηκε με τη Novartis Agribusiness προς δημιουργία μιας νέας εταιρείας της Syngenta. Σήμερα υπάρχουν πολύ κατασκευαστές φυτοπροστατευτικών προϊόντων με δραστική ουσία το paraquat αλλά η πιο διαδεδομένη φαρμακοτεχνική του μορφή είναι το Gramoxone® SL 2 της Syngenta. Το paraquat είναι ένα καθολικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος το οποίο χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση ενός ευρέως φάσματος πλατύφυλλων και αγρωστωδών ζιζανίων στα οπωροφόρα, στο αμπέλι, την ελιά, τα βολβώδη λαχανικά (πατάτα, καρότο, κρεμμύδι κλπ) αλλά και σε καλλιέργειες όπως η σόγια, το σάρι, το ρύζι, το καλαμπόκι, το βαμβάκι, ο καφές και το τσάι. Χαρακτηριστικό του είναι ότι δρα σε μόλις 30 min και οι φυτοτοξικές του ιδιότητες απενεργοποιούνται μόλις έρθει σε επαφή με το έδαφος λόγω της ισχυρής προσρόφησής του από αργιλικά ορυκτά [20].

Το glyphosate είναι ένα συστηματικό ζιζανιοκτόνο φυλλώματος το οποίο χρησιμοποιείται επίσης μεταφυτρωτικά για την καταπολέμηση των ετήσιων πλατύφυλλων ή αγρωστωδών ζιζανίων. Ανακαλύφθηκε αρχικά από τον χημικό Henri Martin της φαρμακευτικής εταιρίας Cilag αλλά η φαρμακολογική του δράση δεν κατοχυρώθηκε από την εταιρεία. Λίγα χρόνια αργότερα το 1970 ο χημικός John Franz της εταιρίας Monsanto ανακάλυψε ανεξάρτητα το glyphosate κατά τη σύνθεση πάνω από 100 αναλόγων του αμινομεθυλοφωσφονικού οξέος και τελικά εισήχθη για πρώτη φορά στην αγορά το 1974 με την εμπορική ονομασία Roundup® [21].

Στον Πίνακα 2 συνοψίζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των τριών ζιζανιοκτόνων και παρατίθεται η μοριακή τους δομή. Τα συγκεκριμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι ευρέως διαδεδομένα στον κόσμο και συγκεκριμένα το glyphosate είναι το ζιζανιοκτόνο με τις περισσότερες πωλήσεις παγκοσμίως. Η τόσο διαδεδομένη χρήση του οφείλεται στο γεγονός ότι η παραγωγός εταιρία Monsanto εισήγαγε στα μέσα της δεκαετίας του 1990 γενετικά τροποποιημένους σπόρους ανθεκτικούς στο glyphosate [22]. Επιπλέον τα δύο ζιζανιοκτόνα glyphosate και paraquat έχουν χρησιμοποιηθεί από τους παραγωγούς συνεργιστικά στην προσπάθεια προώθησης της γεωργικής

πρακτικής χωρίς όργωμα (no-till farming) ή με συντηρητικό όργωμα (conservation tillage) κατά την οποία ελαχιστοποιούνται οι εδαφικές διαβρώσεις και μειώνονται κατά πολύ οι εκπομπές διοξειδίου του άνθρακα [20].

Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες εξεταζόμενων ζιζανιοκτόνων [23, 24].

	atrazine	paraquat	glyphosate
Όνομασία κατά IUPAC	6-chloro-N ² -ethyl-N ⁴ -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride	N-(phosphonomethyl)glycine
Μοριακό Βάρος	215.7	257.2	169.1
Μοριακή Δομή			
Χημική Κατηγοριοποίηση	τριαζίνες	διπυριδίλια	οργανοφωσφωρικά
Τάση Ατμών (Pa, 25 °C)	3.85×10^{-5}	0.1×10^{-3}	0.0131×10^{-3}
Σταθερά Henry (Pa m ³ mol ⁻¹ , 25 °C)	1.5×10^{-4}	4×10^{-9}	2.1×10^{-7}
Διαλυτότητα στο νερό	33.7 mg L ⁻¹ (22 °C)	700 g L ⁻¹ (20 °C)	11.6 g L ⁻¹ (25 °C)
Σταθερά διάστασης pKa	1.7	-	pKa ₁ 0.8, pKa ₂ 3, pKa ₃ 6
Συντελεστής κατανομής οκτανόλης/νερού K _{ow} (logP)	2.5 (25 °C)	-4.5	< -3.4 (20 °C)
Συντελεστής προσρόφησης εδάφους K _{oc} (mL g ⁻¹)	100	100000	1424
Χρόνος ημίσειας ζωής στο χώμα DT ₅₀	75	365	15

1.2.3 Πρόσληψη των φυτοφαρμάκων από τα φυτά, μηχανισμός δράσης

Η δυνατότητα εισόδου και μεταφοράς των φυτοφαρμάκων εντός των φυτών είναι δύο πολύ σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα ενός φυτοπροστατευτικού προϊόντος. Από την άποψη της ικανότητας μεταφοράς εντός των φυτών τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα διακρίνονται σε προστατευτικά και διασυστηματικά. Προστατευτικά (protectives) χαρακτηρίζονται εκείνα που δεν εισέρχονται και δεν κυκλοφορούν, τουλάχιστον σε σημαντικό βαθμό, στο εσωτερικό των φυτικών οργανισμών και που προστατεύουν μόνο το μέρος του φυτικού σώματος επί του οποίου έχουν εναποτεθεί. Η πρόσληψή τους από τα φυτά είναι αμελητέα και χρησιμοποιούνται μόνο για προληπτικούς λόγους. Τα διασυστηματικά (systemics), αντιθέτως, φυτοφάρμακα έχουν την ικανότητα να εισέρχονται και να κυκλοφορούν μέσα στους φυτικούς ιστούς και να μεταφέρονται και σε άλλα όργανα του φυτού. Η είσοδος των διασυστηματικών φυτοφαρμάκων στα φυτά μπορεί να γίνει από τα φύλλα, τα στελέχη, τις ρίζες και τον σπόρο. Τα περισσότερα σύγχρονα φυτοπροστατευτικά προϊόντα είναι, κατά κύριο λόγο, διασυστηματικά και χαρακτηρίζονται από 1) κατάλληλη λιποφιλικότητα/υδροφιλικότητα ώστε να μπορούν να εισέρχονται δια μέσου των λιπόφιλων στοιβάδων των φυτικών ιστών αλλά και να μετακινούνται εντός αυτών, 2) εκλεκτική τοξικότητα σε κυτταρικό επίπεδο ώστε να μην προκαλούν γενική τοξικότητα και 3) χημική σταθερότητα ώστε να μην διασπώνται γρήγορα [15].

Οι τοξικές επιδράσεις των φυτοφαρμάκων στους οργανισμούς στόχους καθορίζονται από τη χημική τάξη στην οποία ανήκουν και περιλαμβάνουν έναν μεγάλο αριθμό μηχανισμών δράσης. Οι ειδικοί στόχοι στο εκάστοτε φυτοπαράσιτο μπορεί να είναι ένζυμα, υποδοχείς ή κανάλια μεταφοράς ιόντων. Υπάρχουν σχεδόν 100 διαφορετικοί βιοχημικοί στόχοι σε παράσιτα όπως κουνούπια, ζιζάνια και μύκητες για τις κυριότερες χημικές τάξεις των αντίστοιχων κατηγοριών φυτοφαρμάκων, δηλαδή των εντομοκτόνων, των ζιζανιοκτόνων και των μυκητοκτόνων [25]. Σε γενικές γραμμές τα περισσότερα εντομοκτόνα εμποδίζουν τη διάδοση της νευρικής ώσης ενώ τα μυκητοκτόνα δρουν σε πολλές στοιχειώδεις κυτταρικές λειτουργίες όπως η κυτταρική αναπνοή και η μιτωτική

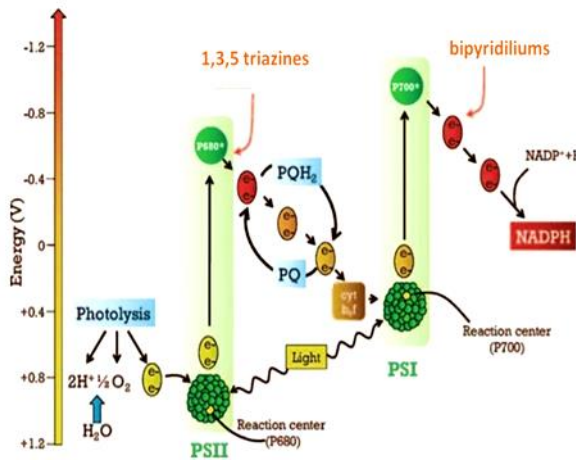
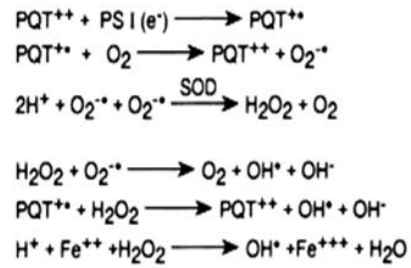
διαίρεση. Για τους σκοπούς της παρούσας διδακτορικής διατριβής θα αναφερθούν πιο αναλυτικά οι μηχανισμοί δράσης των ζιζανιοκτόνων.

1.2.3.1 Μηχανισμός δράσης ζιζανιοκτόνων

Οι συνθετικές ή φυσικής προέλευσης οργανικές ενώσεις με ζιζανιοκτόνο δράση μπορούν να διακριθούν με βάση τον μηχανισμό δράσης τους ως εξής:

1. Παρεμποδιστές της φωτοσύνθεσης
2. Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης αμινοξέων
3. Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης λιπαρών οξέων
4. Παρεμποδιστές της κυτταρικής διαίρεσης
5. Παρεμποδιστές της βιοσύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος
6. Παρεμποδιστές βιοσύνθεσης βιταμινών
7. Ζιζανιοκτόνα με δράση αυξίνης ή παρεμποδιστές αυτής

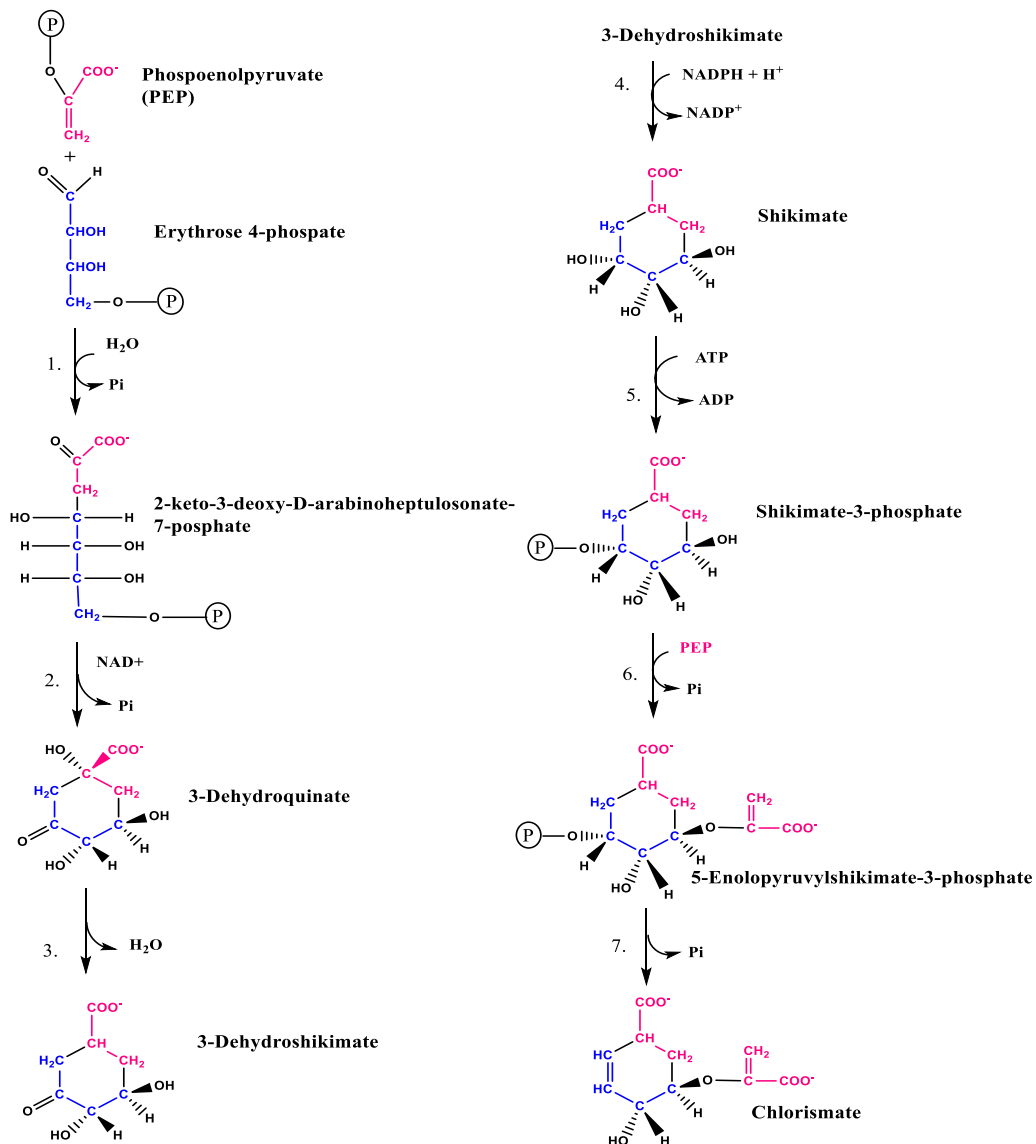
Όσον αφορά στα ζιζανιοκτόνα που προσδιορίζονται στην παρούσα διατριβή, τα atrazine και paraquat παρεμβάλλονται στη φωτοσυνθετική πορεία ενώ το glyphosate παρεμποδίζει τη βιοσύνθεση των αρωματικών αμινοξέων. Πιο αναλυτικά, το atrazine συσσωρεύεται στους χλωροπλάστες και αναστέλλει τη ροή ηλεκτρονίων εντός του συμπλέγματος πρωτεϊνών που αποτελούν το φωτοσύστημα II (PSII) μέσω της δέσμευσής του κυρίως στη 2^η θέση δέσμευσης πλαστοκινόνης Q_B της υπομονάδας D₁. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να διακόπτεται η ροή ηλεκτρονίων παρόλο που οι χλωροφύλλες του PSII συνεχίζουν να απορροφούν ηλιακή ενέργεια. Συνέπεια αυτού είναι η δημιουργία πολλών φωτοοξειδωμένων μορίων και ελεύθερων ριζών τα οποία αντιδρούν με συστατικά της μεμβράνης του θυλακοειδούς οδηγώντας στην καταστροφή τους. Επομένως η φυτοτοξικότητα του atrazine δεν οφείλεται μόνο στην παρακώληση της ροής των ηλεκτρονίων και στον υποσιτισμό του φυτού αλλά και στην απορρόφηση φωτός και των παραπροϊόντων αυτής της διαδικασίας [26, 27].

A**B**

Εικόνα 3: Α) Διάγραμμα του Z-σχήματος της αντίδρασης Hill όπου το χρώμα των ηλεκτρονίων είναι ενδεικτικό της ενέργειάς τους βάση του βέλους αναφοράς ενεργειών αριστερά. Με πορτοκαλί βέλη φαίνονται σχηματικά τα σημεία στα οποία παρεμβάλλονται τα μόρια των atrazine και paraquat παρεμποδίζοντας τη ροή ηλεκτρονίων [28]. Β) Οξειδοαναγωγικός κύκλος paraquat μετά από πρόσληψη ηλεκτρονίων από το PS I και παραγωγή δραστικών ελευθέρων ριζών [όπου SOD (superoxide dismutase) υπεροξειδική δισμουτάση] [29].

Με παρόμοιο τρόπο, δηλαδή προκαλώντας οξειδωτικό στρες λειτουργεί και το paraquat. Συνηθέστερα το paraquat εφαρμόζεται στα φυτά ως δισθενές άλας (PQ^{2+}) το οποίο όταν βρεθεί στη θυλακοειδή μεμβράνη των χλωροπλαστών προσλαμβάνει ηλεκτρόνια από το φωτοσύστημα I και μετατρέπεται σε μονοσθενή ρίζα (PQ^{+*}) η οποία αντιδρά με μοριακό οξυγόνο προς παραγωγή ριζών υπεροξειδίου. Μέσα από μια κυκλική οξειδοαναγωγική πορεία (redox cycling) παράγονται διάφορες δραστικές ρίζες ενώ το paraquat αναγεννάτε και μπορεί να συμμετάσχει σε έναν επόμενο κύκλο παραγωγής ελευθέρων ριζών. Όπως και το atrazine έτσι και το paraquat παρεμποδίζει την αναγωγή του NADP^+ σε NADPH επομένως την παραγωγή ATP και κατά συνέπεια την αναστολή της αναγωγής του διοξειδίου του άνθρακα προς οργανικές ενώσεις μέσω του κύκλου των φωσφορικών πεντοζών (Κύκλος Calvin) οδηγώντας το φυτό σε υποσιτισμό. Παρά τους μηχανισμούς επιδιόρθωσης και εξουδετέρωσης των ελευθέρων ριζών, οι οποίες παράγονται σε κάποιο βαθμό και κατά τη διάρκεια της φωτοσύνθεσης,

το παράματ μέσω του οξειδωτικού κύκλου οδηγεί στη δημιουργία πληθώρας ελευθέρων δραστικών ριζών (Εικόνα 3B), οι οποίες με τη σειρά τους αντιδρούν με λιπίδια της μεμβράνης των θυλακοειδών προκαλώντας γενικευμένο οξειδωτικό στρες και θανάτωση του φυτού.



Εικόνα 4: Βιοσύνθεση του χλωρισμικού οξέος, του ενδιάμεσου της σύνθεσης των αρωματικών αμινοξέων σε φυτά & βακτήρια. Το βήμα 6, το οποίο καταλύεται από το ένζυμο συνθάση του 3-φωσφο-5-ενολοπυροσταφυλο-σικιμικού οξέος αναστέλλεται πλήρως από το ζιζανιοκτόνο glyphosate. Αναπροσαρμογή από Principles of Biochemistry Leningher [30]

Αντιθέτως το ζιζανιοκτόνο glyphosate δεν αναστέλλει τη δράση κάποιου ενζύμου του μηχανισμού της φωτοσύνθεσης αλλά λειτουργεί ως αναστολέας του ενζύμου συνθάση του 3-φωσφο-5-ενολοπυροσταφυλο-σικιμικού οξέος (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate, EPSP), ενός ενζύμου στο μεταβολικό μονοπάτι του σικιμικού οξέος που ευθύνεται για τον σχηματισμό των αρωματικών αμινοξέων στα ανώτερα φυτά και σε κάποια φωτοσυνθετικά βακτήρια [30, 31].

1.2.4 Μεταβολισμός και Περιβαλλοντική τύχη φυτοφαρμάκων

Η μελέτη του μεταβολισμού των φυτοφαρμάκων στα φυτά αλλά και σε άλλους οργανισμούς όπως βακτήρια, μύκητες, έντομα και θηλαστικά, συμπεριλαμβανομένου του ανθρώπου, είναι καθοριστικής σημασίας διότι εν πρώτης συνδέεται με τις άμεσες ή δευτερεύουσες τοξικές τους επιδράσεις και την εκτίμηση κινδύνου σχετικά με την κατανάλωση τροφίμων ή νερού επιβαρυσμένων με φυτοφάρμακα, καθώς είναι πιθανό μεταβολίτες φυτοφαρμάκων να είναι πιο τοξικοί συγκριτικά με τη «γονεϊκή» ουσία. Επιπλέον ο μεταβολισμός των φυτοφαρμάκων σχετίζεται με την περιβαλλοντική τους τύχη και πιο ειδικά με ότι αφορά στη βιοαπεικοδόμησή τους και ως εκ τούτου την ικανότητα παραμονής μιας δραστικής ουσίας στο έδαφος για μεγάλα χρονικά διαστήματα, γεγονός το οποίο μπορεί να επηρεάσει την κατανομή της σε υπόγεια και επιφανειακά νερά. Μεταβολίτες των φυτοφαρμάκων είτε από τα ίδια τα φυτά στα οποία έχει εφαρμοστεί είτε από βακτήρια του εδάφους, εν αντιθέσει με τη «γονεϊκή» ένωση, είναι πιθανό να εκπλένονται πιο εύκολα καταλήγοντας γρηγορότερα στον υδροφόρο ορίζοντα. Η γνώση των μεταβολικών οδών ενός φυτοφαρμάκου βοηθάει επίσης στην κατανόηση φαινομένων ανθεκτικότητας και στην εξεύρεση νέων στοχευόμενων ενώσεων μέσω ορθολογικού σχεδιασμού.

Ο όρος μεταβολισμός χρησιμοποιείται για να περιγράψει τη συνολική τύχη μιας μη ενδογενούς ουσίας ή ξενοβιοτικού, δηλαδή την απορρόφηση, την κατανομή, τη βιομετατροπή και την απέκκριση αυτής από έναν οργανισμό. Ένας μεγάλος αριθμός περίπλοκων μεταβολικών οδών είναι δυνατό να λάβουν χώρα εντός των βιολογικών συστημάτων των φυτών ή άλλων οργανισμών κατά τη διάρκεια του μεταβολισμού των προσλαμβανόμενων φυτοφαρμάκων. Έτσι οι

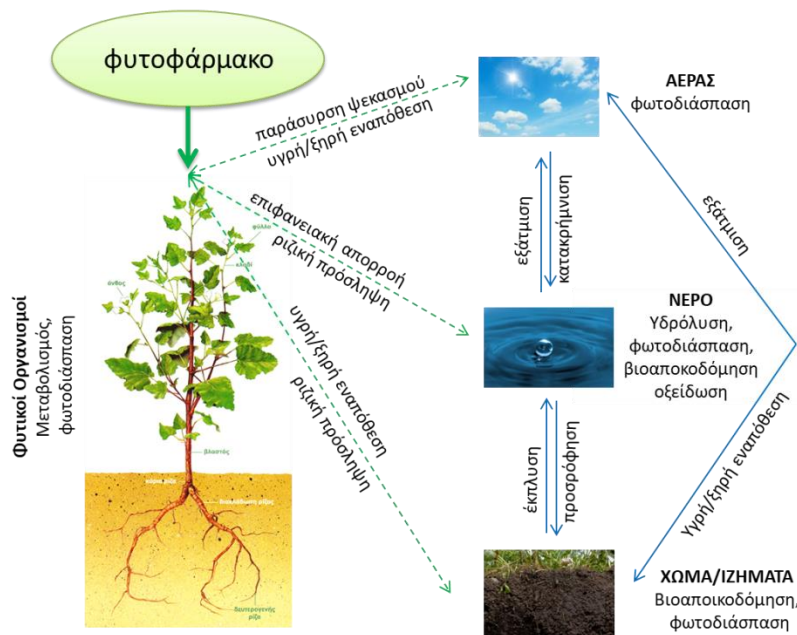
μεταβολίτες που προκύπτουν από αυτές τις βιο-μετατροπές μπορούν να καταταγούν κυρίως σε τρεις φάσεις. Στη Φάση I του μεταβολισμού η «γονεϊκή» ένωση μετατρέπεται μέσω αντιδράσεων οξειδωσης, αναγωγής ή/και υδρόλυσης σε πιο υδατοδιαλυτή και λιγότερο τοξική μορφή. Οι οξειδωτικές αντιδράσεις είναι το πρώτο και πιο συχνό στάδιο βιομετατροπής των φυτοφαρμάκων και συμβαίνουν με τη βοήθεια ενζύμων όπως το κυτόχρωμα P450. Στη συνέχεια, η Φάση II του μεταβολισμού περιλαμβάνει τη σύζευξη ή της «γονεϊκής» ένωσης ή των μεταβολιτών της Φάσης I με ενδογενής ουσίες όπως υδαάνθρακες, πεπτίδια, λιπίδια ή γλουταθειόνη προς τον σχηματισμό μεταβολιτών ακόμα πιο υδατοδιαλυτών και με μειωμένη τοξικότητα. Τέλος η τρίτη φάση του μεταβολισμού (Φάση III) οδηγεί στην επιπλέον σύζευξη των προϊόντων της Φάσης II και στο σχηματισμό δεσμευμένων υπολειμμάτων (bound residues), δηλαδή μεταβολιτών που μπορούν να ενσωματωθούν και να αποθηκευτούν στο κυτταρικό τοίχωμα των φυτών [12, 31].

Μετά την εφαρμογή ενός φυτοφαρμάκου σε μια καλλιέργεια η περιβαλλοντική τύχη της ένωσης αυτής επηρεάζεται από φυσικούς, π.χ. κλίμα, χημικούς, π.χ. είδος φυτοφαρμάκου και βιολογικούς, π.χ. μεταβολισμός, παράγοντες οι οποίοι καθορίζουν την παραμονή και την κινητικότητα της. Γενικά οι διαδικασίες που κυβερνούν την περιβαλλοντική τύχη των φυτοφαρμάκων στο έδαφος και στα υπόγεια και επιφανειακά νερά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις τύπους [32]: α) διαδικασίες μεταφοράς μέσω των οποίων ένα φυτοφάρμακο απομακρύνεται μακριά από το σημείο εφαρμογής προς το περιβάλλον κυρίως μέσω του επιφανειακού νερού, β) διαδικασίες μετανάστευσης οι οποίες αφορούν στην κατανομή ενός φυτοφαρμάκου μεταξύ των τριών φάσεων δηλαδή του εδάφους, του νερού και του αέρα και γ) διαδικασίες μετατροπής οι οποίες αφορούν τη βιολογική και χημική τροποποίηση μιας ουσίας σε κάθε μια από τις τρεις φάσεις αλλά και στο ίδιο το φυτό. Οι διαδικασίες μεταφοράς και μετανάστευσης από το σημείο εφαρμογής προς το έδαφος, το νερό και τον αέρα αλλά και οι διαδικασίες μετατροπής των φυτοφαρμάκων εξαρτώνται από την ποιότητα και τα χαρακτηριστικά του κάθε μέσου στο οποίο βρίσκεται η ουσία όπως π.χ., του εδάφους (σύσταση, πορώδες, pH, οργανική ύλη, κλίση) και του νερού (βάθος και επιφάνεια υδάτινης μάζας, pH, αλατότητα, οργανική ύλη) και

του αέρα (αιωρούμενα σωματίδια). Οι διεργασίες αυτές επηρεάζονται επίσης και από τις κλιματολογικές συνθήκες, όπως η ηλιοφάνεια, η υγρασία, ο άνεμος, η θερμοκρασία, το ποσοστό βροχόπτωσης, κ.α. Σημαντικό ρόλο βέβαια παίζουν και οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ίδιας της ουσίας όπως επίσης και η φαρμακοτεχνική της μορφή (υγρό, βρέξιμη σκόνη, γαλάκτωμα) και οι γεωργικές πρακτικές κατά την εφαρμογή.

Αναλυτικότερα, οι φυσικές ιδιότητες των φυτοφαρμάκων που επηρεάζουν τη συμπεριφορά στο περιβάλλον είναι η σχετική τους μοριακή μάζα, η διαλυτότητά τους στο νερό και η τάση ατμών τους (σταθερά Henry). Ενδεικτικά, ο συντελεστής οργανικού άνθρακα K_{oc} είναι ένα μέτρο της κατανομής μιας ένωσης μεταξύ του οργανικού άνθρακα των εδαφών και του νερού και ο συντελεστής οκτανόλης/νερού K_{ow} , αντίστοιχα, είναι μέτρο της κατανομής μιας ένωσης μεταξύ ενός οργανικού διαλύτη (οκτανόλη) και του νερού καθώς και της λιποφιλικότητάς της. Μεγάλες τιμές K_{oc} , σχετίζονται με σημαντική προσρόφηση μιας ουσίας στην οργανική ύλη του εδάφους ή των αιωρούμενων σωματιδίων, επηρεάζοντας έτσι και άλλες διεργασίες μεταφοράς ή διάσπασης των οργανικών μορίων όπως η βιοδιάσπαση, η έκπλυση κ.α., ενώ μικρές τιμές K_{ow} ευνοούν την έκπλυση μιας ουσίας προς τα υδάτινα συστήματα [33].

Οι κύριοι μηχανισμοί μέσω των οποίων ένα φυτοφάρμακο μπορεί να μεταναστεύει μεταξύ διαφορετικών στοιχείων του περιβάλλοντος είναι : α) η προσρόφηση (adsorption), β) η έκπλυση (leaching), γ) η επιφανειακή απορροή (runoff), δ) η εξάτμιση (volatilization) και ε) η πρόσληψη (uptake) [32]. Ως προσρόφηση θεωρείται η διαδικασία αλληλεπίδρασης ενός φυτοφαρμάκου με τα σωματίδια του χώματος η οποία είναι καθοριστική για την τύχη ενός φυτοφαρμάκου στο περιβάλλον και εξαρτάται από παράγοντες όπως η σύσταση του εδάφους, το μέγεθος των σωματιδίων, τα ποσοστά



Εικόνα 5: Σχηματική αναπαράσταση των κύριων διεργασιών που επηρεάζουν την τύχη ενός φυτοφαρμάκου στο περιβάλλον. Αναπροσαρμογή από [32, 34].

υγρασίας και οργανικής ύλης αλλά και από φυσικοχημικές ιδιότητες της ίδιας της ουσίας όπως το μοριακό βάρος και η υδατοδιαλυτότητα. Ισχυρή προσρόφηση ενός φυτοφαρμάκου στο έδαφος ευνοεί τη βιοαποικοδόμησή του, ενώ ασθενής ευνοεί την παραμονή του στις επιφανειακές στοιβάδες του χώματος και την έκπλυσή του από το βρόχινο ή αρδευσιμο νερό. Η επιφανειακή απορροή καθορίζει την κίνηση του νερού σε μια επικλινή επιφάνεια και συμβαίνει όταν το νερό προσπίπτει πάνω στην επιφάνεια με μεγαλύτερο ρυθμό από αυτόν που απορροφάται από το χώμα. Το μεγαλύτερο ποσοστό επιμόλυνσης επιφανειακών υδάτων οφείλεται σε αυτό το φαινόμενο το οποίο εξαρτάται από παραμέτρους όπως το είδος του εδάφους, η διαβρωσιμότητά του, η ποσότητα και η χρονική διάρκεια της βροχόπτωσης/άρδευσης κ.α. Η έκπλυση διαφοροποιείται από την επιφανειακή απορροή στο γεγονός ότι το φυτοφάρμακο μεταναστεύει με το νερό διαμέσου των πόρων του εδάφους κινούμενο είτε ταχέως με επιλεκτική ροή (preferential flow) παρακάμπτοντας μεγάλα τμήματα χώματος, μειώνοντας τις πιθανότητες προσρόφησης ή βιοαποικοδόμησής του, είτε λιγότερο αργά διαμέσου των δομών του χώματος κάνοντάς το πιο διαθέσιμο για αλληλεπίδραση με τα σωματίδια του εδάφους. Μέσω του φαινομένου της έκπλυσης ένα

φυτοφάρμακο μπορεί να φτάσει στον υδροφόρο ορίζοντα και να μολύνει τα υπόγεια ύδατα [32-34].

1.2.5 Επιπτώσεις φυτοφαρμάκων στον άνθρωπο & στο περιβάλλον

Η έκθεση του ανθρώπου σε φυτοπροστατευτικά προϊόντα μπορεί να συμβεί κατά κύριο λόγο μέσω επαγγελματικής ενασχόλησης στο χώρο της γεωργίας ή κατανάλωσης τροφίμων ή νερού επιβαρυσμένων με υπολείμματα αυτών [35]. Η τοξική επίδραση μπορεί να είναι άμεση ή χρόνια ενώ οι κύριες οδοί προσπέλασης στον ανθρώπινο οργανισμό είναι μέσω του δέρματος, του στόματος, της αναπνευστικής οδού και των ματιών [36]. Για την εκτίμηση της τοξικότητας των χημικών ουσιών και ως εκ τούτου και των φυτοφαρμάκων έχουν καθιερωθεί μέσω τοξικολογικών μελετών αντιπροσωπευτικοί δείκτες, για κάθε μια οδό προσπέλασης όπως, η δόση στην οποία το 50% των πειραματόζων πεθαίνει, η οποία καλείται LD₅₀ (Lethal Dose 50% mg/kg πειραματόζου), ενώ ο WHO (World Health Organization) το 1990 όρισε δύο ακόμη δείκτες το NOEL και NOAEL (mg/kg πειραματόζου) (No-Observed Effect Level και No-Observed Adverse Effect Level) οι οποίοι αντιστοιχούν στη μέγιστη συγκέντρωση μιας ουσίας η οποία δεν προκαλεί αναγνωρίσιμες αλλαγές ή τοξικές επιδράσεις σε πειραματόζωα στα οποία έχει χορηγηθεί σε σχέση με τα πειραματόζωα στα οποία δεν έχει χορηγηθεί η ουσία. Με βάση αυτούς τους δείκτες καθορίζεται η μέγιστη ημερήσια επιτρεπόμενη δόση φυτοφαρμάκου που μπορεί να καταναλώσει ο άνθρωπος (Acceptable Daily Intake, ADI) [12]. Για τα φυτοφάρμακα της παρούσας διατριβής σύμφωνα με τη νέα ταξινόμηση του WHO το paraquat, με LD₅₀ 150 mg/kg, θεωρείται τοξικό τόσο σε περίπτωση κατάποσης όσο και για διαδερμική επαφή (κατηγορία 3), το atrazine, με LD₅₀ 2000 mg/kg, θεωρείται επιβλαβές (κατηγορία 4) και το glyphosate, με LD₅₀ 4320 mg/kg, θεωρείται πιθανώς επιβλαβές (κατηγορία 5) [37].

Πέραν από τις άμεσες τοξικές τους επιδράσεις, η χρόνια έκθεση σε φυτοφάρμακα έχει σχετιστεί με ασθένειες όπως ο καρκίνος, το άσθμα, ο διαβήτης τύπου 2, αιματολογικές ασθένειες, η νόσος Alzheimer, ενώ μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει σύνδεση με μείωση της ποιότητας των γνωστικών λειτουργιών όπως

η μνήμη και η λεκτική έκφραση καθώς και με αναπαραγωγικά προβλήματα [35, 36, 38]. Επίσης πρόσφατη μελέτη έδειξε ότι εκτός από τους εργαζόμενους στη γεωργία που έρχονται σε άμεση επαφή με οργανοφωσφορικές, οργανοχλωριωμένες ή πυρεθροειδείς ενώσεις υπάρχει σύνδεση με μειωμένη πνευμονική λειτουργία στο γενικό πληθυσμό λόγω έμμεσης έκθεσης [39]. Επιπλέον, σε μελέτη των Mathieu Valcke et al. [40], όπου διερευνήθηκε η εκτίμηση κινδύνου ανάπτυξης καρκίνου λόγω της κατανάλωσης φρούτων και λαχανικών με υπολείμματα φυτοφαρμάκων, καταδεικνύεται ότι ο κίνδυνος δεν είναι αμελητέος παρά τις ευεργετικές ιδιότητες των συγκεκριμένων τροφίμων και συστήνεται η υιοθέτηση εναλλακτικών τρόπων ελέγχου των εχθρών των φυτών [40]. Οι μοριακοί μηχανισμοί των αρνητικών επιδράσεων των φυτοφαρμάκων στον ανθρώπινο οργανισμό οφείλονται κατά κύριο λόγο στο γεγονός ότι οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι ενδοκρινικοί διαταρράκτες, μπορεί να προκαλέσουν τη δημιουργία ελευθέρων ριζών επιδρώντας τόσο σε κυτταρικό όσο και σε επίπεδο DNA, ενώ η νευροτοξική τους δράση οφείλεται κατά πλειοψηφία στην εμπλοκή τους με κανάλια ιόντων των νευρικών κυττάρων [35, 41]. Αξίζει να αναφερθεί ακόμη ότι έρευνες μελετούν επίσης τις επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στους συμβιωτικούς με τον ανθρώπινο οργανισμούς και συγκεκριμένα στα βακτήρια που αποτελούν τη μικροχλωρίδα τους εντέρου [42].

Οι επιπτώσεις των φυτοφαρμάκων στο περιβάλλον σχετίζονται επίσης με την απορρόφησή τους από διάφορους ζωικούς οργανισμούς όπως αμφίβια, πουλιά, ψάρια και τις χρόνιες τοξικές επιδράσεις τους σε αυτά, οι οποίες δεν διαφέρουν από αυτές που παρατηρούνται για τον ανθρώπινο οργανισμό, ενώ σημαντικό πρόβλημα είναι το φαινόμενο της βιοσυσσώρευσης ορισμένων λιπόφιλων φυτοφαρμάκων σε ανώτερα θηλαστικά και οι αρνητικές επιπτώσεις κυρίως εντομοκτόνων σε επικονιαστές όπως οι μέλισσες [43].

Πιο συγκεκριμένα το ζιζανιοκτόνο atrazine είναι ένας ενδοκρινικός διαταρράκτης ο οποίος επηρεάζει τη λειτουργία των ορμονών που συνδέονται με το αναπαραγωγικό σύστημα. Μελέτη που διεξήχθη το 2011 σε γυναίκες που διέμεναν σε αγροτικές περιοχές της πόλης Illinois, όπου το atrazine χρησιμοποιείται σε μεγάλο βαθμό, και εκτίθενται σε αυτό μέσω του δικτύου του πόσιμου νερού δικτύου κατέδειξε την άμεση σύνδεση της χρόνιας έκθεσης σε

atrazine με ανωμαλίες στη χρονική διάρκεια μεταξύ των έμμηων ρύσεων, μείωση των επιπέδων της ωχρινοτρόπου ορμόνης στα διάφορα στάδια του κύκλου και αύξηση της χρονικής διάρκειας της ωοθυλακικής φάσης [44]. Σε άρθρο ανασκόπησης των Tyrone B. Hayes et al. [45], το οποίο κατατάσσει τα φυτοφάρμακα βάσει βιβλιογραφικών δεδομένων σύμφωνα με τα εννέα κριτήρια του Hill, καταδεικνύεται ότι το atrazine προκαλεί θηλυκοποίηση των αρσενικών μελών σε πολλές τάξεις σπονδυλωτών όπως τα αμφίβια, τα ψάρια, τα ερπετά και ορισμένα πτηνά. Η χρόνια έκθεση στο ζιζανιοκτόνο paraquat έχει αποδειχθεί, τόσο από επιδημιολογικές όσο και από μελέτες σε μοντέλα ζώων, ότι συνδέεται με συμπτώματα που ομοιάζουν αυτά της νόσου Parkinson καθώς το μόριο του paraquat μπορεί να περάσει τον αιματοεγκεφαλικό φραγμό και να συσσωρευτεί σε περιοχές του εγκεφάλου που σχετίζονται με τη συγκεκριμένη νόσο [46, 47]. Τέλος όσον αφορά το glyphosate φαίνεται ότι η άμεση τοξικότητά του είναι χαμηλή και εξαρτάται κυρίως από τη φαρμακοτεχνική μορφή του σκευάσματος και συγκεκριμένα από την παρουσία ορισμένων επιφανειοδραστικών ουσιών όπως η POEA (polyethoxylated tallow amine) [48]. Η κατασκευάστρια εταιρία, η οποία είχε τον έλεγχο της πατέντας έως και το 2000, διατείνετο πως λόγω της εξειδικευμένης δράσης του glyphosate στα φυτά καμία δυσμενής επίδραση δεν αναμένεται στον άνθρωπο, παραταύτα επιδημιολογικές μελέτες και μελέτες σε ζώα ή κυτταρικές σειρές φέρνουν στο φως όλο και περισσότερες ενδείξεις ότι το glyphosate πιθανώς συνδέεται με θραύσεις της διπλής έλικας DNA [49] και με πιθανή ενδοκρινική διαταραχή η οποία μπορεί να συνδέεται με την ανάπτυξη καρκίνου [50, 51]. Μάλιστα μόλις στις αρχές του 2019 υπήρξαν δύο περιπτώσεις αγροτών οι οποίοι πάσχουν από λέμφωμα non-Hodgkin και οι οποίοι για πολλά συναπτά έτη έκαναν χρήση στα χωράφια τους σκευασμάτων με glyphosate και έλαβαν αποζημίωση από την εταιρεία μετά από προσφυγή στη δικαιοσύνη [52]. Η εφαρμογή μεγάλων ποσοτήτων glyphosate στον αγρό σε παγκόσμιο επίπεδο και η αύξηση της πιθανότητας έκθεσης του γενικού πληθυσμού έχει προβληματίσει τη διεθνή κοινότητα και σήμερα εντείνονται οι έρευνες σχετικά με τη χρόνια τοξικότητα του glyphosate [53].

1.3 Νομοθεσία-Υπολείμματα φυτοφαρμάκων-Ποιότητα πόσιμου νερού

Με στόχο τη διασφάλιση της καταλληλότητας τροφίμων και πόσιμου νερού για ανθρώπινη κατανάλωση, διεθνείς και εθνικοί φορείς έχουν επιβάλλει μέγιστα επιτρεπτά όρια (MRLs, Maximum Residue Levels) για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων τόσο σε νωπά ή επεξεργασμένα προϊόντα φυτικής προέλευσης όσο και στο πόσιμο ή επιφανειακό νερό. Το όριο αυτό, συνιστά τη μέγιστη ποσότητα υπολείμματος φυτοφαρμάκου ή μεταβολίτη αυτού η οποία αναμένεται σε ένα προϊόν εφόσον κατά τη χρήση του φυτοπροστατευτικού σκευάσματος ακολουθήθηκαν οι αρχές της καλής γεωργικής πρακτικής.

Σύμφωνα με τον ορισμό της IUPAC, MRL είναι η μέγιστη συγκέντρωση υπολείμματος η οποία είναι νομικά επιτρεπτή ή αναγνωρίζεται ως αποδεκτή πάνω σε ή μέσα σε τρόφιμο ή γεωργικό προϊόν όπως αυτό έχει οριστεί είτε από τον Επιτροπή Τροφίμων (Codex Alimentarius Commission, CAC) είτε από άλλη εθνική ρυθμιστική αρχή [54]. Επί της ουσίας, τα μέγιστα επιτρεπτά όρια καθορίζονται βάσει ελεγχόμενων δοκιμών υπολειμμάτων στον αγρό και με χρήση κατάλληλων μοντέλων κατανάλωσης τροφίμων και δεδομένων τοξικολογικών μελετών τα οποία καθορίζουν ένα επιτρεπτό ημερήσιο όριο κατανάλωσης (Acceptable Daily Intake, ADI) [55]. Για φυτοφάρμακα τα οποία δεν χρησιμοποιούνται πλέον ή έχουν απαγορευτεί διεθνώς, π.χ. για τα aldrin, DDT, heptachlor, έχουν ορισθεί επίσης εξωγενή μέγιστα όρια υπολειμμάτων (Extraneous MRL, EMRL) τα οποία αντιστοιχούν στη μέγιστη συγκέντρωση φυτοφαρμάκου που μπορεί να προέρχονται από κάποια περιβαλλοντική πηγή και τα οποία ισχύουν και στα τρόφιμα και το νερό.

Σε διεθνές επίπεδο, για πρώτη φορά το 1966 ο φορέας CAC, ο οποίος είναι αποτέλεσμα της συντονισμένης δράσης του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας (World Health Organisation, WHO) και του Διεθνούς Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (Food Agricultural Organization, FAO), μέσω του συμβουλίου του για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων (Codex Committee on Pesticide Residues, CCPR), εγκαθίδρυσε διεθνή πρότυπα για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση η πρώτη νομοθέτηση για τα φυτοφάρμακα χρονολογείται από το 1976 με την Οδηγία του Ευρωπαϊκού Συμβουλίου 76/895/EC μέσω της οποίας τίθεντο τα μέγιστα όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων πάνω ή μέσα σε τρόφιμα

φυτικής προέλευσης [12]. Έκτοτε, πληθώρα κανονισμών και οδηγιών έχουν τεθεί σε εφαρμογή σε μια προσπάθεια εναρμόνισης των γεωργικών πρακτικών με τα νέα επιστημονικά δεδομένα. Στο πλαίσιο αυτό, το 2006 υιοθετήθηκε η στρατηγική για τη βιώσιμη χρήση των φυτοφαρμάκων με στόχο τον περιορισμό της χρήσης τους εντός της κοινότητας ώστε να μειωθεί ο κίνδυνος έκθεσης και οι ανεπιθύμητες ενέργειες στον άνθρωπο και το περιβάλλον. Η στρατηγική αυτή ολοκληρώθηκε με την οδηγία 2009/128/EC, η οποία θεσπίζει το πλαίσιο για την επίτευξη ορθολογικής χρήσης των γεωργικών φαρμάκων, και την προώθηση της χρησιμοποίησης ολοκληρωμένης φυτοπροστασίας (IPM, Integrated Pest Management) και εναλλακτικών προσεγγίσεων ή τεχνικών, όπως οι μη χημικές εναλλακτικές λύσεις αντί των γεωργικών φαρμάκων [56].

Φυσικά, όρια για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων υπάρχουν και στο πόσιμο νερό τα οποία κυρίως στοχεύουν στην προστασία της ασφάλειας των πολιτών. Ο WHO τακτικά εκδίδει οδηγίες που αφορούν στην ποιότητα του νερού συμπεριλαμβανομένων και των ορίων για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Οι οδηγίες αυτές είναι συμβουλευτικής φύσης και προκύπτουν από τον συνδυασμό αξιολογήσεων άλλων φορέων όπως του IPCS (International Program on Chemical Safety), JMPR (Joint FAO/WHO on Pesticide Residues) και του IARC (International Agency for Research on Cancer. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση τα κύρια νομοθετικά κείμενα για την ποιότητα του νερού είναι η οδηγία 2000/60/EK (Water Framework Directive) μέσω της οποίας θεσπίζεται το πλαίσιο της κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων και η οποία αναμένεται να συμβάλλει στην εξασφάλιση επαρκούς παροχής επιφανειακού και υπόγειου νερού καλής ποιότητας, στη σημαντική μείωση της ρύπανσης των υπόγειων υδάτων, στην προστασία των χωρικών και θαλάσσιων υδάτων και στην επίτευξη στόχων για την πρόληψη και εξάλειψη της ρύπανσης του θαλάσσιου περιβάλλοντος [57]. Ως συνέχεια της προηγούμενης οδηγίας και των απαιτήσεων του Άρθρου 17 αυτής ακολούθησε η οδηγία 2006/118/EK η οποία περιέχει άρθρα σχετικά με την προστασία των υπόγειων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση [58]. Ειδικά για το πόσιμο νερό είναι σε ισχύ η οδηγία 98/83/EK η οποία αφορά στην ποιότητα του νερού το οποίο προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Αντικείμενο της συγκεκριμένης οδηγίας είναι η προστασία της

ανθρώπινης υγείας από δυσμενής επιπτώσεις, από οποιαδήποτε ρύπανση ή μόλυνση του πόσιμου νερού. Συνολικά, εντός των άρθρων της οδηγίας, καθορίζονται 48 μικροβιολογικές, χημικές και άλλες παράμετροι οι οποίες πρέπει να παρακολουθούνται και να ελέγχονται σε τακτική βάση από τους υπεύθυνους φορείς των κρατών-μελών. Συγκεκριμένα για τα φυτοφάρμακα και τους μεταβολίτες τους η οδηγία 98/83/EK επισημαίνει ότι η συγκέντρωσή τους δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 0.1 µg/mL για κάθε ουσία μεμονωμένα και τα 0.5 µg/mL για το σύνολο των φυτοφαρμάκων [59]. Πρόσφατα, την 1^η Φεβρουαρίου 2018, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή ενέκρινε πρόταση για την αναδιτύπωση της οδηγίας 98/83/EK, η οποία στοχεύει στον εκσυγχρονισμό της ισχύουσας οδηγίας και είναι αποτέλεσμα της αξιολόγησης του REFIT (Regulatory Fitness and Performance Program) και της εφαρμογής της απόφασης της Επιτροπής στην πρωτοβουλία πολιτών «Right2Water».

Όσον αφορά τα ζιζανιοκτόνα που μελετώνται στην παρούσα διατριβή για δύο εξ' αυτών, τα atrazine και paraquat, έχει απαγορευτεί από το 2004 και το 2007 αντίστοιχα, η χρήση, παραγωγή και διακίνησή τους εντός Ευρωπαϊκής Ένωσης βάσει της απόφασης της Ευρωπαϊκής Επιτροπής 2004/248/EK και της ακύρωσης της Οδηγίας 2003/112/EK [60, 61]. Η παραγωγή και χρήση τους όμως συνεχίζεται σε χώρες με μεγάλη γεωργική παραγωγή όπως οι ΗΠΑ, Αυστραλία, Κίνα και Ινδία [18, 20] από τις οποίες εισάγεται πληθώρα τροφίμων νωπών ή συσκευασμένων στην Ευρώπη και για αυτό το λόγο συνεχίζουν να ανιχνεύονται και οι τιμές τους πρέπει να είναι χαμηλότερες από τα MRLs που έχουν θεσπιστεί για τα τρόφιμα και το νερό [62]. Σχετικά με το glyphosate, αυτή τη στιγμή βρίσκεται εν εξελίξει μια παγκόσμια διαμάχη καθώς το 2015 ο οργανισμός IARC (International Agency for Research on Cancer) ο οποίος βρίσκεται υπό την «ομπρέλα» του WHO, στη μονογραφία αριθμός 122 που δημοσίευσε, κατέταξε το glyphosate στην κατηγορία των «πιθανώς καρκινογόνων» ουσιών (2A) [63], ενώ η Ευρωπαϊκή Ένωση, με τη σύμφωνη γνώμη του οργανισμού EFSA [64], ανανέωσε την άδεια χρήσης φυτοπροστατευτικών προϊόντων που περιέχουν ως δραστική ουσία το glyphosate το Δεκέμβριο του 2017 για άλλα πέντε χρόνια έως το 2022 [65].

1.4 Παρουσία φυτοφαρμάκων σε επιφανειακό & πόσιμο νερό στην Ελλάδα και διεθνώς

Λόγω της ευρείας χρήσης φυτοφαρμάκων στην εγχώρια και παγκόσμια γεωργία η παρουσία τους είναι ολοένα αυξανόμενη τόσο από την άποψη της ποικιλομορφίας των δραστικών ουσιών που ανιχνεύονται όσο και των συγκεντρώσεων που προσδιορίζονται, σε υπόγεια ή επιφανειακά νερά και στο πόσιμο νερό ταμειυτήρων καθώς και στο χώμα, από όπου δυνητικά μπορεί να μολυνθούν τα υπόγεια και επιφανειακά νερά, αυξάνοντας τον κίνδυνο έκθεσης για τον άνθρωπο σε πόσιμο νερό ακατάλληλο για κατανάλωση. Στη συγκεκριμένη παράγραφο θα παρατεθεί βιβλιογραφία, δημοσιευμένη την τελευταία δεκαετία δηλαδή για το χρονικό διάστημα 2009-2019, που αφορά στην ανίχνευση των ζιζανιοκτόνων paraquat, atrazine και glyphosate σε χώμα και σε υπόγειο, επιφανειακό ή πόσιμο νερό.

Για τα paraquat & atrazine, αν και απαγορευμένα εντός Ευρωπαϊκής Ένωσης, υπάρχουν έρευνες που αποδεικνύουν ότι ακόμα και σήμερα ανιχνεύονται σε υπόγεια και επιφανειακά ύδατα. Συγκεκριμένα σε πανευρωπαϊκή μελέτη με πολλαπλά σημεία δειγματοληψίας υπόγειων υδάτων ανά την Ευρώπη, η οποία πραγματοποιήθηκε το φθινόπωρο του 2008, ανιχνεύτηκε atrazine σε συγκέντρωση μεγαλύτερη από 10 µg/mL σε 28 δείγματα, ενώ συνολικά η συχνότητα εμφάνισής του ήταν πάνω από 50%. Επίσης από μελέτη που πραγματοποιήθηκε στη Γαλλία το 2011, προέκυψαν στοιχεία για παρουσία του atrazine σε υπόγεια νερά αρκετά χρόνια μετά την απαγόρευσή του καθώς σε πάνω από 10% των δειγμάτων ανιχνεύθηκαν μεταβολίτες του atrazine [66]. Παρόμοια ευρήματα προέκυψαν από μελέτες επιφανειακών νερών σε χώρες με μεγάλη αγροτική παραγωγή όπως ο Καναδάς [67, 68], η Κίνα [69] και οι ΗΠΑ [70], ενώ στην Ελλάδα σε δημοσίευση των Z. Vryzas et al. [71], όπου μελετήθηκε η ύπαρξη υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων μεταξύ των οποίων και το atrazine για την περίοδο 1999-2007, με δειγματοληπτικές περιοχές κατά μήκος των ποταμών Άρδα, Έβρου, Ερυθροποτάμου, η συγκέντρωσή του κατά μέσο όρο ξεπερνούσε το MRL (0.1 ng/mL).

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Ο προσδιορισμός της ταυτότητας & της ποσότητας των φυτοφαρμάκων σε ένα δεδομένο δείγμα είναι ένα δύσκολο και πολύπλοκο αντικείμενο εξαιτίας της ανάγκης για απομόνωση, ακριβή ταυτοποίηση και ποσοτική ανίχνευση εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων συνήθως σε πολύπλοκες μήτρες δειγμάτων. Η έκδοση του “The Pesticide Manual” για το 2013 περιλαμβάνει 1000 δραστικές ενώσεις εκ των οποίων για περισσότερες από 500 υπάρχουν θεσμοθετημένα MRL βάση της ευρωπαϊκής νομοθεσίας. Ο μεγάλος αριθμός δραστικών ουσιών που είναι πιθανό να χρησιμοποιούνται στη γεωργία και οι νομοθετικές απαιτήσεις υπαγορεύουν την ανάπτυξη πολύ-υπολειμματικών μεθόδων για τη σάρωση πολλαπλών δειγμάτων νερού και τροφίμων, οι οποίες να μπορούν να παρέχουν ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες ταυτόχρονα για πολλές ουσίες. Διεθνής και εθνικές αρχές με σκοπό να διευκολύνουν τα επίσημα και μη εργαστήρια ελέγχου υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων ώστε να διεξάγουν αποτελεσματικές αναλύσεις έχουν εκδώσει οδηγίες με λεπτομερείς περιγραφές αναλυτικών μεθόδων για τον έλεγχο δειγμάτων τροφίμων και περιβαλλοντικών δειγμάτων. Συγκεκριμένα οι νομοθεσίες τόσο στην Ευρωπαϊκή Ένωση (Sante Document [72]) όσο και στις Η.Π.Α. (FDA, PAM [73]) ορίζουν ως μεθόδους αναφοράς χρωματογραφικές μεθόδους συζευγμένες με φασματομετρία μαζών ή δίδυμη φασματομετρία μαζών. Στο υποκεφάλαιο 2.2 θα δοθούν πληροφορίες σχετικά με τις κλασσικές μεθόδους για τον έλεγχο υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και στο 2.3 θα αναφερθούν οι εφαρμογές των βιοαισθητήρων, ενώ στο υποκεφάλαιο 2.4 θα αναλυθεί αναλυτικά η αρχή λειτουργίας του οπτικού ανοσοαισθητήρα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.

2.2 Κλασσικές αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού φυτοφαρμάκων

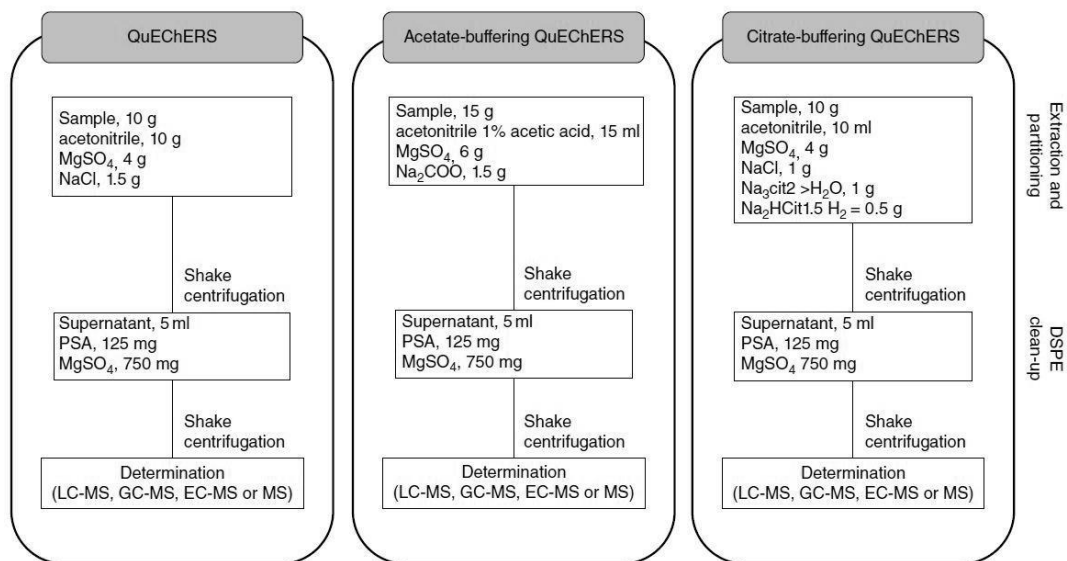
2.2.1 Χρωματογραφικές αναλυτικές μέθοδοι

Η υγρή και αέρια χρωματογραφία και ειδικότερα ο συνδυασμός τους με ανιχνευτές μάζας είναι οι πιο διαδεδομένες τεχνικές ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε εργαστηριακό επίπεδο παγκοσμίως τόσο σε νωπά ή συσκευασμένα τρόφιμα όσο και σε νερό, περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα. Κατά κύριο λόγο οι τεχνικές αυτές συνδυάζονται με φασματομετρία μάζας με στόχο την ανίχνευση πολλών διαφορετικών χημικών ουσιών σε ένα δείγμα. Ενδεικτικά παραδείγματα αποτελούν οι πρόσφατες δημοσιεύσεις των Z. He et al. [74], όπου αναφέρεται ο ταυτόχρονος προσδιορισμός 200 φυτοφαρμάκων σε δείγματα δημητριακών με ένα σύστημα αέριας χρωματογραφίας με αναλυτή μαζών τριπλού τετραπόλου και των Jonghwa Lee et al. [75] όπου ανιχνεύονται 300 ουσίες σε δείγματα ρυζιού, το σπανακιού και πορτοκαλιών με ένα σύστημα UPLC αντίστροφης φάσης συζευγμένο με ανιχνευτή μαζών τριπλού τετραπόλου.

Η φασματομετρία μαζών είναι μια τεχνική προσδιορισμού της δομής και της ποσότητας ενώσεων και στοιχείων η οποία βασίζεται στον ιοντισμό ατόμων ή μορίων ή στην παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχετικής έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο (m/z). Περιληπτικά, η αρχή λειτουργίας ενός φασματόμετρου μάζας έχει ως εξής: αρχικά στην πηγή ιοντισμού παράγεται ένα ρεύμα ιόντων στην αέρια φάση το οποίο στη συνέχεια κατευθύνεται στον αναλυτή μαζών όπου τα ιόντα διαχωρίζονται υπό κενό (ώστε να αποφεύγονται συγκρούσεις των διαχωριζόμενων ιόντων με οποιαδήποτε άλλη μορφή ύλης) ανάλογα με τις τιμές m/z . Το πιο σημαντικό στοιχείο ενός φασματόμετρου μάζας είναι ο αναλυτής μαζών ο οποίος χαρακτηρίζεται από τη διακριτική ικανότητα (resolution, R), μέγεθος το οποίο προσδιορίζεται από τον τύπο $R = m/\Delta m$ όπου Δm το πλάτος στο ήμισυ του ύψους της κορυφής (Full Width at Half Maximum) για κάθε μάζα m . Ο πιο διαδεδομένος αναλυτής μαζών είναι το τετράπολο, οι αναλυτές χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF), οι παγίδες ιόντων (Ion Trap, IT), κ.α. Σήμερα η πλειοψηφία των οργάνων βασίζεται στη φασματομετρία μαζών σε σειρά (tandem MS) κατά την οποία δύο και πλέον αναλυτές μαζών συνδέονται με σκοπό τον

διαχωρισμό των μαζών των αναλυόμενων ενώσεων, την απομόνωση της ένωσης που ενδιαφέρει, τη διάσπασή της σε θραύσματα και τέλος τη σάρωση και τον προσδιορισμό της μάζας των θραυσμάτων [76].

Η μεγαλύτερη δυσκολία στην ανάλυση των φυτοφαρμάκων με φασματομετρία μαζών είναι η προκατεργασία του δείγματος και παρόλο που οι τεχνολογικές εξελίξεις στην τεχνική αυτή έχουν επιτρέψει τον περιορισμό της προκατεργασίας των δειγμάτων αυτή δεν έχει εξαλειφθεί τελείως. Η προκατεργασία των δειγμάτων κρίνεται απαραίτητη καθώς αυξάνει την εκλεκτικότητα και μειώνει την επίδραση της μήτρας ώστε να αποφεύγονται επιβλαβείς επιπτώσεις στα όργανα όπως φράξιμο των εκνεφωτών στις πηγές ιονισμού και μη αντιστρεπτή κατακράτηση ουσιών στις χρωματογραφικές στήλες. Όλες οι μέθοδοι προκατεργασίας βασίζονται εν ολίγοις στην κατανομή των φυτοφαρμάκων μεταξύ του δείγματος και ενός υγρού διαλύτη ή προσροφητικού υλικού ενώ δεν υπάρχει μια γενικευμένη μέθοδος κατεργασίας καθώς αυτή εξαρτάται από το είδος της μήτρας του δείγματος, την πολικότητα των στοχευόμενων ουσιών και τη μέθοδο ανάλυσης. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η εκχύλιση υγρό-υγρό (Liquid Liquid Extraction, LLE), η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (Matrix Solid Phase Dispersion, MSPD) και η ιδιαίτερος διαδεδομένη QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe). Πιο αναλυτικά, η μέθοδος QuEChERS περιλαμβάνει αρχικά την εκχύλιση του δείγματος με χρήση οργανικού διαλύτη, συνήθως ακετονιτριλίου, και ταυτόχρονα την υγρό-υγρό κατανομή των εκχυλιζόμενων ουσιών παρουσία μεγάλων ποσοτήτων αλάτων όπως άνυδρο $MgSO_4$ και $NaCl$ και ρύθμιση του pH με ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών (pH 5.5) ή οξικών (pH 4.8). Ακολούθως το δείγμα ανακινείται, φυγοκεντρείται και το υπερκείμενο υγρό υπόκειται σε περαιτέρω καθαρισμό με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dispersive solid phase extraction, dSPE). Στη dSPE προστίθενται στο δείγμα μια μικρή ποσότητα προσροφητικής ουσίας (PSA, Primary Secondary Amine) και άνυδρο θειικό μαγνήσιο διευκολύνοντας την απομάκρυνση συστατικών της μήτρας και της περίσσειας νερού ενώ το υπερκείμενο συλλέγεται και υποβάλλεται σε ανάλυση.



Εικόνα 6: Σχηματική αναπαράσταση των πιο συχνά χρησιμοποιούμενων μεθόδων QuEChERS [77].

Η σύγχρονη τάση στις τεχνικές προκατεργασίας είναι οι τεχνικές μικροεκχύλισης (microextraction) οι οποίες είναι εύκολες στη χρήση, με μικρούς χρόνους επεξεργασίας και υψηλούς συντελεστές εμπλουτισμού, ελάχιστη ή και καθόλου χρήση διαλυτών με προοπτικές αυτοματισμού και δυνατότητα εφαρμογής σε αέρια, υγρά και στερεά δείγματα. Παραδείγματα τέτοιων τεχνικών αποτελούν η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Microextraction, SPME), η οποία είναι μια διαδικασία που πραγματοποιείται χωρίς τη χρήση διαλύτη και κατά την οποία αναλύτης προσροφάται πάνω σε ένα καλυμμένη με ένα προσροφητικό υλικό και εκροφάται απευθείας στο χρωματογραφικό σύστημα ή στο φασματοφωτόμετρο, και η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (Liquid Phase Microextraction, LPME) κατά την οποία χρησιμοποιείται ελάχιστη ποσότητα του διαλύτη (μερικά μικρόλιτρα) αλλά και όγκος δείγματος [77].

Όσον αφορά τα φυτοφάρμακα της παρούσας εργασίας τα paraquat και glyphosate δεν μπορούν να ενταχθούν εύκολα σε πολυ-υπολειμματικές μεθόδους εν αντιθέσει με το atrazine [78]. Αυτό οφείλεται στο ότι είναι πολικά μόρια οπότε οι συνήθεις τεχνικές προκατεργασίας του δείγματος για τις συγκεκριμένες μεθόδους οδηγούν σε χαμηλές ανακτήσεις ενώ, ο χρωματογραφικός τους διαχωρισμός από ουσίες της μήτρας ή άλλους ισοβαρείς αναλύτες ή μεταβολίτες

είναι δύσκολος στις συνήθεις συνθήκες διαχωρισμού των πολυ-υπολειμματικών μεθόδων (C18 στήλες, πολικές κινητές φάσεις) και τέλος ο ιονισμός τους στις πηγές ιονισμού των φασματογράφων μάζας δυσχεραίνεται λόγω της υψηλότερης ενέργειας ιονισμού που απαιτείται.

Εξαιτίας των προαναφερθέντων η πλειοψηφία των μεθόδων που αναφέρονται στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό του glyphosate προϋποθέτουν την παραγωγοποίηση του αναλύτη πριν ή μετά τη χρωματογραφική ανάλυση [79]. Για τον προσδιορισμό του glyphosate με υγρή χρωματογραφία έχουν χρησιμοποιηθεί ανιχνευτές ορατού/υπεριώδους και φθορισμομετρικοί ανιχνευτές ενώ η πιο διαδεδομένη μέθοδος παραγωγοποίησης είναι πριν από τον χρωματογραφικό διαχωρισμό με το αντιδραστήριο Fluorenylmethyloxycarbonyl chloride (FMOC) μέσω αντίδρασης με τη δευτεροταγή αμινομάδα του glyphosate [80, 81]. Οι μέθοδοι αυτές παρουσιάζουν σχετικά ικανοποιητική ευαισθησία, π.χ στην εργασία των Lisi Sun et al. το όριο ανίχνευσης ήταν 0.01 mg/kg, αν και υπόκειται σε περιορισμούς. Για παράδειγμα, η συγκέντρωση του glyphosate μπορεί να υποεκτιμηθεί σε δείγματα με υψηλή συγκέντρωση σε πολυσθενή κατιόντα μετάλλων όπως Fe^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} λόγω χηλικής δεσμευσής τους από το glyphosate [82] ενώ η διαδικασία της παραγωγοποίησης αυξάνει την πολυπλοκότητα και τον χρόνο προκατεργασίας των δειγμάτων. Η παραγωγοποίηση του glyphosate με FMOC ή άλλα αντιδραστήρια έχει συνδυαστεί και με χρωματογραφικά συστήματα συζευγμένα με αναλυτές μαζών, όπως π.χ. στο άρθρο των L. D. Demonte et al. [83] οι οποίοι ανιχνεύουν το glyphosate σε νερό με ένα σύστημα UPLC/MSMS έπειτα από παραγωγοποίηση επιτυγχάνοντας όριο ανίχνευσης τα 0.2 $\mu\text{g/mL}$. Υγροχρωματογραφικά το glyphosate προσδιορίζεται και με ιοντική χρωματογραφία (Ion Chromatography, IC) ή χρωματογραφία κατανομής με στήλες υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography, HILIC) σε συνδυασμό με ανιχνευτές διαφορετικών τύπων. Πιο αναλυτικά, για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό του glyphosate έχει συνδυαστεί ιοντική χρωματογραφία, η οποία βασίζεται σε κατιοανταλλακτικές ρητίνες, με φθορισμομετρικό ανιχνευτή [84] έχοντας όριο ανίχνευσης τα 0.2 $\mu\text{g/mL}$ και ανιχνευτές αγωγιμότητας [85, 86] με το όριο ανίχνευσης της μεθόδου στην

εργασία των Dimitrakopoulos et al. να είναι 0.54 µg/mL σε νερό [85]. Πρόσφατα, ιοντική χρωματογραφία συζευγμένη με αναλυτές μαζών και πιο συγκεκριμένα με ανιχνευτή παγίδας ιόντων εφαρμόστηκε για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό του glyphosate και άλλων πολικών φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά [87]. Όσον αφορά τη χρωματογραφία HILIC έχει βρει ευρεία εφαρμογή για τον προσδιορισμό του glyphosate σε φρούτα/λαχανικά, σε δημητριακά και σε ορό αίματος είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό με άλλα πολικά φυτοφάρμακα χρησιμοποιώντας πηγές ιόντων τύπου ηλεκτροψεκασμού κυρίως σε αρνητική λειτουργία (Electrospray Ionisation, ESI) και φασματογράφο μάζας διπλών τετραπόλων εφαρμόζοντας διάφορα πρωτόκολλα προκατεργασίας των δειγμάτων [88-90]. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι η χρωματογραφία υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων είναι μια παραλλαγή της χρωματογραφίας κανονικής φάσης στην οποία χρησιμοποιούνται υδρόφιλες στατικές φάσεις σε συνδυασμό με διαλύτες έκλουσης αντίστροφης φάσης όπως ακετονιτρίλιο ή τετραϋδροφουράνιο και κατά την οποία οι αναλύτες εκλούνται κατά σειρά αυξανόμενης πολικότητας.

Αντιστοίχως για το ζιζανιοκτόνο paraquat έχουν αναπτυχθεί χρωματογραφικές μέθοδοι προσδιορισμού κυρίως σε βιολογικά δείγματα όπως πλάσμα, ούρα και μηκόνιο [91-93] αλλά και σε δημητριακά και λαχανικά είτε με υγρή είτε με αέρια χρωματογραφία. Πιο αναλυτικά, έχουν αναπτυχθεί υγροχρωματογραφικές μέθοδοι που βασίζονται στη χρωματογραφία HILIC για τον προσδιορισμό του paraquat σε μαυρομάτικα φασόλια [94], σε εδώδιμα λαχανικά όπως μαρούλι, λάχανο, σπανάκι [95], σε πατάτα και κριθάρι [96]. Κοινό γνώρισμα όλων αυτών των μεθόδων είναι η χρήση δευτεριωμένου εσωτερικού προτύπου, η λειτουργία MRM του τριπλού τετραπόλου ή του Qtrap και η παρόμοια διαδικασία κατεργασίας του δείγματος η οποία περιελάμβανε εκχύλιση με νερό παρουσία HCl, επώαση σε υδατόλουτρο, φυγοκέντρηση και παραλαβή του υπερκείμενου υγρού. Τα όρια ποσοτικοποίησης αυτών των μεθόδων ήταν ικανοποιητικά και σε συμφωνία με τα MRL που έχει θέσει η Ε.Ε. για το paraquat ενώ ο χρωματογραφικός χρόνος ανάλυσης δεν υπερέβαινε τα 10 min.

Συμπερασματικά, οι χρωματογραφικές μέθοδοι σε συνδυασμό με τη φασματομετρία μάζας είναι ακριβείς και αξιόπιστες τεχνικές που έχουν βρει

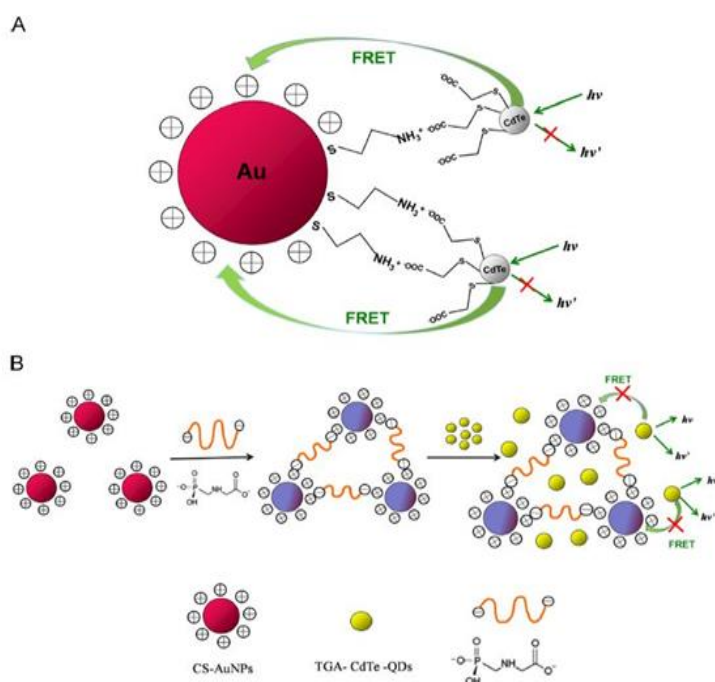
ευρεία εφαρμογή στην ανάπτυξη πολυ-υπολλειμματικών μεθόδων για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων. Παρόλα αυτά σε ορισμένες κατηγορίες φυτοφαρμάκων όπως το paraquat και το glyphosate επιβάλλεται η μεμονωμένη ανίχνευσή τους. Επιπλέον οι μέθοδοι αυτές παρά την ευρεία εφαρμογή τους προορίζονται αποκλειστικά για εφαρμογή εντός του χώρου κάποιου εργαστηρίου καθώς απαιτούν ογκώδη εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό για την διεξαγωγή των αναλύσεων, ενώ το απαραίτητο προ-παρασκευαστικό στάδιο αυξάνει τον συνολικό χρόνο και το κόστος της ανάλυσης.

2.2.2 Φασματοφωτομετρικές μέθοδοι

Οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές έχουν βρει μικρότερη εφαρμογή στην ανίχνευση των φυτοφαρμάκων συγκριτικά με τις χρωματογραφικές τεχνικές όπως προκύπτει από τη σχετική βιβλιογραφία. Στην μεγάλη τους πλειοψηφία βασίζονται στη χημική τροποποίηση του φυτοφαρμάκου με ένα χρωμοφόρο ή φθορίζων μόριο και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης ή της έντασης φθορισμού. Για τα φυτοφάρμακα της παρούσας εργασίας έχουν δημοσιευτεί εργασίες που αφορούν τον φασματοφωτομετρικό προσδιορισμό τους. Συγκεκριμένα για την ομάδα των τριαζινών, στην οποία ανήκει το atrazine, οι M. Muhammad et al. [97] προσδιόρισαν την ένταση φθορισμού σε μήκος κύματος 330 & 376 nm μετά από παραγωγοποίηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων με 2-κυανοακεταμίδιο. Το όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου LOQ της μεθόδου για το atrazine ήταν 0.23 ng/mL. Για το paraquat έχει αναπτυχθεί μέθοδος ποσοτικού προσδιορισμού μέσω μέτρησης της μείωσης της έντασης φθορισμού του συμπλέγματος Cucurbit[7]uril-Coptisine παρουσία του αναλύτη (λ_{em} 522nm, λ_{ex} 358 nm), επιτυγχάνοντας όριο ανίχνευσης 0.86 ng/mL [98]. Για το glyphosate, οι M. Rasul Jan et al. [99] ανέπτυξαν φωτομετρική μέθοδο με μέτρηση της απορρόφησης (λ 435 nm) ενός συμπλόκου του Cu^{2+} με glyphosate το οποίο είχε προηγουμένως αντιδράσει με δισουλφίδιο του άνθρακα και το όριο ανίχνευσης της μεθόδου ήταν 1.1 μ g/mL [99].

Οι εξελίξεις στη νανοτεχνολογία έχουν δώσει νέα ώθηση σε αυτές τις τεχνικές καθώς τα τελευταία χρόνια υπάρχει πληθώρα αναφορών όπου το

φθορίζων μόριο έχει αντικατασταθεί με κβαντικές κουκίδες. Έτσι, οι Gema M. Durán et al. [100] χρησιμοποίησαν για την ανίχνευση του paraquat κβαντικές κουκίδες CdSe/ZnS (core-shell) στις οποίες η αρχική υδρόφοβη επιφανειακή στοιβάδα αντικαταστάθηκε με το υδρόφιλο αντιδραστήριο 3-μερκαπτοπροπιονικό οξύ (3-MPA).



Εικόνα 7: Σχηματική αναπαράσταση (A) του φαινομένου FRET μεταξύ των τροποποιημένων με θειογλυκολικό οξύ (TGA) κβαντικών κηλίδων CdTeQDs και των τροποποιημένων με κυστεαμίνη νανοσωματιδίων χρυσού AuNPs και (B) αναστολή του φαινομένου FRET από το glyphosate και ανάκτηση του φθορισμού των QDs [101].

Η ανίχνευση βασιζόταν στο ότι παρουσία του αναλύτη παρατηρείτο μείωση της έντασης φθορισμού των κουκίδων (λ_{em} 596 nm, λ_{ex} 350 nm) επιτυγχάνοντας LOD 0.003 ng/mL [100]. Επίσης, οι Hongxia LI et al. [102] ανίχνευσαν το paraquat με όριο ανίχνευσης 0.01 $\mu\text{g/mL}$ χρησιμοποιώντας κβαντικές κουκίδες CdS τροποποιημένες με γλουταθειόνη. Όσον αφορά την ανίχνευση του glyphosate πρόσφατες δημοσιεύσεις αναφέρουν τη χρήση κβαντικών κουκίδων σε συνδυασμό με κατάλληλα τροποποιημένα νανοσωματίδια χρυσού ή αργύρου. Η ένταση φθορισμού των κβαντικών κουκίδων μειώνεται

λόγω της παρουσίας των νανοσωματιδίων (φαινόμενο Förster Resonance Energy Transfer, FRET) αλλά, επανέρχεται παρουσία glyphosate το οποίο προσδεδεμένο στην επιφάνεια των νανοσωματιδίων προκαλεί τη συσσωμάτωσή τους εμποδίζοντας την απορρόφηση της ακτινοβολίας των κβαντικών κουκίδων [101, 103]. Τα όρια ανίχνευσης για το glyphosate που επιτεύχθηκαν με τις μεθόδους αυτές ήταν 9.8 ng/kg [101] και 12 ng/mL [103], ενώ σε δημοσίευση των Yusheng Yuan et al. [104] όπου το glyphosate μειώνει την ένταση φθορισμού των κβαντικών κουκίδων το όριο ανίχνευσης που επιτεύχθη ήταν τα 0.6 mol/L [104].

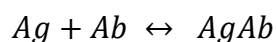
2.2.3 Ανοσοχημικοί προσδιορισμοί

Οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί είναι μια κατηγορία δεσμευτικών προσδιορισμών οι οποίοι χρησιμοποιούν αντισώματα (antibody, Ab) ως αντιδραστήρια μοριακής αναγνώρισης για να επιτύχουν ειδική δέσμευση αναλυτών των οποίων η ποσοτικοποίηση βασίζεται στον προσδιορισμό της κατανομής τους μεταξύ της ελεύθερης και της δεσμευμένης «φάσης».

Τα αντισώματα είναι γλυκοπρωτεΐνες που ανήκουν στη μεγάλη υπεροικογένεια των ανοσοσφαιρινών (Immunoglobulins, Ig) και κυρίως εκκρίνονται στο αίμα, από διαφοροποιημένα Β-λεμφοκυττάρια (πλασματοκύτταρα), έπειτα από την ανοσολογική απόκριση ενός οργανισμού έναντι ενός παθογόνου. Δομικά αποτελούνται από τέσσερις πεπτιδικές αλυσίδες, δύο πανομοιότυπες ελαφριές (L) και δύο πανομοιότυπες βαριές (H), οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με μη ομοιοπολικές δυνάμεις και δισουλφιδικούς δεσμούς, σχηματίζοντας ένα πρωτεϊνικό σύμπλεγμα σχήματος ύψιλον με μοριακό βάρος ~ 150 kDa και μέγεθος 10 nm. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 8 κάθε αλυσίδα αποτελείται από σταθερές (Constant, C) και μεταβλητές (Variable, V) περιοχές ενώ ο συνδυασμός μίας μεταβλητής περιοχής της ελαφριάς (V_L) και μίας της βαριάς αλυσίδας (V_H), σε κάθε κλάδο του ύψιλον σχήματος, σχηματίζουν τον παράτοπο (antigen binding fragment, Fab) την περιοχή δηλαδή του αντισώματος που είναι υπεύθυνη για την αναγνώριση του αντιγόνου (επίτοπος). Ως αντιγόνο (antigen, Ag) νοείται κάθε ουσία που συνδέεται ειδικά με ένα μόριο αντισώματος

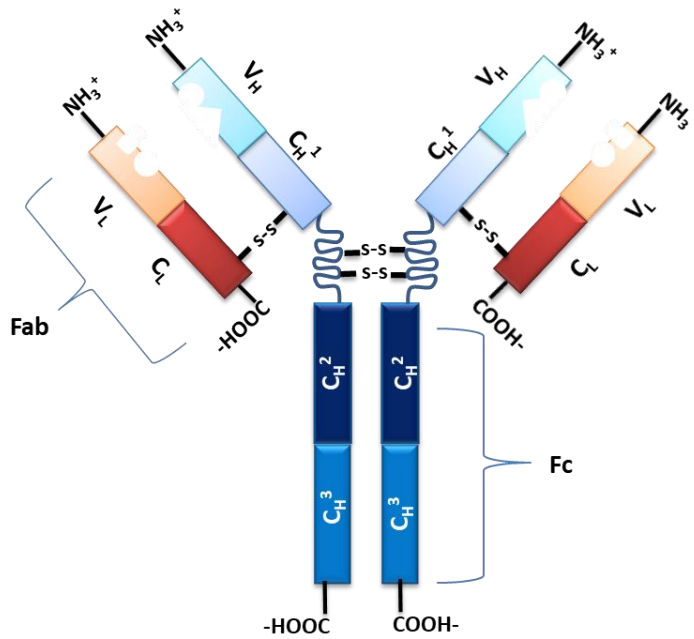
και μπορεί να αποτελέσει πιθανό στόχο της ανοσολογικής απόκρισης, ενώ ως ανοσογόνο (immunogen) καλείται εκείνο το αντιγόνο το οποίο επάγει, εν τέλει, ανοσολογική απόκριση. Η βάση του σχήματος ύψιλον η οποία ονομάζεται περιοχή F_c (fragment crystallizable region) ρυθμίζει την ενεργοποίηση του ανοσοποιητικού συστήματος δεσμευόμενη σε F_c υποδοχείς ορισμένων κυττάρων, όπως μακροφάγα, ουδετερόφιλα, T-κυτταροτοξικά κ.α., ή σε πρωτεΐνες του συμπληρώματος. Εντός του ίδιου οργανισμού και μεταξύ οργανισμών η περιοχή F_c δύναται να φέρει διαφορετικές βαριές αλυσίδες, οι οποίες διαφέρουν ως προς τον βιολογικό τους ρόλο, κατανέμοντας τα αντισώματα σε διαφορετικές τάξεις ή ισότυπους. Για τις βαριές αλυσίδες υπάρχουν πέντε ισότυποι που ονομάζονται α , μ , γ , δ και ϵ , από όπου προκύπτουν οι πέντε τάξεις των ανοσοσφαιρινών: IgA, IgM, IgG, IgD και IgE, αντίστοιχα, ενώ σε πουλιά και ερπετά έχει βρεθεί η ανοσοσφαιρίνη IgY [105].

Η δέσμευση των αντιγόνων στα αντισώματα γίνεται μέσω χωρικά συμπληρωματικών περιοχών του επιτόπου και παρατόπου οι οποίες έχουν σχέση κλειδιού-κλειδαριάς και παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση. Τα κατάλοιπα της Fab περιοχής του παρατόπου αλληλεπιδρούν με μη ομοιοπολικό τρόπο με το αντιγόνο μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων, υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου και δυνάμεων Van der Waals καθιστώντας τη σύνδεση αντιγόνου-αντισώματος αντιστρεπτή. Η επιλογή των αντισωμάτων ως αντιδραστήρια σε ανοσοχημικούς προσδιορισμούς γίνεται κυρίως με κριτήρια τη σταθερά σύνδεσής τους με το αντιγόνο και την εξειδίκευσή τους. Η σταθερά σύνδεσης ή συγγενείας K αντιγόνου (Ag) – αντισώματος (Ab) ορίζεται ως η σταθερά της χημικής ισορροπίας της αντιστρεπτής αντίδρασης



και συνδέεται με τις συγκεντρώσεις αντιδρώντων και προϊόντων στην κατάσταση ισορροπίας μέσω της ακόλουθης σχέσης :

$$K = \frac{[AgAb]}{[Ag][Ab]}$$



Εικόνα 8: Σχηματική απεικόνιση της δομής μιας ανοσοσφαιρίνης. Αναπροσαρμογή από [30].

Η εξειδίκευση ενός αντισώματος εκφράζει την ικανότητα του αντισώματος να αναγνωρίζει αποκλειστικά την προς προσδιορισμό ουσία. Μέτρο της εξειδίκευσης του ειδικού αντισώματος είναι η διασταυρούμενη δραστηριότητα (cross-reactivity) του αντισώματος με ουσίες παρεμφερούς δομής προς αυτή του αναλύτη [106]. Η % διασταυρούμενη δραστηριότητα ως προς ουσία A (CR_A), υπολογίζεται από τη σχέση:

$$\%CR_A = 100 \times \frac{(A_{50})}{(Ag_{50})}$$

όπου, A_{50} η συγκέντρωση της ουσίας A παρουσία της οποίας από το ειδικό αντίσωμα εκτοπίζεται το 50% του ιχνηθέτη και Ag_{50} η αντίστοιχη συγκέντρωση του αναλύτη.

Τα αντισώματα που χρησιμοποιούνται στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς διακρίνονται σε πολυκλωνικά και μονοκλωνικά. Η ανοσοποίηση ζώων για την παραγωγή πολυκλωνικών αντισωμάτων περιλαμβάνει ένεση του ανοσογόνου σε δόσεις κατά διαστήματα. Η ικανότητα μιας ουσίας να ενεργοποιεί το ανοσοποιητικό σύστημα ενός οργανισμού εξαρτάται από τη χημική της δομή

και το μέγεθός της και εν γένει ουσίες με μοριακό βάρος >10000 διεγείρουν το ανοσοποιητικό σύστημα για την παραγωγή αντισωμάτων. Τα περισσότερα όμως αντιγόνα, όπως τα φυτοφάρμακα, οι τοξίνες, τα αντιβιοτικά κ.α., είναι ενώσεις μικρού μοριακού βάρους που μπορούν να συνδεθούν με τα αντισώματα, αλλά δεν έχουν τη δυνατότητα να επάγουν ανοσολογική απόκριση και ονομάζονται απτένια. Για την παραγωγή αντισωμάτων έναντι απτενίων είναι αναγκαία η χημική σύνδεσή τους σε ένα μεγαλύτερο μόριο-φορέα (π.χ. πρωτεΐνη KLH) το οποίο δημιουργεί ένα ανοσογόνο σύζευγμα απτενίου-φέρουσας πρωτεΐνης. Η χημεία σύνδεσης του απτενίου με τη φέρουσα πρωτεΐνη καθορίζει άμεσα τη συγγένεια του αντισώματος που θα αναπτυχθεί ως προς το απτένιο, ενισχύοντάς ή μειώνοντάς τη [107-109]. Το σύζευγμα αυτό χορηγείται συνήθως ως γαλάκτωμα με “πλήρες ανοσοενισχυτικό Freund”, ένα εναιώρημα ορυκτελαίου, επιφανειοδραστικού και νεκρών μυκοβακτηρίων, ώστε να επιτυγχάνεται μη ειδική διέγερση του ανοσολογικού συστήματος μέσω βραδείας απορρόφησης του ανοσογόνου με στόχο την αύξηση της απόδοσης του αντισώματος.

Για την παραλαβή των αντισωμάτων από το ανοσοποιημένο ζώο γίνονται σε τακτά χρονικά διαστήματα αιμοληψίες και παραλαμβάνεται ο ορός, ο οποίος χαρακτηρίζεται ως αντιορός. Ο αντιορός, περιέχει διαφορετικούς πληθυσμούς αντισωμάτων οι οποίοι διαφέρουν μεταξύ τους τόσο ως προς τη σταθερά σύνδεσής τους με το αντιγόνο, όσο και ως προς την εξειδίκευση. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έχειν ή υπόκειται σε καθαρισμό με ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη A/G ή χρωματογραφία συγγένειας προς απομόνωση των ειδικών αντισωμάτων από τις υπόλοιπες πρωτεΐνες του ορού και τις μη ειδικές ανοσοσφαιρίνες.

Αντιθέτως, η παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων βασίζεται στην τεχνολογία του υβριδώματος, κατά την οποία Β-λεμφοκύτταρα από σπλήνα ανοσοποιημένου ζώου (συνήθως ποντικού) συντήκονται με αθάνατα κύτταρα καρκινώματος Β κυττάρων (μυέλωμα) για την παραγωγή μίας υβριδικής κυτταρικής σειράς που ονομάζεται υβρίδωμα, η οποία έχει και την ικανότητα παραγωγής αντισώματος του Β-κυττάρου σε συνδυασμό με τη μακροζωία και παραγωγικότητα του μυελώματος. Τα υβριδώματα μπορούν να καλλιεργηθούν σε καλλιέργεια, όπου κάθε καλλιέργεια ξεκινά με ένα κύτταρο υβριδώματος,

παράγοντας ταυτόσημα υβριδώματα που παράγουν ένα και μοναδικό αντίσωμα (μονοκλωνικό). Ως συνέπεια του τρόπου παραγωγής τους τα μονοκλωνικά αντισώματα, αντιθέτως με τα πολυκλωνικά, αναγνωρίζουν ένα και μόνον επίτοπο στο μόριο έναντι του οποίου αναπτύχθηκαν [105, 106].

Οι πρώτοι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί αναπτύχθηκαν τη δεκαετία του 1950 μέσα από τις παράλληλες εργασίες της ομάδας των R.S. Yalow και S.A. Berson για τον ραδιοανοσοχημικό προσδιορισμό της ινσουλίνης σε πλάσμα αίματος [110, 111] από τη μία πλευρά και του R. Ekins για τον προσδιορισμό της θυροξίνης, από την άλλη [112]. Εξαιρετικά μεγάλης σημασίας ήταν η εργασία των K.Catt & G.W. Tregear οι οποίοι το 1967 παρουσίασαν τον πρώτο ραδιοανοσοχημικό προσδιορισμό σε στερεά φάση, όπου το αντιγόνο ή το αντίσωμα προσδένεται σε στερεό φορέα, με αποτέλεσμα τα ανοσοσυμπλέγματα που σχηματίζονται να παραμένουν ακινητοποιημένα και να διαχωρίζονται εύκολα από τις ελεύθερες μορφές που υπάρχουν στο διάλυμα με απλή απόχυση (ετερογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί) [113], ενώ το 1971, οι P. Perlmann και E. Engvall αντικατέστησαν για πρώτη φορά τον ραδιενεργό ιχνηθέτη με ένζυμο [114].

Για τη μέτρηση του αναλυτικού σήματος στους ανοσοχημικούς προσδιορισμούς ο αναλύτης ή το αντίσωμα συνδέεται ομοιοπολικά με έναν φορέα αναλυτικού σήματος ή αλλιώς ιχνηθέτη ο οποίος μπορεί να είναι ένα ραδιοϊσότοπο, ένα ένζυμο, μια φθορίζουσα ή μια χημειοφωταυγής ουσία. Οπότε, ανάλογα με το είδος του ιχνηθέτη οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί διακρίνονται σε:

- α) ραδιοϊσοτοπικούς προσδιορισμούς (Radioimmunoassay, RIA, Immunoradiometric Assay, IRMA) στους οποίους χρησιμοποιούνται ραδιενεργά ισότοπα για επισήμανση όπως π.χ., I^{125} και αναλυτικό σήμα είναι η ένταση της εκπεμπόμενης β ή γ ακτινοβολίας [115],
- β) ενζυμοανοσοχημικούς (Enzyme Immunoassay, EIA) στους οποίους χρησιμοποιούνται ως ιχνηθέτες ένζυμα όπως π.χ., η αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase, ALP), η υπεροξειδάση της ραπανίδος (Horse Radish Peroxidase, HRP) και η β -γαλακτοσιδάση (β -galactosidase, β -gal) όπου μετά την προσθήκη του κατάλληλου υποστρώματος μετρείται συνήθως η ένταση της απορρόφησης,
- γ) φθορισμομετρικούς (Fluorescence Immunoassay, FIA) όπου ο ιχνηθέτης είναι μία φθορίζουσα ουσία,

όπως η φλουορεσκεΐνη, η ροδαμίνη, η φυκοερυθρίνη και δ) χημειοφωταυγείς (Chemiluminescence Immunoassay, CLIA) όπου η σήμανση των ανοσοαντιδραστηρίων γίνεται με μια ουσία (π.χ. παράγωγα ακριδίνης) η οποία παράγει φως λόγω της συμμετοχής της σε μια οξειδοαναγωγική αντίδραση [105, 106]. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί και άλλους είδους ιχνηθέτες όπως είναι οι κβαντικές κουκκίδες οι οποίες είναι φθορίζοντα νανοσωματίδια κατασκευασμένα από ημιαγώγιμα ανόργανα υλικά οι οποίες διαθέτουν επιθυμητά οπτικά χαρακτηριστικά όπως φωτοσταθερότητα και μεγάλο χρόνο παραμονής στη διεγερμένη κατάσταση [116].

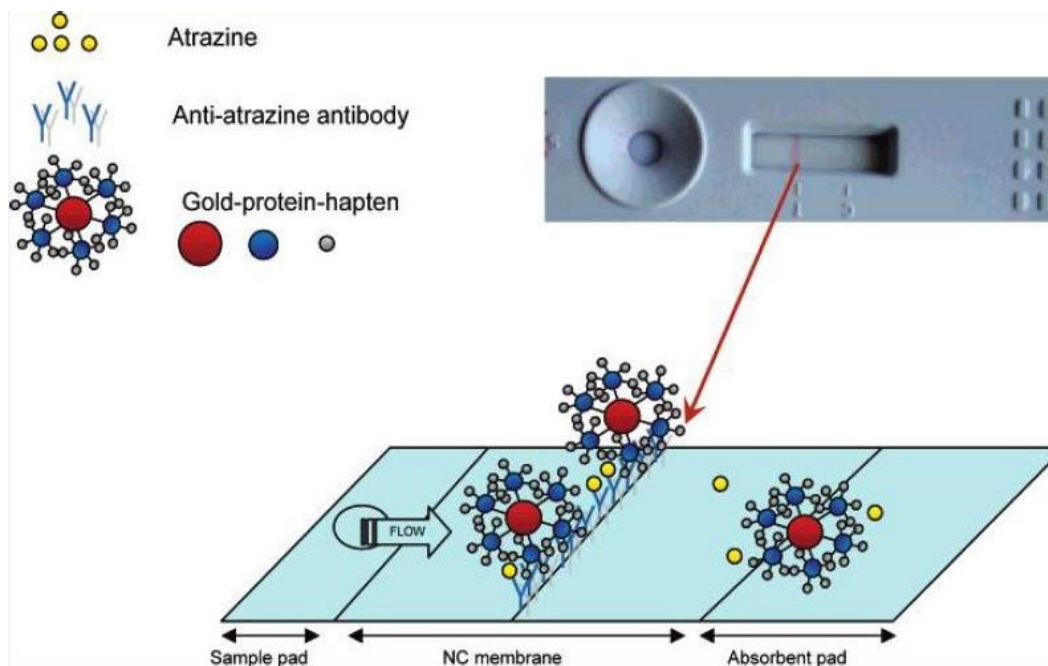
Επίσης οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί μπορούν να διαφοροποιηθούν ως προς το αν είναι απαραίτητος ο διαχωρισμός των ανοσοσυμπλεγμάτων (αναλύτης - αντίσωμα) από τον ελεύθερο ιχνηθέτη μετά το πέρας της ανοσοαντίδρασης και πριν τη μέτρηση του αναλυτικού σήματος. Εάν τα ανοσοσυμπλέγματα είναι σε διαλυτή μορφή και ταυτόχρονα τα ελεύθερα μόρια ιχνηθέτη έχουν διαφορετικό σήμα από τον δεσμευμένο στα ανοσοσυμπλέγματα ιχνηθέτη τότε είναι δυνατή η μέτρησή τους χωρίς να χρειάζεται να απομακρυνθούν. Στην περίπτωση αυτή ο ανοσοπροσδιορισμός καλείται ομογενής. Στην αντίθετη περίπτωση, δηλαδή εάν ο δεσμευμένος ιχνηθέτης δίνει παρόμοιο αναλυτικό σήμα με τον ελεύθερο τότε είναι αναγκαίος ο διαχωρισμός των ανοσοσυμπλεγμάτων, γεγονός το οποίο επιτυγχάνεται με ακινητοποίηση του ιχνηθετημένου αντιγόνου ή αντισώματος σε ένα στερεό φορέα. Σε αυτή την περίπτωση ο ανοσοπροσδιορισμός καλείται ετερογενής.

Οι ετερογενείς ανοσοχημικοί προσδιορισμοί είναι η πιο διαδεδομένη μορφή ανοσοπροσδιορισμών οι οποίοι ανάλογα με το είδος του στερεού φορέα μπορούν να πραγματοποιηθούν σε φρεάτια μικροπιλοδότησης [117-119], σε πλαστικούς σωλήνες [120], σε μαγνητικά σφαιρίδια [121], υπό ροή με τη βοήθεια συσκευών έγχυσης συνεχούς ροής (FIA) [122] ή στην πιο απλοποιημένη τους μορφή ως συσκευές πλευρικής ροής (lateral flow immunoassays) (Εικόνα 9) ή ως ταινίες εμβάπτισης (dipstick tests) [123].

Οι πιο διαδεδομένες διαμορφώσεις ετερογενών ανοσοχημικών προσδιορισμών είναι η ανταγωνιστικού τύπου και οι μη ανταγωνιστικού τύπου (sandwich). Στους ανοσοπροσδιορισμούς τύπου sandwich, χρησιμοποιούνται δύο ειδικά έναντι του

αναλύτη αντισώματα, ένα αντίσωμα δέσμησης το οποίο ακινητοποιείται στη στερεά φάση και ένα επισημασμένο αντίσωμα ανίχνευσης, τα οποία αναγνωρίζουν και συνδέονται σε διαφορετικούς επιτόπους του αναλύτη (αντιγόνο). Ο αναλύτης αντιδρά τόσο με το ακινητοποιημένο αντίσωμα δέσμησης όσο και με το αντίσωμα ανίχνευσης στην υγρή φάση, δημιουργώντας ένα ανοσοσύμπλεγμα τύπου “sandwich”. Με αυτόν τον τρόπο, το αναλυτικό σήμα που μετράται μετά το πέρας της ανοσοαντίδρασης είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα.

Η διαμόρφωση ανταγωνιστικού τύπου συνηθίζεται κυρίως στην ανίχνευση αναλυτών μικρού μοριακού βάρους όπως είναι και τα φυτοφάρμακα όπου σε αυτή την περίπτωση το ακινητοποιημένο σε μια στερεή επιφάνεια αντιγόνο ανταγωνίζεται το αντιγόνο στο δείγμα για την κάλυψη των θέσεων δέσμησης του ειδικού αντισώματος. Έτσι, απουσία του αντιγόνου στο δείγμα αναμένουμε την μέγιστη σύνδεση του ειδικού αντισώματος στο ακινητοποιημένο αντιγόνο και επομένως το μέγιστο αναλυτικό σήμα, ενώ παρουσία αυξανόμενης συγκέντρωσης του αναλύτη το σήμα μειώνεται κατά τρόπο αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη. Η ποσοτικοποίηση της σύνδεσης μεταξύ ακινητοποιημένου αντιγόνου και ειδικού αντισώματος μπορεί να γίνει άμεσα, δηλαδή το ειδικό αντίσωμα να είναι επισημασμένο με έναν ιχνηθέτη, ή έμμεσα με χρήση αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών του είδους στο οποίο έχει αναπτυχθεί το ειδικό επισημασμένο με ιχνηθέτη. Για τα ζιζανιοκτόνα της παρούσας διατριβής έχει δημοσιευθεί ένα μεγάλο πλήθος εργασιών ανοσοχημικών μεθόδων, ιδίως κατά την περίοδο 1985-2000 ενώ κυκλοφορούν στο εμπόριο έτοιμα kits [124].

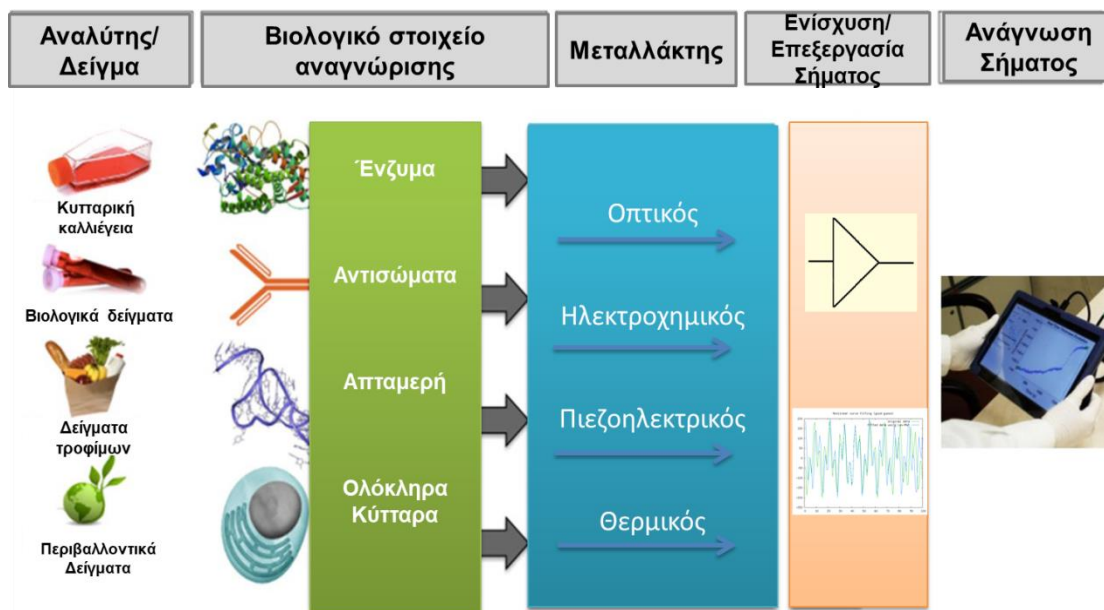


Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση μιας ανοσοχρωματογραφικής μεθόδου πλευρικής ροής ανταγωνιστικού τύπου για την ανίχνευση του atrazine με ιχνηθέτη νανοσωματίδια χρυσού [123].

2.3 Βιοαισθητήρες

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μια ολοένα αυξανόμενη τάση στον κλάδο της χημικής ανάλυσης προς την κατασκευή αναλυτικών συσκευών οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν παρά την κλίνη του ασθενούς (Point-of-Care, POC) ή στο σημείο ανάγκης (Point-of-Need, PON), ικανές να πραγματοποιούν ακριβείς και αξιόπιστες αναλύσεις με τον απλούστερο δυνατό τρόπο όσον αφορά την εμπλοκή του χρήστη, χρησιμοποιώντας για την ανάγνωση των αποτελεσμάτων ηλεκτρονικές συσκευές ευρείας χρήσης όπως ένα tablet ή ένα smartphone [125]. Η αντικατάσταση αυτή των κλασικών αναλυτικών τεχνικών που εκτελούνται αποκλειστικά στον πάγκο του εργαστηρίου με φορητά «μικροεργαστήρια» (lab-on-chip) έχει γίνει εφικτή κυρίως μέσω της εξέλιξης των χημικών αισθητήρων και των βιοαισθητήρων και της δυνατότητας συνδυασμού τους με μικρορευστομηχανικές διατάξεις (microfluidics) [126]. Ως βιοαισθητήρας, σύμφωνα με τον ορισμό κατά IUPAC, θεωρείται μια ανεξάρτητη ολοκληρωμένη συσκευή η οποία είναι ικανή να παρέχει συγκεκριμένη ποσοτική ή ημιποσοτική

αναλυτική πληροφορία χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης (βιοχημικός υποδοχέας) το οποίο βρίσκεται σε άμεση επαφή με ένα φυσικοχημικό στοιχείο μετατροπής του σήματος (μεταλλάκτης) (Εικόνα 10) [127]. Εν συγκρίσει με άλλες ενόργανες μεθόδους ανάλυσης, οι βιοαισθητήρες χαρακτηρίζονται από την ικανότητα συνδυασμού της ευαισθησίας των χημικών αισθητήρων με την εκλεκτικότητα των βιολογικών μηχανισμών αναγνώρισης, την ικανότητα για μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο αλλά κυρίως τις μεγάλες δυνατότητες για σμίκρυνση και απλοποίηση της ανάλυσης. Αξίζει να αναφερθεί ότι η «σύλληψη» της ιδέας του πρώτου βιοαισθητήρα ανήκει στον Leyland C. Clark ο οποίος το 1962 ακινητοποίησε σε ένα ηλεκτρόδιο αερίων τύπου μεμβράνης (ηλεκτρόδιο οξυγόνου Clark) υπεροξειδάση της γλυκόζης με σκοπό την μέτρηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα [128]. Έκτοτε η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων ήταν αλματώδης και σήμερα υπολογίζεται ότι η ετήσια δαπάνη παγκοσμίως για την έρευνα και ανάπτυξη των βιοαισθητήρων ξεπερνά τα 300 εκατομμύρια δολάρια. Ενδεικτικό της ανάπτυξης του συγκεκριμένου ερευνητικού πεδίου είναι το γεγονός ότι από το 1984 έως το 1990 τα σχετικά επιστημονικά άρθρα ήταν περίπου 3000, αλλά η άνοδος της νανο- και βιο- τεχνολογίας οδήγησε στην παραγωγή πάνω από 6000 δημοσιεύσεων μεταξύ 1998-2004, μόνο το 2010 ο αριθμός των δημοσιεύσεων με τον όρο “biosensor” ήταν περισσότερες από 2000 [129], ενώ σήμερα για το έτος 2019 οι δημοσιεύσεις πρωτότυπων ερευνητικών εργασιών με λέξη «κλειδί» “biosensor” ξεπερνούν τις 5000. Σήμερα αυτή η τεχνολογική εξέλιξη έχει οδηγήσει στην ύπαρξη εμπορικά διαθέσιμων αναλυτικών συσκευών που εμπίπτουν στην ευρεία κατηγορία των βιοαισθητήρων με εφαρμογές κυρίως στην κλινική χημεία π.χ. βιοαισθητήρες γλυκόζης, αλλά και στην ασφάλεια των τροφίμων, στον έλεγχο του περιβάλλοντος και στις εγκληματολογικές αναλύσεις [129, 130].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης ενός βιοαισθητήρα (αναπροσαρμογή από [131]).

2.3.1 Ταξινόμηση & αναλυτικά χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων

Η αισθητήρια ή βιοδραστική επιφάνεια ενός βιοαισθητήρα αποτελείται από το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης το οποίο είναι ακινητοποιημένο σε ένα στερεό φορέα και είναι ικανό να αναγνωρίσει την παρουσία, τη δραστικότητα ή τη συγκέντρωση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα. Τα βιολογικά μόρια που χρησιμοποιούνται μπορεί να είναι αντισώματα, τμήματα νουκλεϊκών οξέων, απταμερή, πρωτεΐνες, συνθετικοί υποδοχείς, πολυμερή μοριακής αποτύπωσης (molecularly imprinting polymers), πρωτεΐνες συγγένειας (affibodies) κ.α., από τα οποία η αναγνώριση του αναλύτη γίνεται ειδικά και μέσω δεσμών συγγένειας συμπεριλαμβανομένων αλληλεπιδράσεων με δυνάμεις Van der Waals, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου (βιοαισθητήρες συγγένειας - affinity biosensors), ή μπορεί να είναι ένζυμα, κύτταρα, ιστοί ή ακόμα και ολόκληροι οργανισμοί και η αναγνώριση να βασίζεται στην χημική αντίδραση του αναλύτη (βιοαισθητήρες κατάλυσης – catalytic biosensors). Αναλόγως επομένως με το είδος του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης οι βιοαισθητήρες μπορούν να διακριθούν σε ανοσοαισθητήρες (immunosensors), ενζυμικούς αισθητήρες (enzyme biosensors), βιοαισθητήρες κυττάρων (whole cell biosensors) κ.α.[132].

Ο μεταλλάκτης ο οποίος βρίσκεται σε επαφή με τη βιοδραστική επιφάνεια, στην οποία είναι ακινητοποιημένο το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης, μετατρέπει τη φυσικοχημική μεταβολή, που συμβαίνει σε μοριακό επίπεδο λόγω της δέσμευσης του αναλύτη, σε μετρήσιμο αναλυτικό σήμα με την χρήση κατάλληλου ηλεκτρονικού συστήματος. Ανάλογα με τη φυσικοχημική ιδιότητα που μεταβάλλεται (ρεύμα, δυναμικό, δείκτης διάθλασης, ένταση φθορισμού, θερμότητα, μάζα), ο μεταλλάκτης σήματος μπορεί να είναι ηλεκτρόδιο, αγωγός θερμότητας, πιεζοηλεκτρικός κρύσταλλος ή οπτικός κυματοδηγός. Το ηλεκτρονικό σύστημα του βιοαισθητήρα περιλαμβάνει κατάλληλο ανιχνευτή (ανιχνευτή ηλεκτρικού σήματος, θερμότητας, ηχητικών κυμάτων, φωτοπολλαπλασιαστή ή φωτοδίοδο), ενισχυτή, επεξεργαστή και καταγραφέα σήματος [133, 134]. Στα επόμενα υποκεφάλαια θα παρουσιαστεί περιληπτικά η αρχή λειτουργίας κάθε μίας κατηγορίας βιοαισθητήρων ενώ μεγαλύτερη έμφαση θα δοθεί στους οπτικούς αισθητήρες καθώς σε αυτή την κατηγορία ανήκει ο αισθητήρας που αναπτύχθηκε στην παρούσα διατριβή.

2.3.2 Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες είναι μια εξαιρετικά ευρεία κατηγορία βιο/χημικών αισθητήρων και ίσως η πιο διαδεδομένη εμπορικά, οι οποίοι μπορούν να ταξινομηθούν με βάση την ηλεκτρική ιδιότητα (ρεύμα, δυναμικό, αντίσταση) που μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αλληλεπίδρασης του αναλύτη με το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης σε ποτενσιομετρικούς, αμπερομετρικούς, βολταμετρικούς, αγωγιμομετρικούς ή εμπεδησιομετρικούς και σε τρανσίστορ επίδρασης πεδίου [135, 136]. Οι ποτενσιομετρικοί αισθητήρες βασίζονται στην μέτρηση της μεταβολής του δυναμικού σε ένα ηλεκτρόδιο εργασίας σε σχέση με το δυναμικό του ηλεκτροδίου αναφοράς (E , $i=0$). Παραδείγματα τέτοιων αισθητήρων αποτελούν τα ηλεκτρόδια υάλου για την μέτρηση pH και τα εκλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων. Οι ποτενσιομετρικοί αισθητήρες μπορούν να μετατραπούν σε βιοαισθητήρες αν στο ηλεκτρόδιο εργασίας ακινητοποιηθεί ένα ένζυμο ή ένα αντίσωμα, το οποίο συμμετέχει σε μία βιοαντίδραση από την οποία παράγονται τα ιόντα που ανιχνεύει το ηλεκτρόδιο εργασίας. Οι αγωγιμομετρικοί ($1/R$, E

σταθερό) αισθητήρες παρακολουθούν την αλλαγή της αγωγιμότητας ενός διαλύματος ή ενός μέσου καθώς η σύσταση αυτού αλλάζει ως αποτέλεσμα μιας αντίδρασης. Συχνά διαθέτουν ως βιομόριο αναγνώρισης ένα ένζυμο του οποίου τα θετικά ή αρνητικά φορτισμένα προϊόντα αλλάζουν την ιοντική ισχύ του διαλύματος οπότε και την αγωγιμότητα. Οι εμπεδησιομετρικοί αισθητήρες βασίζονται στην αρχή της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) κατά την οποία καταγράφεται η αντίσταση και η χωρητικότητα ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου κατά την εφαρμογή ενός ημιτονοειδούς σήματος ως συνάρτηση της συχνότητας. Ο λόγος του χρονοεξαρτώμενου δυναμικού $V(t)$ προς το χρονοεξαρτώμενο ρεύμα $I(t)$ ορίζεται ως εμπέδηση (Z) και αντιστοιχεί στην συνδυασμένη αντίσταση ενός ηλεκτροχημικού στοιχείου [137]. Οι εμπεδησιομετρικοί αισθητήρες έχουν εφαρμοστεί για την παρακολούθηση αντιδράσεων (αντισώματος-αντιγόνου) όπου οι παρατηρούμενες αλλαγές στην εμπέδηση είναι ανάλογες της συγκέντρωσης του αντιγόνου στο δείγμα. Οι βολτ/αμπερομετρικές τεχνικές χαρακτηρίζονται από την εφαρμογή δυναμικού σε ένα ηλεκτρόδιο εργασίας και μέτρηση του ηλεκτρολυτικού ρεύματος το οποίο είναι αποτέλεσμα των ηλεκτροχημικών διαδικασιών οξειδωτικής/αναγωγικής στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Ο όρος βολταμμετρία χρησιμοποιείται για εκείνες τις τεχνικές όπου το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας σαρώνεται με το χρόνο και το ρεύμα, που είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη, καταγράφεται σαν συνάρτηση του δυναμικού. Ανάλογα με τον τρόπο μεταβολής του δυναμικού του ηλεκτροδίου εργασίας με τον χρόνο, οι βολταμμετρικές τεχνικές περιλαμβάνουν την κυκλική βολταμμετρία (Cyclic Voltammetry, CV), την βολταμμετρία τετραγωνικού παλμού (Square Wave Voltammetry), την διαφορική παλμική βολταμμετρία (Differential Pulse Voltammetry, DPV) και άλλες. Αντίθετα στην αμπερομετρία το δυναμικό του ηλεκτροδίου εργασίας διατηρείται σταθερό με το χρόνο [138]. Τις τελευταίες δύο δεκαετίες έχει γίνει άλμα στην ανάπτυξη ηλεκτροχημικών αισθητήρων λόγω της ανάπτυξης της νανοτεχνολογίας και της δυνατότητας συνδυασμού τους με νέα υλικά όπως τα νανοσωματίδια μετάλλων (Nanoparticles), οι νανοσωλήνες άνθρακα (Single or Multi Wall Carbon Nanotubes SWCM, MWCM), οι κβαντικές κουκίδες (quantum dots, QDs), κ.α. [139].

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων στην πλειοψηφία τους είναι ενζυμικοί αισθητήρες που χρησιμοποιούν ως βιομόριο αναγνώρισης είτε ένα απευθείας ακινητοποιημένο ένζυμο είτε βασίζονται στην αναγνώριση αντίγονου-ενζυμοεπισημασμένου αντισώματος [140, 141]. Στον Πίνακα 3 παρουσιάζονται ενδεικτικά πρόσφατες εργασίες ανά κατηγορία ηλεκτροχημικού αισθητήρα που έχουν δημοσιευτεί στην διεθνή βιβλιογραφία για τα εξεταζόμενα ζιζανιοκτόνα.

Πίνακας 3: Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση των ζιζανιοκτόνων atrazine, paraquat, glyphosate.

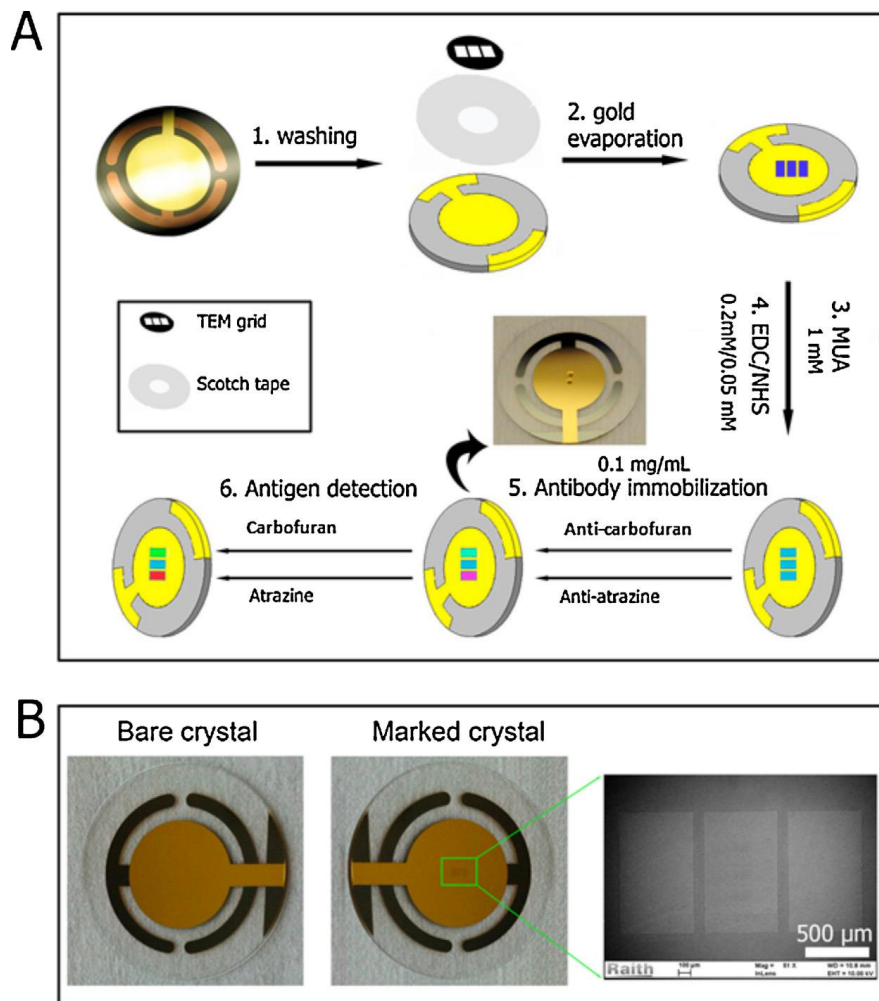
Ζιζανιοκτόνο	LOD	Βιομόριο αναγνώρισης	Ηλεκτρόδιο Εργασίας / Είδος τεχνικής	Ανιχνευόμενη Ουσία	# Αναφορές
Atrazine	0.2 pg/mL	Sandwich με επισημασμένο με HRP 10πεπτιδίο βιβλιοθήκης φάγων	CSPE /Χρονοαμπερομετρία	Βενζοκινόνη	[142]
	0.043 x ng/mL	Ειδικό αντίσωμα	Μικροηλεκτρόδια Pt/PAni/Graphene/	-	[143]
	0.22 ng/mL	Ειδικό αντίσωμα	Μικροσυστοιχίες IDEs Au /Αγωγιμομετρία	-	[144]
	0.01 ng/mL	Ειδικό αντίσωμα	SSA-PAni με χημικά ακινητοποιημένο το ειδικό αντίσωμα / EIS	-	[145]
Paraquat	0.008 ng/mL	Ειδικό αντίσωμα- CdNPs	GEC/SWV	Cd ²⁺	[146]
	0.18 ng/mL	Ειδικό αντίσωμα - HRP	m-GEC/Χρονοαμπερομετρία	Υδροκινόνη	[147]
Glyphosate	1.7 ng/mL	Αναστολή της HRP	PDMA-PSS/Au ηλεκτρόδιο/ Κυκλική Βολταμετρία	-	[148]
	30 ng/mL	Αναστολή της Atemoya peroxidase	CPE/NanoClay/MWCN / SWV	-	[149]
	50 ng/mL	Αναστολή ουρεάσης	Άμεση ποτενσιομετρία	ουρία	[150]

CSPE (Carbon Paste Printed Electrode), IDE (Interdigitated Electrodes, EIS (Electrochemical impedance spectroscopy) SSA: Styrene Sulffonic acid, SWV (Square Wave Voltammery), DPV (Differential Pulse Voltammetry), m-GEC (magnetic graphite–epoxy composite), CdNPs (Cadmium Nanoparticles), PDMA (poly(2.5-dimethoxyaniline)), PSS (poly(4-styrenesulfonic acid), MWCN (Multi Wall Carbon Nanotubes)

2.3.3 Πιεζοηλεκτρικοί ή Ακουστικοί Βιοαισθητήρες

Το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο ανακαλύφθηκε το 1880 από τους Jacques and Pierre Curie οι οποίοι παρατήρησαν ότι όταν ασκηθεί μηχανική πίεση σε κάποια ήδη κρυστάλλων αυτό οδηγεί στην δημιουργία ρεύματος εντός του κρυστάλλου το μέγεθος του οποίου είναι ανάλογο της πίεσης που ασκείται. Το φαινόμενο αυτό οφείλεται στη δημιουργία ηλεκτρικών διπόλων σε κρυστάλλους οι οποίοι δεν έχουν κέντρο συμμετρίας. Λίγα χρόνια αργότερα ανακάλυψαν και το αντίστροφο φαινόμενο, δηλαδή η εφαρμογή εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου προκαλεί μηχανική παραμόρφωση στο κρύσταλλο ενώ το 1920 ο Walter Guyton Cady κατέδειξε ότι ο αντίστροφος πιεζοηλεκτρισμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή σταθερών ηλεκτρικών κυκλωμάτων (electric oscillator) [151]. Περίπου 20 κρύσταλλοι εμφανίζουν αρκετά έντονο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο (π.χ., χαλαζίας (SiO_2), ZnO , CdS , LiNbO_3 , κλπ), αλλά στους χημικούς αισθητήρες χρησιμοποιείται κυρίως ο χαλαζίας λόγω της χημικής του σταθερότητας σε υδατικά διαλύματα και της διατήρησης των πιεζοηλεκτρικών του ιδιοτήτων σε υψηλές θερμοκρασίες. Υπάρχουν δύο τύποι πιεζοηλεκτρικών αισθητήρων εκείνοι που βασίζονται στα ακουστικά κύματα που διατρέχουν όλη τη μάζα του κρυστάλλου (Bulk Accoustic Wave, BAW) γνωστότεροι και ως μικροζυγοί κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM) και εκείνοι που βασίζονται στα επιφανειακά ακουστικά κύματα (SAW). Στην πρώτη περίπτωση ο κρύσταλλος τοποθετείται ανάμεσα σε δύο ηλεκτρόδια από Au ή Ag και με την εφαρμογή κατάλληλης διαφοράς δυναμικού παράγεται εναλλασσόμενο ρεύμα. Οι διεγερμένοι από το εναλλασσόμενο ρεύμα κρύσταλλοι ταλαντώνονται σε χαρακτηριστική δονητική συχνότητα (5-15 MHz) και εκπέμπουν υπερήχους που διαδίδονται διαμέσου της μάζας του κρυστάλλου. Εάν στην επιφάνεια ενός τροποποιημένου με βιομόρια πιεζοηλεκτρικού κρύσταλλου συμβεί μια αντίδραση βιοαναγνώρισης, τότε η μάζα του κρυστάλλου θα αυξηθεί, με αποτέλεσμα να μειωθεί η συχνότητα ταλάντωσής του. Στην περίπτωση των αισθητήρων επιφανειακών ακουστικών κυμάτων χρησιμοποιείται σειρά από μεταλλικά ηλεκτρόδια, τοποθετημένα στην ίδια πλευρά του κρυστάλλου τα οποία δρουν ως πομποί/δέκτες επιφανειακών ακουστικών κυμάτων (συχνότητας 30 ως 500 MHz). Η αναγνώριση του αναλύτη από το ακινητοποιημένο βιομόριο αναγνώρισης έχει

ως αποτέλεσμα την επιβράδυνση των επιφανειακών ακουστικών κυμάτων, η οποία είναι ανάλογη της μάζας του αναλύτη δείγμα που έχει δεσμευτεί στην επιφάνεια του κρυστάλλου και κατά συνέπεια της συγκέντρωσής του στο δείγμα. Τα πλεονεκτήματα των πιεζοηλεκτρικών αισθητήρων είναι το χαμηλό κόστος των διατάξεων, η ευκολία και η αξιοπιστία της παρασκευής πιεζοηλεκτρικών κρυστάλλων, η δυνατότητα κατασκευής μικρών και φορητών διατάξεων και η δυνατότητα ανάπτυξης ανοσοπροσδιορισμών χωρίς τη χρήση ιχνηθέτη, ικανών για μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο. Τα κύρια μειονεκτήματα αφορούν τη μεγάλη ευαισθησία των διατάξεων σε μεταβολές των συνθηκών του περιβάλλοντος, τη χαμηλή ευαισθησία των προσδιορισμών για αναλύτες με MB κάτω από 1000 Da, τη δυσκολία ανάπτυξης μεθόδων για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ουσιών και τέλος την δυσκολία διάκρισης του σήματος μη ειδικής δέσμευσης από το σήμα της ειδικής, καθώς δεν μπορεί να γίνει παράλληλα προσδιορισμός τυφλού δείγματος [152, 153]. Παρά ταύτα, οι πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες έχουν βρει εφαρμογή στον προσδιορισμό αναλυτών όπως ναρκωτικά και φυτοφάρμακα αλλά και σε πολλές βιοαναλυτικές εφαρμογές όπως στην ανίχνευση μεταλλάξεων μονής βάσης του DNA, στην ανίχνευση παθογόνων βακτηρίων όπως *Salmonella enterica* var. *Typhimurium* σε γάλα [154, 155], κ.α. Για τα τρία ζιζανιοκτόνα που μελετώνται στην παρούσα διδακτορική διατριβή, πιεζοηλεκτρικοί αισθητήρες έχουν αναφερθεί μόνο για το atrazine [156-159] οι οποίοι είναι όλοι αισθητήρες συγγένειας τύπου QCM και χρησιμοποιούν για την αναγνώριση του αναλύτη είτε ειδικά αντισώματα είτε μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή. Ενδεικτικά στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται σχηματικά ένας QCM αισθητήρας με ηλεκτρόδια Au πάχους 5 nm στα οποία ακινητοποιούνται ομοιοπολικά τα ειδικά αντισώματα έναντι του atrazine και του carbofuran και η ανίχνευση των δύο αναλυτών γίνεται διαδοχικά με εναπόθεση 30 μL διαλύματος του καθενός αναλύτη, έκπλυση με δισ απεσταγμένο νερό και ξήρανση. Το αναλυτικό σήμα είναι η διαφορά της συχνότητας συντονισμού του ξηρού αισθητήρα πριν και μετά την εναπόθεση του διαλύματος του κάθε αναλύτη. Το όριο ανίχνευσης που επετεύχθη για το atrazine με αυτόν τον αισθητήρα ήταν το 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



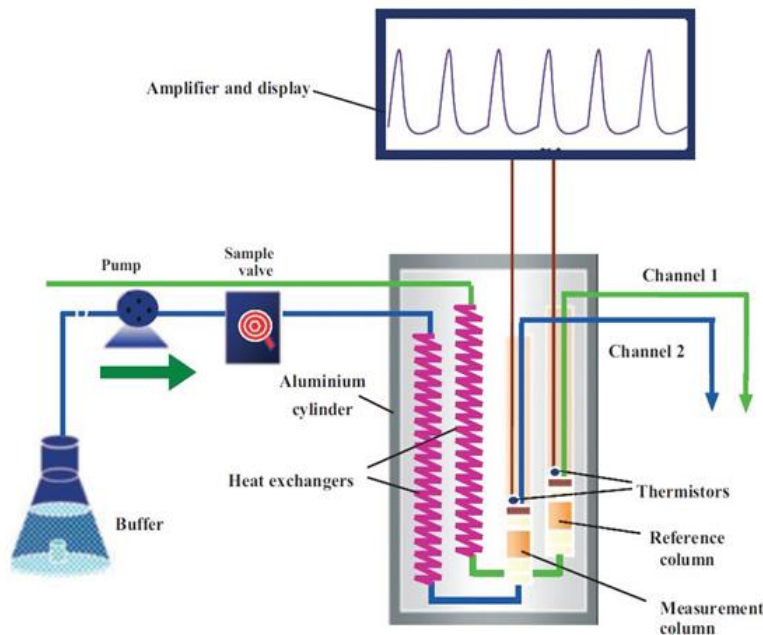
Εικόνα 11: (Α) Στάδια κατασκευής ενός ακουστικού αισθητήρα με χρήση μονοκρυστάλλου QCM για την διαδοχική ανίχνευση των atrazine και carbofuran. (Β) Φωτογραφία του κρυστάλλου QCM πριν και μετά την εναπόθεση των ειδικών αντισωμάτων καθώς και η αντίστοιχη φωτογραφία SEM [160].

2.3.4 Θερμικοί Βιοαισθητήρες

Οι θερμικοί βιοαισθητήρες εκμεταλλεύονται την αποβολή ή την πρόσληψη θερμότητας κατά την διάρκεια της αντίδρασης η οποία μεταφράζεται ως μεταβολή της θερμοκρασίας του υγρού μέσου στο οποίο πραγματοποιείται αυτή για την παρακολούθηση μιας αντίδρασης. Η συνολική θερμότητα που απορροφάται ή αποβάλλεται (Q) είναι ανάλογη της μοριακής ενθαλπίας (ΔH) και του συνολικού αριθμού moles που παράγονται κατά την αντίδραση n_p (εξίσωση 1). Η συνολική θερμότητα που απορροφάται ή αποβάλλεται (Q) εξαρτάται επίσης από την

συνολική θερμοχωρητικότητα του συστήματος (C_p) συμπεριλαμβανομένου του διαλύτη (εξίσωση 2).

$$Q = -n_p(\Delta H) \quad (1) \quad Q = C_p(\Delta T) \quad (2) \quad \Delta T = -\Delta H \frac{n_p}{C_p} \quad (3)$$



Εικόνα 12: Σχηματική απεικόνιση ενός ενζυμικού θερμίστορ συνεχούς ροής [161]

Έτσι η μεταβολή της θερμοκρασίας η οποία καταγράφεται από ένα θερμικό βιοαισθητήρα είναι ανάλογη της μεταβολής της ενθαλπίας και αντιστρόφως ανάλογη της θερμοχωρητικότητας του συστήματος (εξίσωση 3) [162]. Οι κυριότεροι εκπρόσωποι θερμικών βιοαισθητήρων είναι το ενζυμικό θερμίστορ (enzyme thermistor) και οι θερμοστήλες (thermopiles) τα οποία μπορεί να ενσωματωθούν σε διατάξεις (lab-on-chip) [163] ενώ πρόσφατα έχουν κατασκευαστεί μικροθερμοστήλες με την τεχνολογία ολοκληρωμένων κυκλωμάτων CMOS (Complementary metal-oxide-semiconductor) για τον ενζυμικό προσδιορισμό γλυκόζης [164]. Ενδεικτικά στην Εικόνα 12 παρουσιάζεται μια συσκευή συνεχούς ανάλυσης σε συνδυασμό με ένα ενζυμικό θερμίστορ τροποποιημένο με πενικιλινάση για την ανίχνευση αντιβιοτικών με δακτύλιο β-λακτάμης (πενικιλίνη G,V και αμπικιλίνη) σε δείγματα αίματος [161].

Οι αναφορές στην διεθνή βιβλιογραφία για την εφαρμογή θερμικών βιοαισθητήρων στην ανίχνευση φυτοφαρμάκων είναι λίγες ενώ για τα τρία ζιζανιοκτόνα της παρούσας διατριβής δεν υπάρχουν έως τώρα σχετικές αναφορές.

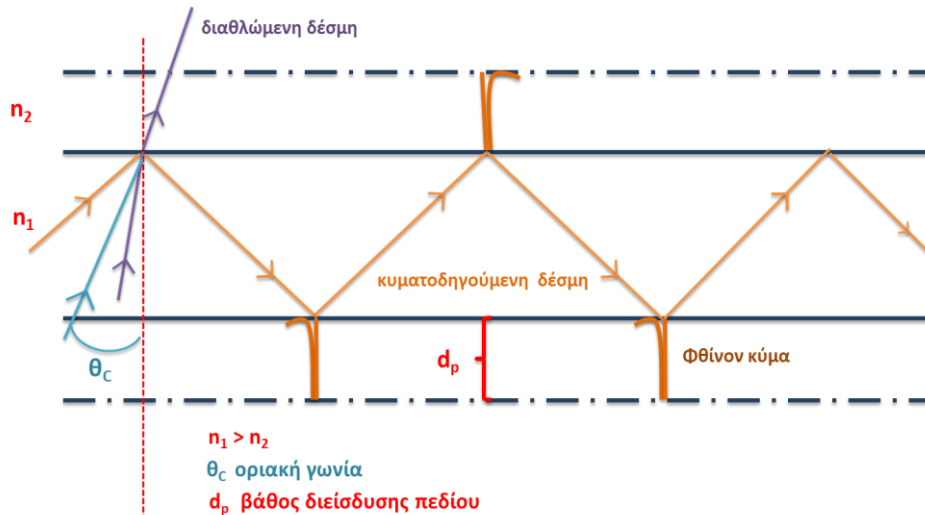
2.3.5 Οπτικοί βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί ανοσοαισθητήρες αποτελούν μια ευρεία και πολλά υποσχόμενη κατηγορία βιοαισθητήρων καθώς παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα εν συγκρίσει με άλλες κατηγορίες όπως η ταχύτητα της μέτρησης του σήματος, η δυνατότητα για παρακολούθηση των αντιδράσεων βιοαναγνώρισης σε πραγματικό χρόνο, η υψηλής ευαισθησίας προσδιορισμοί με μειωμένες παρεμποδίσσεις από το δείγμα αλλά και η ικανότητα για ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών αναλυτών στο ίδιο δείγμα, το σχετικά χαμηλό κόστος κατασκευής και φυσικά οι δυνατότητες σμίκρυνσής τους. Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην αλληλεπίδραση ανάμεσα στο φως και στην ύλη (ανάκλαση, διάθλαση, διασπορά, σκέδαση, εκπομπή φθορισμού, κλπ), η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μεταβολή ενός ή περισσότερων από τα βασικά χαρακτηριστικά της οπτικής ακτινοβολίας, όπως π.χ. το μέγεθος, η φάση, η συχνότητα και η κατάσταση πόλωσης. Η πλειοψηφία των οπτικών βιοαισθητήρων είναι αισθητήρες συγγένειας στους οποίους δεν απαιτείται διαχωρισμός ανάμεσα στα δεσμευμένα και ελεύθερα βιομόρια και είτε δεν απαιτούν τη χρήση ιχνηθέτη είτε χρησιμοποιούν ιχνηθέτες όπως για παράδειγμα φθορίζουσες ή χημειοφωταυγείς ουσίες. Οι οπτικοί βιοαισθητήρες που δεν χρησιμοποιούν ιχνηθέτες (label-free) πλεονεκτούν έναντι των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν (labeled) καθώς δεν απαιτείται τροποποίηση των αντιδραστηρίων, μειώνονται σημαντικά ο χρόνος και το κόστος της ανάλυσης, και υπάρχει η δυνατότητα καταγραφής της αντίδρασης που λαμβάνει χώρα σε πραγματικό χρόνο [165]. Εντούτοις οι οπτικοί αισθητήρες που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες μπορεί να προσφέρουν αυξημένη ευαισθησία ανίχνευσης κυρίως κατά τον προσδιορισμό αναλυτών με χαμηλό μοριακό βάρος λόγω της αύξησης του μεγέθους του αναλυτικού σήματος και της μείωσης του λόγου ειδικό προς σήμα μη ειδικής.

Οι περισσότεροι οπτικοί αισθητήρες βασίζονται στην αλληλεπίδραση της οπτικής ακτινοβολίας με τη βιοδραστική επιφάνεια μέσω του φθίνοντος κύματος διαφυγής που δημιουργείται από τα κυματοδηγούμενα φωτόνια ως αποτέλεσμα του φαινομένου της ολικής εσωτερικής ανάκλασης. Υπάρχουν όμως και βιοαισθητήρες που βασίζονται στο φαινόμενο της συμβολής των αλλαγών στη φάση ή το μέγεθος της ακτινοβολίας, η οποία αρχικά προσπίπτει στη βιοδραστική επιφάνεια και εν συνεχεία ανακλάται [166].

2.3.5.1 Οπτικοί αισθητήρες φθίνοντος κύματος διαφυγής

Οι οπτικοί αισθητήρες φθίνοντος κύματος διαφυγής βασίζονται στο φαινόμενο της ολικής εσωτερικής ανάκλασης (Total Internal Reflection, TIRF). Σύμφωνα με αυτό σε μία διάταξη που αποτελείται από δύο στρώματα υλικών με διαφορετικό δείκτη διάθλασης ($n_1 > n_2$) όταν προσπέσει φως στη μεσεπιφάνεια των δύο υλικών υπό γωνία θ μεγαλύτερη από μια οριακή γωνία $\theta_c = \sin \frac{n_2}{n_1}$ τότε είναι εφικτό το φως να διαδοθεί εντός του υλικού με τον μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης (n_1) μέσω ολικών εσωτερικών ανακλάσεων. Σε αυτή την περίπτωση η διάδοση του φωτός εντός του οπτικού μέσου ονομάζεται κυματοδήγηση και το υλικό με δείκτη διάθλασης n_1 κυματοδηγός (Εικόνα 13) . Το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που παράγεται από το κυματοδηγούμενο φως, δεν μηδενίζεται στη μεσεπιφάνεια των δύο στρωμάτων, αλλά ένα τμήμα του, πριν επιστρέψει στο κυματοδηγό, εισέρχεται στο στρώμα με το χαμηλότερο δείκτη διάθλασης, όπου η έντασή του μειώνεται εκθετικά με την απόσταση από τη μεσεπιφάνεια.



Εικόνα 13: Σχηματική αναπαράσταση των βασικών αρχών της ανάκλασης φωτεινής δέσμης στη μεσεπιφάνεια δύο στρωμάτων διαφορετικού δείκτη διάθλασης και του φθίνοντος κύματος.

Η συνιστώσα αυτή του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου ονομάζεται φθίνον κύμα (evanescent wave) και χαρακτηρίζεται από το βάθος διείσδυσης που είναι η απόσταση από τη μεσεπιφάνεια στην οποία η ένταση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου μειώνεται στο $1/e$ της τιμής που είχε στη μεσεπιφάνεια. Το βάθος της διείσδυσης του φθίνοντος κύματος εξαρτάται, από τους δείκτες διάθλασης n_1 και n_2 , από το μήκος κύματος και τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας $d_p = \lambda \div [4\pi n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2]^{1/2}$ και γενικά είναι της τάξεως μερικών εκατοντάδων nm [167, 168]. Το φθίνον κύμα είναι πολύ ευαίσθητο σε αλλαγές του δείκτη διάθλασης και μπορεί να «αισθανθεί» την αντίδραση μεταξύ ενός μορίου που είναι διαλυμένο στο υγρό μέσο πάνω από τον κυματοδηγό (n_1) με το ακινητοποιημένο στην επιφάνεια του κυματοδηγού βιομόριο αναγνώρισης (n_2). Συγκεκριμένα η δέσμευση του αναλύτη στο βιομόριο αναγνώρισης προκαλεί μεταβολή του δείκτη διάθλασης ο οποίος επηρεάζει τις ιδιότητες του κυματοδηγούμενου φωτός μεταβάλλοντας πχ, τη φάση ή την ένταση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από τον κυματοδηγό. Σε αυτή την κατηγορία οπτικών βιοαισθητήρων, οι οποίοι παρακολουθούν τις αλλαγές του δείκτη διάθλασης που προέρχονται από την αλληλεπίδραση των βιομορίων με το φθίνον πεδίο χωρίς την χρήση ιχνηθετών, ανήκουν οι αισθητήρες επιφανειακών πλασμονίων, οι συμβολομετρικοί

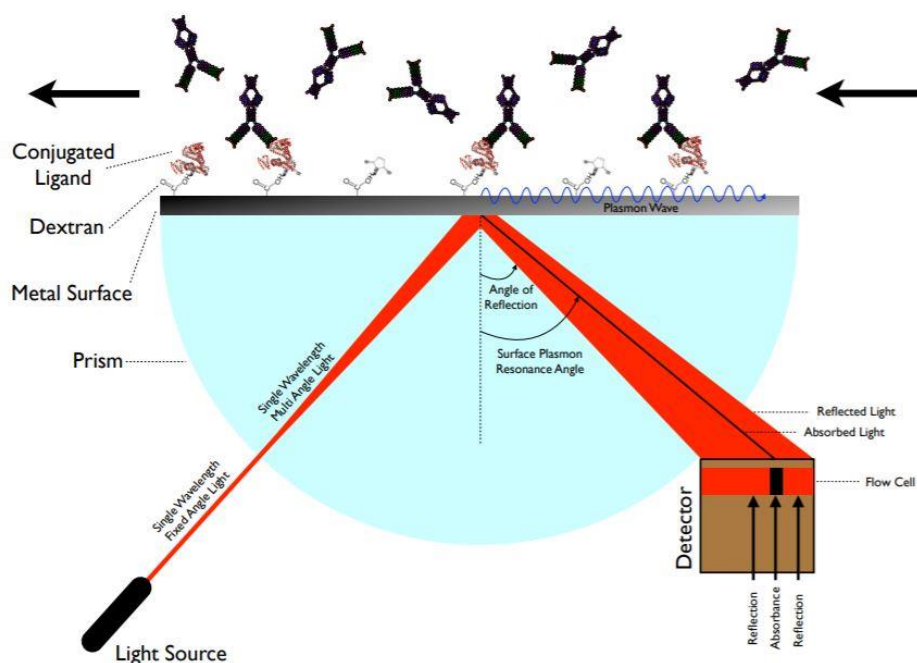
αισθητήρες, οι οπτικοί δακτυλιοειδής ταλαντωτές, οι αισθητήρες φωτονικών κρυστάλλων, οι συζεύκτες φράγματος και οι συζεύκτες πρίσματος και αισθητήρες οπτικών ινών φραγμάτων Bragg (Fiber Bragg Gratings) και φραγμάτων μεγάλης περιόδου (Long Period Grating) [165]. Στην κατηγορία των οπτικών αισθητήρων φθίνοντος πεδίου που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες περιλαμβάνονται οι αισθητήρες οπτικών ινών, τα οπτρόδια, οι επίπεδοι φθόρισμοανοσοαισθητήρες και οι τριχοειδείς ανοσοαισθητήρες [169-171]. Στα επόμενα εδάφια θα αναλυθούν πιο αναλυτικά δύο είδη οπτικών αισθητήρων φθίνοντος πεδίου οι οποίοι έχουν βρει πολλές εφαρμογές στην ανίχνευση των φυτοφαρμάκων και πιο ειδικά στην ανίχνευση των τριών αναλυτών της παρούσας μελέτης.

2.3.5.1.1 Βιοαισθητήρες συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων

Όταν μία δέσμη φωτός, η οποία είναι παράλληλα πολωμένη (p) στο επίπεδο πρόσπτωσης, προσπέσει υπό κατάλληλη γωνία (resonance angle) σε ένα υάλινο πρίσμα καλυμμένο με μέταλλο (συνήθως Au ή Ag), η ενέργεια και η ορμή της μεταφέρεται στην επιφάνεια του μετάλλου η οποία διεγείρει τα ηλεκτρόνια της στοιβάδας αγωγιμότητας τα οποία δονούμενα παράγουν διαμήκη επιφανειακά κύματα (πλασμόνια). Το κύμα των πλασμονίων δημιουργεί ένα φθίνον πεδίο το οποίο εισχωρεί στο διηλεκτρικό στρώμα, δηλαδή στο υγρό μέσο πάνω από την επιφάνεια του μετάλλου, αλληλεπιδρώντας με τα ακινητοποιημένα στο μέταλλο βιομόρια αναγνώρισης. Η δέσμευση ενός αναλύτη στα βιομόρια αναγνώρισης μεταβάλλει τα χαρακτηριστικά του κύματος των πλασμονίων, όπως την γωνία συντονισμού εξαιτίας της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διηλεκτρικού στρώματος. Συνεπώς για την επίτευξη νέας διέγερσης των πλασμονίων επιβάλλεται η μεταβολή των χαρακτηριστικών του φωτός που αλληλεπιδρά με αυτά.

Συγκεκριμένα, προκειμένου να επιτευχθεί συντονισμός των επιφανειακών πλασμονίων μπορεί να μεταβληθεί i) η γωνία πρόσπτωσης θ της ακτινοβολίας (λ σταθερό), ii) το μήκος κύματος λ της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (θ σταθερό), iii) η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας (λ, θ σταθερά) iv) το μέγεθος ή η φάση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ή και τα δύο μαζί. Από την πλευρά της

οπτικής διάταξης για την επίτευξη του συντονισμού των πλασμονίων έχουν αναπτυχθεί διατάξεις με πρίσμα (διαμόρφωση Kretschmann), με κυματοδηγούς, φράγματα και οπτικές ίνες.



Εικόνα 14: Σχηματική απεικόνιση της λειτουργίας ενός αισθητήρα SPR στον οποίο το αναλυτικό σήμα είναι η μεταβολή της γωνίας συντονισμού λόγω της αλληλεπίδρασης του αναλύτη με τα ακινητοποιημένα στην μεταλλική επιφάνεια βιομόρια αναγνώρισης [172].

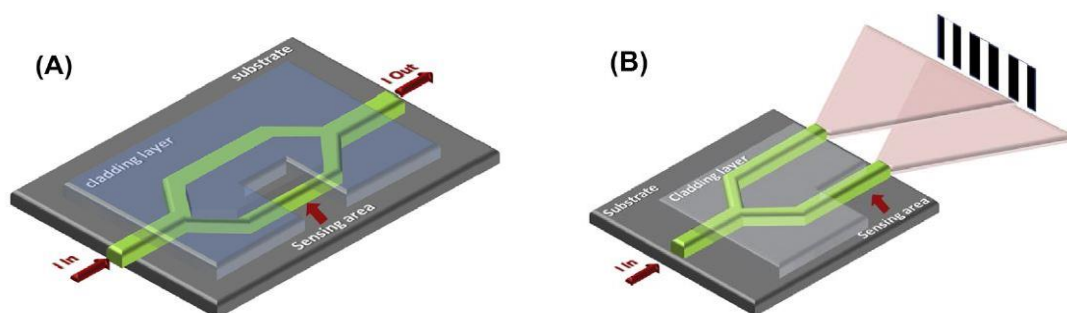
Για το ζιζανιοκτόνο atrazine έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία αρκετές εργασίες οι οποίες χρησιμοποιούν αισθητήρες SPR στις οποίες για τον συντονισμό των επιφανειακών πλασμονίων έχουν χρησιμοποιηθεί διατάξεις τύπου Kretschmann [173, 174], διατάξεις με φράγματα [175] και με οπτικές ίνες [176]. Οι αισθητήρες αυτοί χρησιμοποιούν ως βιομόριο αναγνώρισης αντισώματα [177] ή μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή είτε επιστρωμένα σε νανοσωματίδια [178] ή στην επιφάνεια του αισθητήρα [179]. Για τα ζιζανιοκτόνα paraquat και glyphosate οι εργασίες στη διεθνή βιβλιογραφία που κάνουν χρήση των αισθητήρων SPR είναι περιορισμένες. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αποτελούν οι εργασίες των Yamaguchi και Harada για τον προσδιορισμό του paraquat χρησιμοποιώντας ένα εμπορικά διαθέσιμο αισθητήρα, τον BIAcore X system

(BIACORE, Uppsala, Sweden) τροποποιημένο με ειδικό αντίσωμα [180] και η εργασία των X. Ding and K. Yang για τον προσδιορισμό του glyphosate [181].

2.3.5.1.2 Συμβολομετρικοί Αισθητήρες

Το φαινόμενο της συμβολής δύο οπτικών δεσμών απεδείχθη περίπου το 1800 από τον Thomas Young με το πείραμα της διπλής σχισμής ενισχύοντας την κυματική θεωρία του φωτός. Στις οπτικές διατάξεις που βασίζονται στο φαινόμενο της συμβολής μια εισερχόμενη δέσμη μονοχρωματικής ακτινοβολίας χωρίζεται σε δύο ισοενεργειακές δέσμες εκ των οποίων η μία χρησιμοποιείται ως δέσμη αναφοράς και η άλλη ως αισθητήρια. Η αισθητήρια δέσμη καθοδηγείται με τέτοιο τρόπο ώστε να «ταξιδεύει» κατά μήκος μιας ειδικά σχεδιασμένης περιοχής (αισθητήρια περιοχή) όπου λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις βιοαναγνώρισης προκαλώντας αλλαγές του δείκτη διάθλασης. Αυτές οι αλλαγές, προερχόμενες από την αλληλεπίδραση του φθίνοντος κύματος της αισθητήριας δέσμης με τα βιομόρια αναγνώρισης, προκαλούν μια υστέρηση φάσης μεταξύ της αισθητήριας και της δέσμης αναφοράς. Όταν οι δύο δέσμες συνδυάζονται ξανά σε ένα κοινό «μονοπάτι», η οπτική διάταξη είναι γνωστή ως συμβολόμετρο Mach-Zender (MZI), ενώ αν συμβάλουν στον αέρα και το εξερχόμενο φως καταγράφεται πάνω σε μια οθόνη ως εναλλασσόμενοι φωτεινοί και σκοτεινοί κροσσοί η διάταξη είναι γνωστή ως συμβολόμετρο Young (YI). Η μαθηματική έκφραση της παραπάνω απλοποιημένη περιγραφής αποδίδεται ως εξής: $\Delta\varphi(\lambda) = \frac{2\pi L}{\lambda} \Delta N_{rs}(\lambda)$, όπου $\Delta N_{rs} = [N_r(\lambda) - N_s(\lambda)]$ όπου $\Delta\varphi$ η υστέρηση φάσης και ΔN_{rs} η διαφορά των αποτελεσματικών δεικτών διάθλασης της δέσμης αναφοράς (N_r) και της αισθητήριας δέσμης (N_s). Προϋπόθεση για τη λειτουργία των συμβολομετρικών αισθητήρων είναι το εισερχόμενο μονοχρωματικό φως να είναι μονορυθμικό και μιας πολικότητας καθώς κάθε ρυθμός για κάθε πολικότητα έχει διαφορετικό αποτελεσματικό δείκτη διάθλασης, μεταδίδεται δηλαδή με διαφορετική ταχύτητα, γεγονός που περιπλέκει την ανάγνωση του σήματος εξόδου. Παρόλα αυτά έχουν κατασκευασθεί διρυθμικά συμβολόμετρα και συμβολόμετρα διπλής πολικότητας [182]. Επίσης, πρόσφατα έχουν αναπτυχθεί διατάξεις που βασίζονται σε πολυχρωματική συμβολομετρία, η οποία υπερκεράζει τα προβλήματα της

μονοχρωματικής ακτινοβολίας όπως π.χ., η ασάφεια στη πρόβλεψη της διαφοράς φάσης, η απόσβεση του σήματος και η δυσκολία ολοκλήρωσης σε μικροδιατάξεις [183]. Τα πολυχρωματικά συμβολόμετρα που έχουν κατασκευαστεί είναι τύπου MZI με ολοκληρωμένες πηγές φωτός και με εξωτερικό φασματοφωτόμετρο για την καταγραφή του φάσματος εξόδου [184] ή πλήρως ολοκληρωμένα σε ψηφίδες πυριτίου μαζί με τις πηγές φωτός και τους φωτοανιχνευτές [185], ενώ πολύ πρόσφατα παρουσιάστηκε η κατασκευή ενός πολυχρωματικού συμβολομέτρου Young [186]. Οι διατάξεις αυτές έχουν βρει έως τώρα εφαρμογή στην ανάλυση μυκοτοξινών σε μύρα [187], στην ανίχνευση αλλεργιογόνων [188], και σε κλινικές αναλύσεις όπως η ανίχνευση C-αντιδρώσας πρωτεΐνης σε δείγματα ορού αίματος [189].

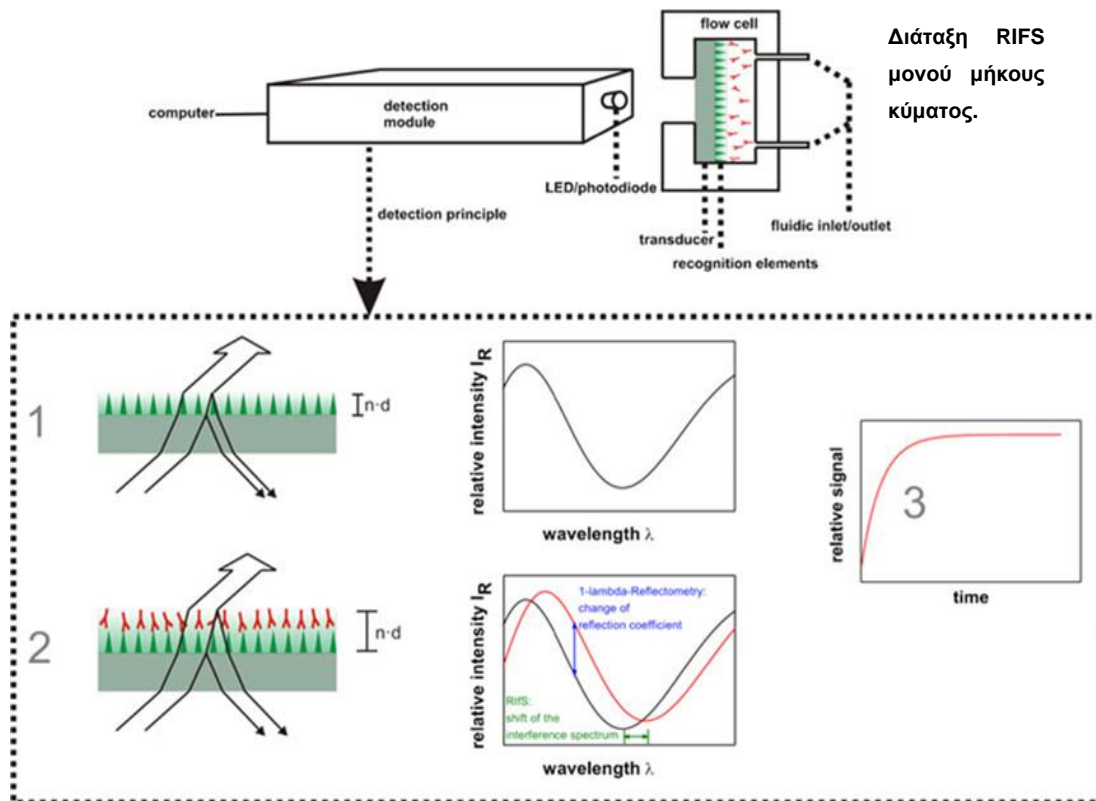


Εικόνα 15: Σχηματική αναπαράσταση ενός συμβολόμετρου Mach-Zendher (A) και ενός συμβολόμετρου Young (B) [182].

2.3.5.2 Βιοαισθητήρες συμβολής ανακλώμενου φωτός

Στους αισθητήρες συμβολής ανακλώμενου φωτός η ακτινοβολία ανακλάται από τις διαφορετικές μεσεπιφάνειες που αποτελούν τον μεταλλάκτη σήματος, ο οποίος συνήθως περιλαμβάνει την βιοδραστική επιφάνεια και μια επιπλέον επίστρωση διηλεκτρικού υλικού, οι οποίες έχουν διαφορετικό δείκτη διάθλασης. Η προσπίπτουσα δέσμη φωτός ανακλάται μερικώς σε κάθε διεπιφάνεια με αποτέλεσμα οι ανακλώμενες δέσμες να διασχίζουν διαφορετικούς οπτικούς δρόμους και όταν συμβάλλουν ξανά να λαμβάνει χώρα καταστρεπτική ή ενισχυτική συμβολή η οποία εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης του φωτός, το μήκος κύματος, το φυσικό πάχος της. Όταν ο προσδιοριζόμενος αναλύτης

προσδένεται στα ακινητοποιημένα βιομόρια αναγνώρισης προκαλεί αύξηση του πάχους της στοιβάδας, η οποία επηρεάζει τις ανακλώμενες δέσμες φωτός, οδηγώντας σε μετατόπιση του φάσματος συμβολής προς μεγαλύτερα μήκη κύματος.



Εικόνα 16: Αρχή μεθόδου τεχνικής RIFS: (1) Ο μεταλλάκτης ακτινοβολείται με την πηγή φωτός τοποθετημένη στην πίσω πλευρά του υάλινου πλακιδίου και οι ανακλώμενες δέσμες σχηματίζουν χαρακτηριστικό φάσμα συμβολής, (2) Η δέσμευση του αναλύτη στην αισθητήρια επιφάνεια προκαλεί μετατόπιση του φάσματος συμβολής προς μεγαλύτερα μήκη κύματος, (3) η οποία παρακολουθείται σε πραγματικό χρόνο [190]

Η πιο διαδεδομένη μεθοδολογία ανίχνευσης που βασίζεται σε συμβολή ανακλώμενου φωτός είναι αυτή που εισήχθη το 1991 από την ομάδα του καθηγητή Gunter Gauglitz γνωστή ως φασματοσκοπία ανακλαστικής συμβολής (Reflectometric Interference Spectroscopy, RIFS) [191]. Στην RIFS, η αισθητήρια επιφάνεια είναι ένα υάλινο πλακίδιο μικροσκοπίου τροποποιημένο με ένα λεπτό στρώμα διαφανούς διηλεκτρικού υλικού (π.χ. SiO_2 , $\text{SiO}_2\text{-Ta}_2\text{O}_5$) πάνω στο οποίο

λαμβάνουν χώρα οι βιομοριακές αλληλεπιδράσεις. Μέσα στα χρόνια η μεθοδολογία έχει εξελιχθεί από την χρήση πηγής λευκού φωτός και την καταγραφή όλου του φάσματος συμβολής [192, 193], στην παρακολούθηση μερικών μηκών κύματος για παράλληλη ανίχνευση σε πλακίδια μικροτιτλοδότησης ή και σε μικροσυτοιχίες [194, 195]. Επιπλέον έχουν χρησιμοποιηθεί υποστρώματα όπως πορώδες πυρίτιο, πορώδες πυρίτιο με ανεπτυγμένο θερμικό οξειδίο [196], πορώδεις επιφάνειες Si-C [197] αλλά και πορώδες TiO₂ [198].

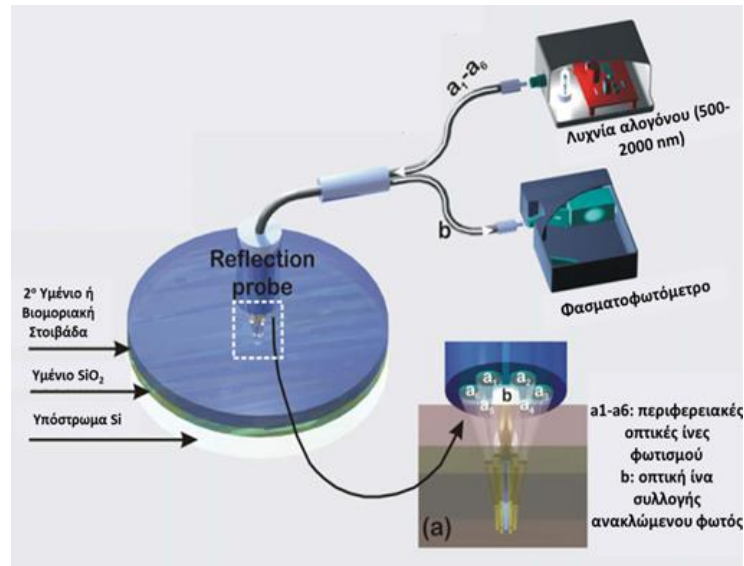
2.4 Αρχή λειτουργίας βιοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός

Ο αισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διδακτορική διατριβή για την ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού φυτοφαρμάκων σε πόσιμο νερό βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός (White Light Reflectance Spectrometry) και ανήκει στην κατηγορία των οπτικών αισθητήρων συμβολής ανακλώμενου φωτός. Ο συγκεκριμένος αισθητήρας είναι η εξέλιξη ενός αισθητήρα που αναπτύσσεται στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» σε συνεργασία με την εταιρία ThetaMetrisis την τελευταία δεκαετία [199].

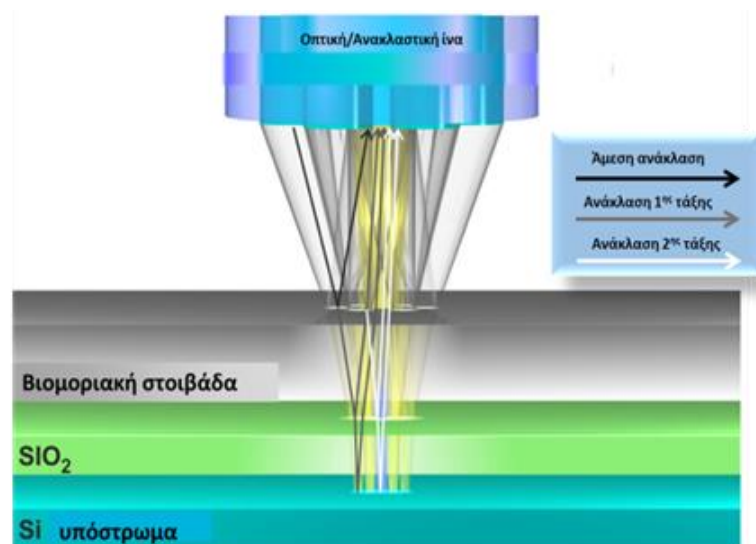
Η φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός στηρίζεται στην ανάκλαση μιας δέσμης φωτός (visible, VIS) ή ορατού/εγγύς υπέρυθρου φωτός (visible/near infrared, VIS/NIR) από υπόστρωμα τροποποιημένο με τέτοιο τρόπο ώστε το φάσμα ανάκλασης της δέσμης που προσπίπτει κάθετα στην επιφάνεια να έχει τουλάχιστον έναν κροσσό συμβολής στην περιοχή του ορατού. Η κύρια διαφορά συγκριτικά με τους βιοαισθητήρες φασματοσκοπίας συμβολής ανακλώμενου φωτός (RIFS) είναι η χρήση πυριτίου ως ανακλαστικού υποστρώματος αντί για διαφανές υπόστρωμα (γυαλί) και φυσικά το γεγονός ότι ο φωτισμός και η συλλογή του ανακλώμενου φωτός συμβαίνει διαμέσου της στοιβάδας του υγρού που διοχετεύεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης αντί για το πίσω μέρος του διαφανούς υποστρώματος. Στην Εικόνα 18 παρουσιάζεται σχηματικά η αρχή λειτουργίας του βιοαισθητήρα WLRS όπως και τα βασικά στοιχεία της μετρητικής διάταξης, δηλαδή η πηγή φωτός η οποία είναι μια λυχνία αλογόνου, το φασματοφωτόμετρο και η δέσμη των οπτικών ινών πρόσπτωσης/ανάκλασης

(reflection probe). Πιο αναλυτικά η δέσμη οπτικών ινών αποτελείται από έξι οπτικές ίνες τοποθετημένες στην περίμετρο ενός κύκλου και μία οπτική ίνα στο κέντρο του, όλες της ίδιας διαμέτρου. Το φως μεταφέρεται μέσω των έξι περιφερειακών ινών κάθετα στην αισθητήρια επιφάνεια ενώ οι ανακλώμενες δέσμες συλλέγονται από την κεντρική οπτική ίνα η οποία είναι συνδεδεμένη με φασματοφωτόμετρο για την καταγραφή του φάσματος ανάκλασης. Η αισθητήρια επιφάνεια αποτελείται από ένα υπόστρωμα ενός σχεδόν πλήρους ανακλαστικού υλικού, συνήθως Si, το οποίο φέρει υμένιο θερμικού διοξειδίου του πυριτίου SiO₂ ως διαφανές διηλεκτρικό και στο οποίο είναι δυνατό να ακινητοποιηθούν βιολογικά μόρια όπως πρωτεΐνες, αντισώματα ή ολιγονουκλεοτίδια μέσω φυσικής προσρόφησης ή ομοιοπολικής σύνδεσης (βιομοριακή στοιβάδα). Καθώς το φως από την οπτική πηγή προσπίπτει κάθετα στην αισθητήρια επιφάνεια ανακλάται πλήρως από την επιφάνεια του πυριτίου (άμεση ανάκλαση) ή αρχικά διαθλάται στο υμένιο του SiO₂ και έπειτα ανακλάται από το υπόστρωμα πυριτίου (ανάκλαση 1ης τάξης) ή διαθλάται στη βιομοριακή στοιβάδα (ανάκλαση 2ης τάξης) και έπειτα ανακλάται από το υπόστρωμα πυριτίου. Οι ανακλώμενες δέσμες λόγω διαφοράς φάσης συμβάλλουν δημιουργώντας ένα χαρακτηριστικό φάσμα συμβολής το οποίο συλλέγεται από την κεντρική οπτική ίνα και οδηγείται στο φασματοφωτόμετρο όπου καταγράφεται διαρκώς με την βοήθεια του λογισμικού προγράμματος FR-Monitor που έχει αναπτυχθεί από την εταιρεία ThetaMetrisis.

A



B



Εικόνα 17: (A) Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (προσαρμογή από [200]). (B) Σχηματική αναπαράσταση της αρχής λειτουργίας των βιοαισθητήρων φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός.

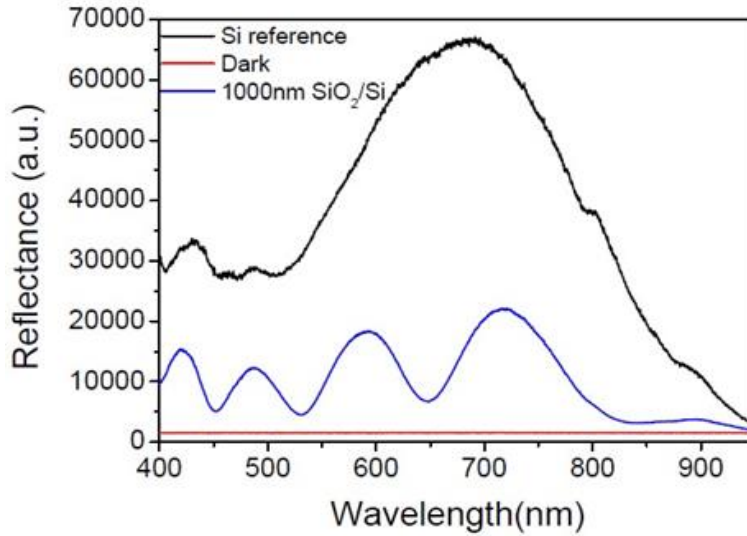
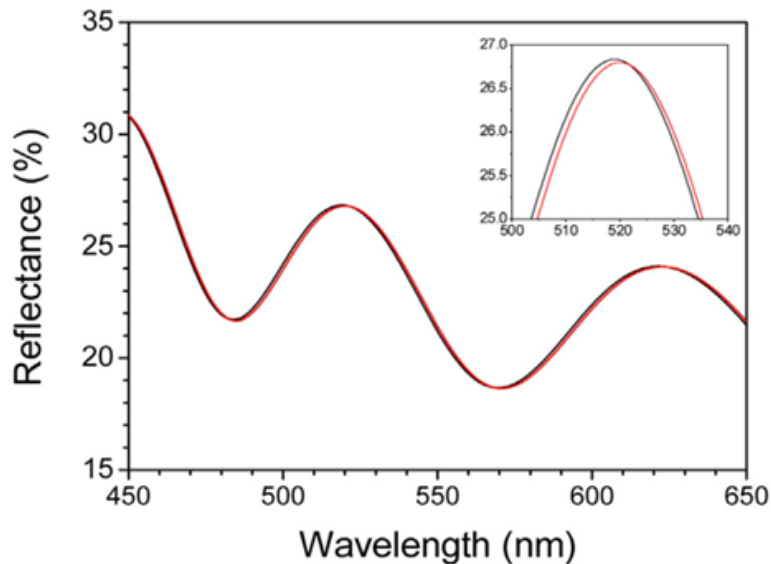
Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι προκειμένου να ληφθεί ένας κροσσός συμβολής στη φασματική περιοχή του φασματοφωτομέτρου το πάχος του υμενίου SiO₂ πρέπει να είναι ≥ 300 nm και καθώς αυξάνεται αυτό το πάχος λαμβάνονται περισσότεροι κροσσοί συμβολής στο φάσμα ανάκλασης, διότι αυξάνεται η οπτική διαδρομή του φωτός. Θεωρητικά ο αριθμός των επιθυμητών

κροσσών συμβολής είναι όσο το δυνατόν μεγαλύτερος γιατί με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται καλύτερη προσαρμογή του πειραματικού φάσματος προς το θεωρητικό και συνεπώς ακριβέστερος υπολογισμός του πάχους του διηλεκτρικού [201]. Εντούτοις, για κατασκευαστικούς λόγους το πάχος του υμενίου SiO₂ δεν μπορεί να υπερβεί τα 3000 nm καθώς δεν είναι δυνατή η εναπόθεση ομοιόμορφων υμενίων μεγαλύτερου πάχους σε μεγάλες επιφάνειες με θερμική οξείδωση. Έχει μελετηθεί η χρήση και άλλων διαφανών υλικών ως διηλεκτρικών μέσων για την κατασκευή του βιοαισθητήρα και έχει προκύψει ότι το διοξείδιο του πυριτίου είναι το πλέον κατάλληλο [202].

Κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης βιοαναγνώρισης π.χ., αντιγόνου-αντισώματος, συμπληρωματικών ολιγονουκλεοτιδίων, στην επιφάνεια του διηλεκτρικού παρατηρείται αλλαγή του φάσματος συμβολής και συγκεκριμένα μετατόπισή του προς μεγαλύτερα μήκη κύματος (Εικόνα 18B). Η μετατόπιση αυτή είναι αποτέλεσμα της αλλαγής του δείκτη διάθλασης της βιομοριακής στοιβάδας λόγω της δημιουργίας συμπλεγμάτων βιομορίων. Για την παρακολούθηση των βιοαντιδράσεων απαιτείται η λήψη ενός φάσματος αναφοράς [REF(λ)] (reference spectrum), ενός φάσματος υποβάθρου [D(λ)] (dark spectrum), ενώ το φάσμα συμβολής [S(λ)] (reflectance spectrum) καταγράφεται συνεχώς (ανά δευτερόλεπτο, ως μέσος όρος 3 φασμάτων με 150 ms χρόνος ολοκλήρωσης/φάσμα) και υπολογίζεται το απόλυτο πειραματικό φάσμα ανάκλασης [R(λ)] από την εξίσωση:

$$[R(\lambda)] = \frac{S(\lambda) - D(\lambda)}{REF(\lambda) - D(\lambda)} \quad (1)$$

Στην Εικόνα 18A παρουσιάζεται ένα τυπικό φάσμα ανάκλασης από ένα υμένιο θερμικού SiO₂ πάχους 1000 nm πάνω σε υπόστρωμα Si μαζί με το φάσμα αναφοράς μόνο από το υπόστρωμα και το φάσμα υποβάθρου. Η λήψη του φάσματος αναφοράς, το οποίο λαμβάνεται από ψηφίδα Si, είναι ένα κρίσιμο βήμα καθώς καθορίζει την επιτυχημένη προσαρμογή του θεωρητικού προς το πειραματικό φάσμα συμβολής και ως εκ τούτου την ακρίβεια των μετρήσεων των μικρών μεταβολών του φάσματος συμβολής λόγω μιας βιοαντίδρασης.

A**B**

Εικόνα 18: (A) Τυπικό φάσμα ανάκλασης από επιφάνεια Si με υμένιο SiO₂ πάχους 1000 nm SiO₂ (μπλε γραμμή) ή Si (μαύρη γραμμή). Η κόκκινη γραμμή αντιστοιχεί στο φάσμα υποβάθρου δηλαδή στο φάσμα που λαμβάνεται από επιφάνεια Si με κλειστή την οπτική πηγή. (B) Φάσμα ανάκλασης το οποίο έχει ληφθεί καθώς διέρχεται διάλυμα έκπλυσης μέσα από τη μικρορευστομηχανική κυψελίδα πριν (μαύρη γραμμή) και μετά (κόκκινη γραμμή) από μια βιοαντίδραση. Η ένθετη εικόνα είναι μεγέθυνση του φάσματος για την περιοχή μηκών κύματος 500-560 nm [202].

Η μετατροπή της παρατηρούμενης μετατόπισης στο φάσμα ανάκλασης σε φαινόμενο πάχος της βιομοριακής στοιβάδας επιτυγχάνεται μέσω ειδικού

λογισμικού το οποίο υπολογίζει την ενέργεια της ανακλώμενης δέσμης φωτός για κάθε μήκος κύματος και συγκρίνει τις πειραματικές τιμές με τις θεωρητικές έως ότου γίνει η καλύτερη δυνατή προσαρμογή των δύο φασμάτων με τη χρήση αλγορίθμου Levenberg-Marquardt. Δεδομένου ότι η ένταση της πηγής για κάθε λ είναι γνωστή από το φάσμα αναφοράς και με την παραδοχή πως ο δείκτης διάθλασης της βιομοριακής στοιβάδας δεν μεταβάλλεται σημαντικά κατά την αντίδραση με τον αναλύτη, ο μόνος άγνωστος της εξίσωσης (Εξίσωση (3)) είναι το πάχος της βιομοριακής στοιβάδας. Με αυτό τον τρόπο ο αλγόριθμος είναι σε θέση να υπολογίζει την μεταβολή του πάχους της βιομοριακής στοιβάδας συναρτήσει του χρόνου. Επιπλέον, λόγω του ότι ο δείκτης διάθλασης του διοξειδίου του πυριτίου (1.46) είναι όμοιος με αυτόν των πρωτεϊνών [203] η μεταβολή του μέσου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας που δημιουργείται κατά την βιοαντίδραση καταγράφεται απευθείας ως μεταβολή του πάχους του υμενίου SiO₂.

Πιο αναλυτικά για την υπολογισμό του συντελεστή ολικής ανάκλασης (συντελεστής Fresnel) ακολουθήθηκε η προσέγγιση Abeles (Abeles matrix formalism), όπου στη συγκεκριμένη περίπτωση για k-1 στρώματα διαφανών υλικών ο συντελεστής Fresnel για την ανάκλαση μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση (2), όπου ρ είναι το πλάτος και Δ η φάση:

$$\rho_{k-1} e^{i\Delta_{k-1}} = \frac{r_{k-1} + \rho_k e^{i\Delta_k - 2i\delta_{k-1}}}{1 + r_{k-1} \rho_k e^{i\Delta_k - 2i\delta_k}} \quad (2)$$

Από την εξίσωση (2) για οποιοδήποτε αριθμό k στρώσεων διηλεκτρικού μπορεί να υπολογισθεί ο συντελεστής Fresnel για την ανάκλαση. Στην περίπτωση ενός βιοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός όπου η αισθητήρια επιφάνεια, η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ του υποστρώματος και του περιβάλλοντος, αποτελείται από δύο διαφανή υλικά (βιομοριακή στοιβάδα και SiO₂) η συνολική ενέργεια του ανακλώμενου φωτός που καταγράφεται από το φασματοφωτόμετρο υπολογίζεται ως εξής:

$$E = \frac{A}{B} \quad (3)$$

$$\begin{aligned}
A = & r_{01}^2 + r_{12}^2 + r_{23}^2 + 2r_{01}r_{12}r_{23} + r_{01}^2r_{12}^2r_{23}^2 \\
& + 2r_{01}r_{23} \cos\left(\left(\frac{4\pi}{\lambda}\right)(n_1d_1 + n_2d_2)\right) + 2r_{12}r_{23} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} n_1d_1\right) \\
& + 2r_{01}r_{12}r_{23}^2 \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} n_2d_2\right) + 2r_{01}r_{12} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} n_1d_1\right) \\
& + 2r_{01}^2r_{12}r_{23} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} n_1d_1\right)
\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
B = & 1 + r_{01}^2r_{12}^2 + r_{01}^2r_{23}^2 + r_{12}^2r_{23}^2 + 2r_{12}r_{23} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} n_2d_2\right) \\
& + 2r_{01}r_{23} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} (n_1d_1 + n_2d_2)\right) + 2r_{01}^2r_{12}r_{23} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} n_2d_2\right) \\
& + 2r_{01}r_{12} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} n_1d_1\right) + 2r_{01}r_{12}r_{23}^2 \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} n_1d_1\right) \\
& + 2r_{01}r_{12}^2r_{23} \cos\left(\frac{4\pi}{\lambda} (n_1d_1 + n_2d_2)\right)
\end{aligned}$$

Όπου με n_i συμβολίζεται ο δείκτης διάθλασης ενός i -στρώματος ($i=0$ αέρας, 1ο υμένιο, 2ο υμένιο και 3 υπόστρωμα), με d_i συμβολίζεται το πάχος του εκάστοτε υμενίου και το αντίστοιχο μήκος κύματος. Οι δείκτες διάθλασης κάθε στρώματος/υμενίου συναρτήσει του μήκους κύματος έχουν υπολογιστεί με ελλειψόμετρο, έχουν προσαρμοστεί σε ένα μοντέλο κατανομής Cauchy τριών παραμέτρων και έχουν αποθηκευτεί στην βάση δεδομένων του προγράμματος FR-Monitor [204].

Ο αισθητήρας ανάκλασης λευκού φωτός έχει ήδη χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση του πάχους επιφανειών στις οποίες έχουν ακινητοποιηθεί βιομόρια όπως πρωτεΐνες ή αντισώματα ως εναλλακτικός τρόπος έναντι τεχνικών όπως η μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM, Atomic Force Spectrometry) [201], τον προσδιορισμό μεμονωμένων αναλυτών μεγάλου μοριακού βάρους όπως ο παράγοντας C3b του συμπληρώματος [205], το ολικό και το ελεύθερο ειδικό προστατικό αντιγόνο (PSA, Prostate Specific Antigen) σε ορό αίματος και σε εγκληματολογικά δείγματα [202, 206] και μικρού μοριακού βάρους ενώσεις όπως

η αφλατοξίνη M1 σε δείγματα γάλακτος [207] αλλά και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αναλυτών μεγάλου μοριακού βάρους (C-αντιδρώσα πρωτεΐνη και D-διμερή σε ορό αίματος) [208].

3 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Η χρήση φυτοπροστατευτικών προϊόντων είναι μια εκ των ουκ άνευ ανάγκη στη σύγχρονη γεωργική πρακτική η οποία τις προηγούμενες δεκαετίες εφαρμόστηκε με αμετροεπή τρόπο. Η πλειοψηφία των σύγχρονων φυτοφαρμάκων είναι συνθετικές ενώσεις, οι οποίες παρά τον ενδελεχή σχεδιασμό τους δεν διασπώνται (είτε βιολογικά είτε φωτοχημικά) σε σύντομο χρονικό διάστημα μετά την εφαρμογή τους και αναλόγως των συνθηκών είναι δυνατό να εκπλυθούν και να καταλήξουν είτε σε υπόγεια είτε σε επιφανειακά ύδατα. Ο συνδυασμός αυτός, δηλαδή η υπέρμετρη χρήση φυτοφαρμάκων παράλληλα με τη μερική περιβαλλοντική διάσπαση, έχει οδηγήσει στην ολοένα αυξανόμενη εύρεση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε πόσιμο νερό και σε νωπά ή κατεργασμένα τρόφιμα (πχ φρούτα, λάδι, χυμοί, σιτηρά).

Είναι πλέον γνωστό ότι η έκθεση ακόμη και σε σχετικά μικρές ποσότητες φυτοφαρμάκων έχει άμεσες ή χρόνιες τοξικές επιδράσεις τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα μόρια των φυτοφαρμάκων, λόγω της δομικής τους ομοιότητας με ενδογενής ουσίες, μπορούν να εμπλακούν σε βιοχημικά μονοπάτια λειτουργώντας είτε ως αναστολείς/ενεργοποιητές ενζύμων είτε ως ενδοκρινικοί διαταρράκτες. Για αυτό τον λόγο και στο πλαίσιο της καλής γεωργικής πρακτικής η Ευρωπαϊκή Ένωση μέσω της Ευρωπαϊκής Αρχής Ασφάλειας Τροφίμων, αλλά και άλλοι οργανισμοί όπως η Αμερικανική EPA και ο διεθνής οργανισμός FAO του ΟΗΕ, έχουν θεσπίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στο νερό και στα τρόφιμα. Για την πλειοψηφία των ουσιών, σύμφωνα με τους κανονισμούς της Ε.Ε, το ανώτατο επιτρεπτό όριο για κάθε ουσία μεμονωμένα είναι η συγκέντρωση 0.1 ng/mL είναι, ενώ αν πρόκειται για μίγμα ουσιών το ανώτατο όριο είναι η συγκέντρωση 0.5 ng/mL.

Σήμερα η ανίχνευση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων για τον έλεγχο της ποιότητας του πόσιμου νερού που φτάνει στους καταναλωτές ή για περιβαλλοντικούς ελέγχους αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της ρουτίνας πολλών εργαστηρίων δημοσίων φορέων αλλά και ιδιωτικών εργαστηρίων. Οι κύριες μέθοδοι ανίχνευσης υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων είναι είτε με αέριο ή

υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με δίδυμη φασματομετρία μαζών ή τυποποιημένες συσκευασίες ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών σε φρεάτια μικροπιλοδότησης (ELISA kits). Τα κύρια μειονεκτήματα αυτών των μεθόδων είναι όσον αφορά στις ενζυμοανοσοχημικές ότι προσδιορίζουν συνήθως έναν μόνο αναλύτη, ενώ οι χρωματογραφικές προϋποθέτουν ογκώδη οργανολογία και απαιτούν συνήθως χρονοβόρες διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος. Η ανάγκη όμως για συνεχείς ελέγχους υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων κάνει επιτακτική την ανάπτυξη συσκευών που να επιτρέπουν την απλή, ταχεία και επιτόπια ανάλυση εκτός του χώρου του εργαστηρίου. Προς αυτήν την κατεύθυνση, η ανάπτυξη βιοαισθητήρων παρέχει την δυνατότητα για αξιόπιστες επιτόπιες αναλύσεις ενός αναλύτη ή μιας στοχευόμενης ομάδας αναλυτών και για το λόγο αυτό κερδίζει ολοένα και περισσότερο έδαφος κρίνοντας από τον αριθμό των σχετικών δημοσιεύσεων ανά έτος.

Σκοπός επομένως της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η ανάπτυξη ενός οπτικού ανοσοαισθητήρα, χωρίς την χρήση ιχνηθετών ο οποίος βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε πόσιμο νερό. Ο οπτικός ανοσοαισθητήρας καθώς και το λογισμικό λειτουργίας έχουν αναπτυχθεί από το εργαστήριο Οπτικών Βιοαισθητήρων του Ι.Ν.Ν. και το Εργαστήριο Ανοσοαναλύσεων-Ανοσοαισθητήρων του Ι.Π.Ρ.Ε.Τ.Ε.Α στο Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» σε συνεργασία με την εταιρία ThetaMetrisis. Η μετρητική διάταξη είναι απλή, η αισθητήρια επιφάνεια παρασκευάζεται χωρίς πολλαπλά στάδια λιθογραφιών και η καταγραφή του σήματος γίνεται σε πραγματικό χρόνο μέσω εξωτερικού φασματοφωτομέτρου. Ενεργοποιώντας βιολογικά διαφορετικές ζώνες της αισθητήριας επιφάνειας με πρωτεϊνικά συζεύγματα διαφορετικών φυτοφαρμάκων και «σαρώνοντας» την επιφάνεια παρέχεται η δυνατότητα ταυτόχρονης ανίχνευσής τους στο ίδιο δείγμα.

Ο οπτικός ανοσοαισθητήρας που αναπτύχθηκε στοχεύει στην ταυτόχρονη ανίχνευση δύο απαγορευμένων ζιζανιοκτόνων, των paraquat και atrazine και στον προσδιορισμό του ευρέως διαδεδομένου ζιζανιοκτόνου glyphosate σε πόσιμο νερό. Για την επίτευξη αυτού του στόχου, κατ' αρχήν παρασκευάστηκαν πρωτεϊνικά συζεύγματα των ζιζανιοκτόνων paraquat και glyphosate, επιλέχθηκαν

τα κατάλληλα αντισώματα από την διεθνή αγορά και αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν ενζυμοανοδοχημικοί προσδιορισμοί σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Ακολούθως τα πρωτόκολλα μεταφέρθηκαν στον οπτικό ανοσοαισθητήρα όπου βελτιστοποιήθηκαν εκ νέου όλες οι παράμετροι των ανοσοχημικών προσδιορισμών για καθέναν από τους αναλύτες καθώς και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των paraquat και atrazine. Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν αξιολογήθηκαν ως προς τα αναλυτικά τους χαρακτηριστικά, την ειδικότητα, την ακρίβεια και την δυνατότητα αναγέννησης, επαναχρησιμοποίησης και σταθερότητας της αισθητήριας επιφάνειας

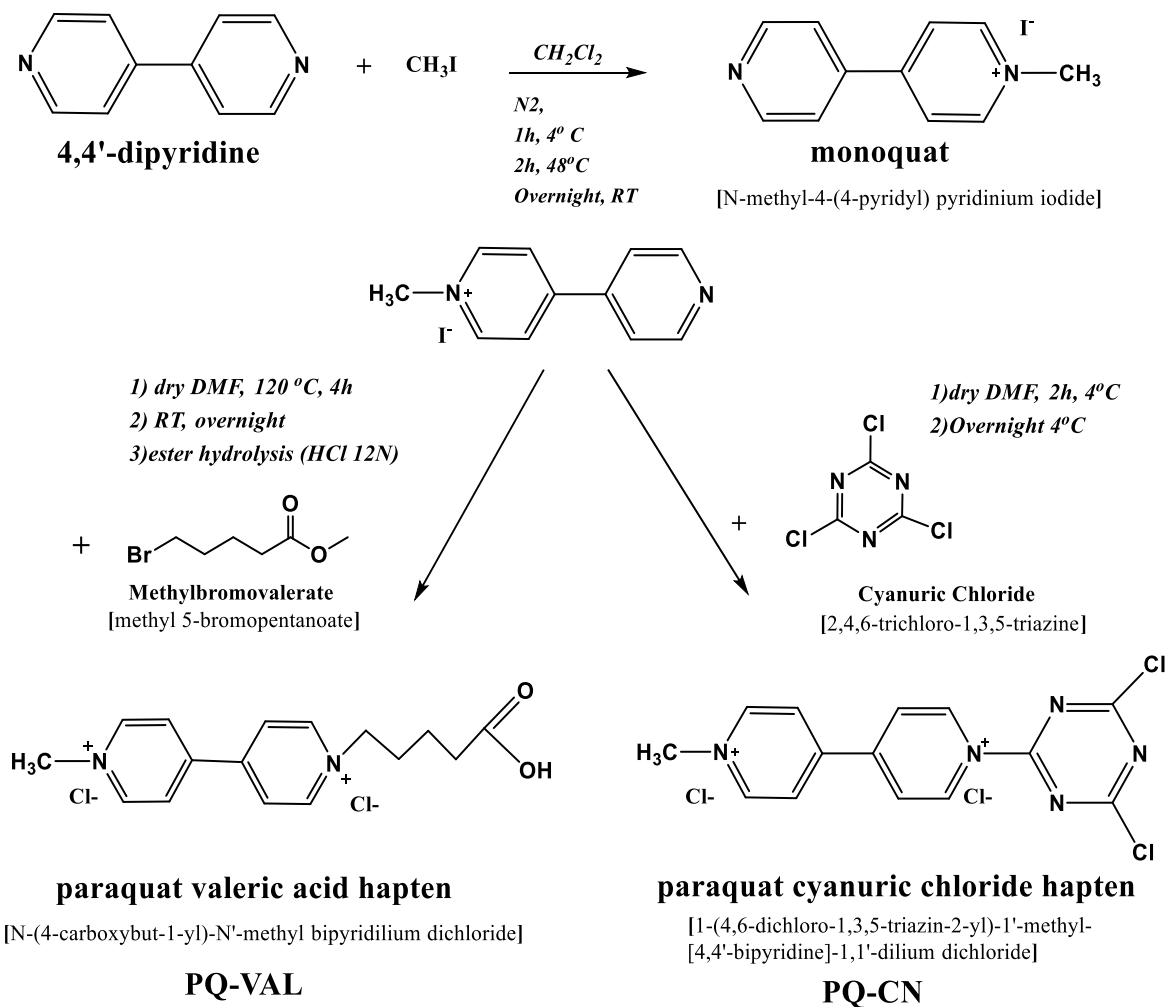
4 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΥΛΙΚΑ – ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1 Παρασκευή παραγώγων του paraquat

4.1.1 Αρχή Μεθόδου

Τα πρωτεϊνικά συζεύγματα μικρών μορίων όπως πχ., φυτοφαρμάκων, τοξινών, αντιβιοτικών κ.α., χρησιμοποιούνται είτε για την ανοσοποίηση ζώων, με στόχο την παραγωγή αντισωμάτων, είτε επιφανειών ως αντιδραστήρια για τον ανοσοχημικό τους προσδιορισμό. Για την σύζευξη αυτών των μορίων στις πρωτεΐνες είτε αξιοποιούνται δραστικές ομάδες που υπάρχουν στο μόριο ή παρασκευάζονται συνθετικά παράγωγα του μορίου τα οποία φέρουν κατάλληλες δραστικές ομάδες για σύζευξη στις πρωτεΐνες. Για το φυτοφάρμακο paraquat, το οποίο δεν φέρει στο μόριο του δραστικές ομάδες, έχει αναφερθεί στην βιβλιογραφία μια ποικιλία μεθόδων σύνθεσης πρωτεϊνικών συζευγμάτων μέσω παρασκευής κατάλληλων παραγώγων. Για τους σκοπούς της παρούσας διατριβής επιλέχθηκαν δύο μέθοδοι της βιβλιογραφίας [107, 117] και παρασκευάστηκαν παράγωγα τα οποία έφεραν μια πλευρική ομάδα βαλερικό οξύ και το κυανουρικό χλωρίδιο. Η συνθετική πορεία ξεκίνησε με την παρασκευή monoquat μέσω αντίδρασης του 4,4'-διπυριδιλίου με ιωδομεθάνιο σε αδρανή ατμόσφαιρα. Στη συνέχεια το monoquat iodide αυτής αντέδρασε α) με μέθυλο βρωμοβαλερικό εστέρα ώστε να παραχθεί ο βαλερικός εστέρας του 1^{ου} παραγώγου (PQ-VAL) η υδρόλυση του οποίου έδωσε το επιθυμητό προϊόν, και β) με κυανουρικό χλωρίδιο για την παρασκευή του 2^{ου} παραγώγου (PQ-CN). Στην Εικόνα 19 φαίνονται σχηματικά τα στάδια των αντιδράσεων, οι ονομασίες κατά IUPAC των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων και οι κωδικές ονομασίες που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή για λόγους συντομίας.



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση της συνθετικής πορείας για την παρασκευή των δύο παραγώγων του paraquat με βρωμοβαλερικό εστέρα και κυανουρικό χλωρίδιο. Φαίνονται επίσης οι ονομασίες κατά IUPAC των ενδιάμεσων και τελικών προϊόντων και οι κωδικές ονομασίες των απενίων.

4.1.2 Υλικά-Όργανα

- 4,4'- διπυριδύλιο (4,4'-Dipyridyl, 98%, anhydrous, Acros Organics)
- Ιωδομεθάνιο (Iodomethane, 99%, stabilized, Acros Organics)
- Μέθυλο βρωμοβαλερικός εστέρας
- Κυανουρικό χλωρίδιο
- Άνυδρο διχλωρομεθάνιο
- Άνυδρο διμέθυλοφορμαμίδιο
- Διαιθυλαιθέρας

- Ακετόνη
- Μεθανόλη
- HCl
- Περιστροφικός συμπυκνωτής (Buchi, R114)
- Ξηραντήρας κενού παρουσία P₂O₅
- Φασματοόμετρο ¹H-NMR, 500 MHz DRX-Avance, Bruker Τα φάσματα ελήφθησαν σε διάλυμα DMSO-d₆ και D₂O σε θερμοκρασία 25°C. Οι χημικές μετατοπίσεις (δ, ppm) υπολογίστηκαν με τη χρήση τετραμεθυλοσιλανίου, TMS, ως εσωτερικού προτύπου. (Παράρτημα I)

4.1.3 Πορεία Εργασίας

4.1.3.1 Παρασκευή του παραγώγου του paraquat με βαλερικό οξύ

Η σύνθεση του παραγώγου του paraquat με βαλερικό οξύ (PQ-VAL) πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια ξεκινώντας από 4,4' διπυριδύλιο. Αρχικά παρασκευάστηκε από 4,4'-διπυριδύλιο το μετά ιωδίου άλας του monoquat. Για το σκοπό αυτό σε ξηρή σφαιρική φιάλη μεταφέρονται 1.8 g (11.5 mmol) 4,4'-διπυριδύλιο και 1.6 g (11.2 mmol) ιωδομεθάνιο και διαλύθηκαν σε 10 mL ξηρού διχλωρομεθανίου. Η φιάλη πωματίστηκε και δημιουργήθηκε αδρανής ατμόσφαιρα με μπαλονάκι N₂. Το μίγμα αναδεύτηκε για 1h σε παγόλουτρο στους 4 °C οπότε και παρατηρήθηκε καταβύθιση κίτρινου ιζήματος. Ακολούθησε βρασμός με αναρροή για 2h στους 40 °C και το μίγμα αφέθηκε να ψηχθεί σε θερμοκρασία δωματίου. Το κίτρινο ίζημα που είχε σχηματισθεί παραλήφθηκε με διήθηση σε χάρτινο ηθμό υπό κενό και ακολούθησε έκπλυση του ιζήματος με παγωμένη ακετόνη και διαιθυλαιθέρα και ξήρανση σε ξηραντήρα κενού. Μετά από ανακρυστάλλωση με αιθανόλη 95%, διήθηση και ξήρανση παραλήφθηκαν 1.73 g (75% απόδοση) προϊόντος, η καθαρότητα του οποίου ελέγχθηκε με ¹H-NMR και διαπιστώθηκε ότι παραλήφθηκε ένα προϊόν, το monoquat. Ακολούθησε σύζευξη του monoquat με τον βρωμοβαλερικό εστέρα. Σε 10 mL άνυδρου διμεθυλοφορμαμιδίου διαλύθηκαν 443 mg (2.6 mmol) monoquat και 295 mg (1.5 mmol) μέθυλο βρωμοβαλερικός εστέρας. Το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει υπό ανάδευση με αναρροή σε αδρανή ατμόσφαιρα για 4h στους 120 °C και εν

συνεχεία σε θερμοκρασία δωματίου για 16 hrs. Με διήθηση υπό κενό παραλήφθηκε ίζημα πορτοκαλί χρώματος (481 mg, 1.7 mmol, 65% απόδοση) το οποίο αντιστοιχεί στο βαλερικό εστέρα του paraquat. Το τελευταίο στάδιο περιλαμβάνει την υδρόλυση του εστέρα που παρασκευάστηκε προς το αντίστοιχο οξύ που είναι και το επιθυμητό τελικό προϊόν. Έτσι 481 mg ή 1.7 mmol από βαλερικό εστέρα του paraquat διαλύθηκαν σε 5 mL πυκνό HCl και ακολούθησε βρασμός με επαναροή για 1h. Το διάλυμα συμπυκνώθηκε μέχρι ξηρού σε περιστροφικό συμπυκνωτή και παρελήφθη το στερεό υπόλειμμα το οποίο διαλύθηκε στον ελάχιστο απαιτούμενο όγκο ακετόνης και ανακρυσταλλώθηκε από 95% αιθανόλη παρέχοντας το καθαρό τελικό προϊόν (388 mg, 1.4 mmol, 85% απόδοση).

4.1.3.2 Παρασκευή του παραγώγου του paraquat με κυανουρικό χλωρίδιο

Το monoquat που συντέθηκε όπως περιγράφεται στην § 5.1.3.1 χρησιμοποιήθηκε ως πρώτη ύλη και για την παρασκευή του παραγώγου με κυανουρικό χλωρίδιο. Για τον σκοπό αυτό, 500 mg (2.9 mmol) monoquat και 768 mg (3.6 mmol) κυανουρικό χλωρίδιο διαλύθηκαν σε 25 mL άνυδρο διμεθυλοφορμαμίδιο και αφέθηκαν να αντιδράσουν υπό ανάδευση σε παγόλουτρο 4 °C για 16 hrs σε αδρανή ατμόσφαιρα (μπαλονάκι N₂). Καταβυθίστηκε ίζημα καφέ χρώματος το οποίο επαναιωρήθηκε σε 20 mL διαιθυλαιθέρα και στη συνέχεια διηθήθηκε υπό κενό, εκπλύθηκε με διαιθυλαιθέρα και ξηράνθηκε σε ξηραντήρα κενού. Ακολούθησε ανακρυστάλλωση με 95% αιθανόλη από όπου παραλήφθηκε το τελικό προϊόν το οποίο αντιστοιχεί στο παράγωγο του paraquat με κυανουρικό χλωρίδιο (PQ-CN) με απόδοση αντίδρασης 41% (700 mg, 1.2 mmol).

4.2 Παρασκευή πρωτεϊνικών συζευγμάτων για τα paraquat & glyphosate

4.2.1 Αρχή Μεθόδου

Τα παράγωγα του paraquat που παρασκευάστηκαν όπως περιγράφηκε στην ενότητα 5.1 καθώς και το glyphosate συζεύχθηκαν με φέρουσες πρωτεΐνες

με σκοπό την διευκόλυνση της ακινητοποίησής τους μέσω χημικής προσρόφησης είτε σε φρεάτια μικροτιλοδότησης από πολυστυρένιο είτε στην επιφάνεια των ψηφίδων πυριτίου του αισθητήρα. Οι φέρουσες πρωτεΐνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αλβουμίνη ορού βοός και οβαλβουμίνη. Το πρωτόκολλο σύζευξης που ακολουθήθηκε για το glyphosate περιελάμβανε την ενεργοποίηση του καρβοξυλομάδων της φέρουσας πρωτεΐνης με ένα υδατοδιαλυτό καρβοδιϊμίδιο παρουσία σουλφο-N-υδροξυ ηλεκτριμιδίου και στη συνέχεια αντίδραση των ενεργοποιημένων καρβοξυλίων με την δευτεροταγή αμινομάδα του φυτοφαρμάκου. Δοκιμάστηκε και η αντίστροφη πορεία, δηλαδή ενεργοποίηση αρχικά της καρβοξυλικής ομάδας του glyphosate και αντίδρασή της στη συνέχεια με τις ε-αμινομάδες των καταλοίπων λυσίνης της φέρουσας πρωτεΐνης. Και με τους δύο τρόπους ενεργοποίησης δημιουργείται σταθερός αμιδικός δεσμός μεταξύ του glyphosate και της πρωτεΐνης. Η διαφορά έγκειται στο γεγονός ότι το συζευγμένο στην πρωτεΐνη glyphosate «εκθέτει» άλλο μέρος του μορίου του προς το διάλυμα και επομένως το αντίσωμα όπως φαίνεται από την Εικόνα 21. Όσον αφορά στην παρασκευή των συζευγμάτων του paraquat και συγκεκριμένα στην περίπτωση του παραγώγου με το βαλερικό οξύ η ενεργοποίηση της καρβοξυλομάδας του παραγώγου και η αντίδραση με διαθέσιμες αμινο-ομάδες στο μόριο της πρωτεΐνης ήταν μονόδρομος. Αντίθετα, το παράγωγο που φέρει ομάδα κυανουρικού χλωριδίου αντιδρά άμεσα με τις αμινομάδες της πρωτεΐνης σε αλκαλικό pH παρουσία τριαιθυλαμίνης.

4.2.2 Υλικά – Όργανα

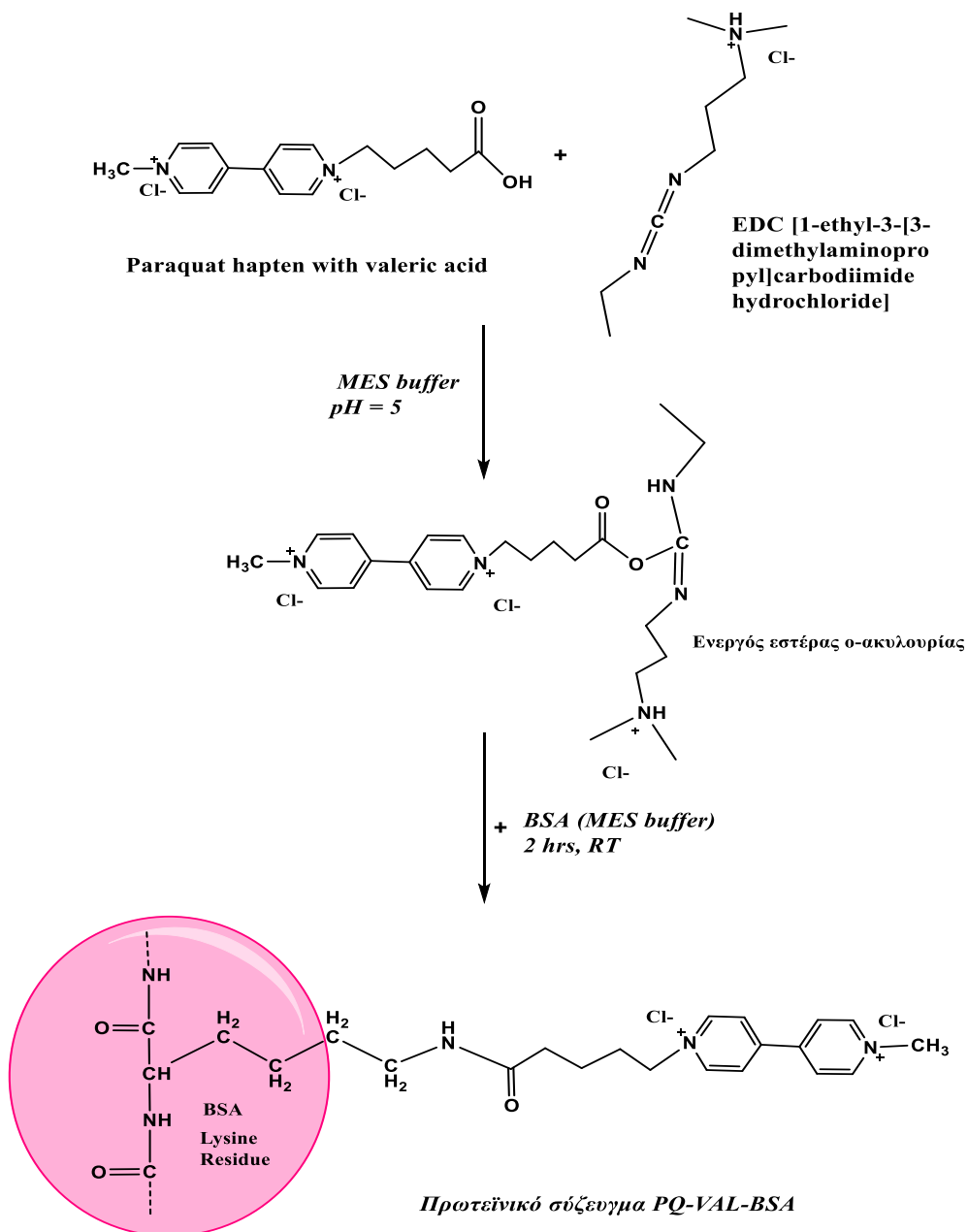
- Αλβουμίνη ορού βοός (Bovine Serum Albumin, Sigma St Louis, Mo., USA)
- Οβαλβουμίνη (Ovalbumin, OVA, Sigma, St Louis, Mo., USA)
- Glyphosate (Sigma St Louis, Mo., USA)
- Paraquat valeric acid (PQ-VAL)
- Paraquat cyanuric chloride (PQ-CN)
- Maleic anhydride (Sigma St Louis, Mo., USA)

- EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride, Sigma St Louis, Mo., USA)
- S-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide, Sigma St Louis, Mo., USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα MES 0.1M (2-[N-morpholino]ethane sulfonic acid) pH 5.0, 0.5 M NaCl
- Ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 100 mM ή 50 mM, pH 7.2 ή 7.4, 0.15 M NaCl
- Διάλυμα NaHCO_3 0.1M, pH 8.5, 0.15 M NaCl, 0.05 mg/mL NaN_3
- Μονόξινο και δισόξινο φωσφορικό κάλιο (K_2HPO_4 & KH_2PO_4)
- Μεμβράνη Διαπίδυσης (cutoff 12000 Da, Sigma, St Louis, Mo., USA)

4.2.3 Πορεία Εργασίας

4.2.3.1 Παρασκευή των πρωτεϊνικών συζευγμάτων του paraquat

Για την προετοιμασία του πρωτεϊνικού συζεύγματος του paraquat με φέρουσα πρωτεΐνη αλβουμίνη ορού βοός ποσότητα του παραγώγου με βαλερικό οξύ (PQ-VAL) διαλυτοποιήθηκε σε με ρυθμιστικό διάλυμα MES 0.1 M pH 5, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 6 mg/mL. Αντιστοίχως, ποσότητα BSA διαλυτοποιήθηκε στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 13 mg/mL. Σε υάλινο σωλήνα μεταφέρθηκαν όγκοι από τα δύο διαλύματα σε αναλογία 7 μέρη διαλύματος paraquat προς 4 μέρη διαλύματος πρωτεΐνης. Στο μίγμα αυτό προστέθηκαν στάγδην 100 μL υδατικού διαλύματος καρβοδιιμιδίου EDC συγκέντρωσης 10 mg/mL. Το τελικό μίγμα της αντίδρασης αφέθηκε για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος.



Εικόνα 20: Τα στάδια σύζευξης paraquat αλβουμίνη ορού βοός με χρήση του αντιδραστήριου EDC (1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride).

Ακολούθησε μεταφορά του μίγματος σε μεμβράνη διαπίδυσης με cutoff 12000 Da και διαπίδυση ως προς NaHCO₃ 0.1M pH 8.5, 0.15 M NaCl, 0.05 mg/mL NaN₃ στους 4 °C. Το προϊόν της σύζευξης παραλήφθηκε και φυλάχθηκε στους 4 °C.

Για την παρασκευή του πρωτεϊνικού συζεύγματος του paraquat με χρήση του παραγώγου με κυανουρικό χλωρίδιο, ποσότητα του παραγώγου διαλύθηκε

σε μίγμα 3:7 ρυθμιστικού διαλύματος ανθρακικών pH 9.3/ διμεθυλοσουλφοξειδίου σε τελική συγκέντρωση 1 mg/mL. Επίσης ποσότητα BSA διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών 50 mM, pH 9.3, σε τελική συγκέντρωση 2 mg/mL. Αναμίχθηκαν ίσοι όγκοι από τα διαλύματα της πρωτεΐνης και του παραγώγου και αφέθηκαν να αντιδράσουν για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη διαπίδυσης με cutoff 12000 Da και διαπίδυση ως προς NaHCO₃ 0.1M, pH 8.5, στους 4 °C. Το προϊόν της σύζευξης παραλήφθηκε και φυλάχτηκε στους 4 °C.

4.2.3.2 Παρασκευή των πρωτεϊνικών συζευγμάτων του glyphosate

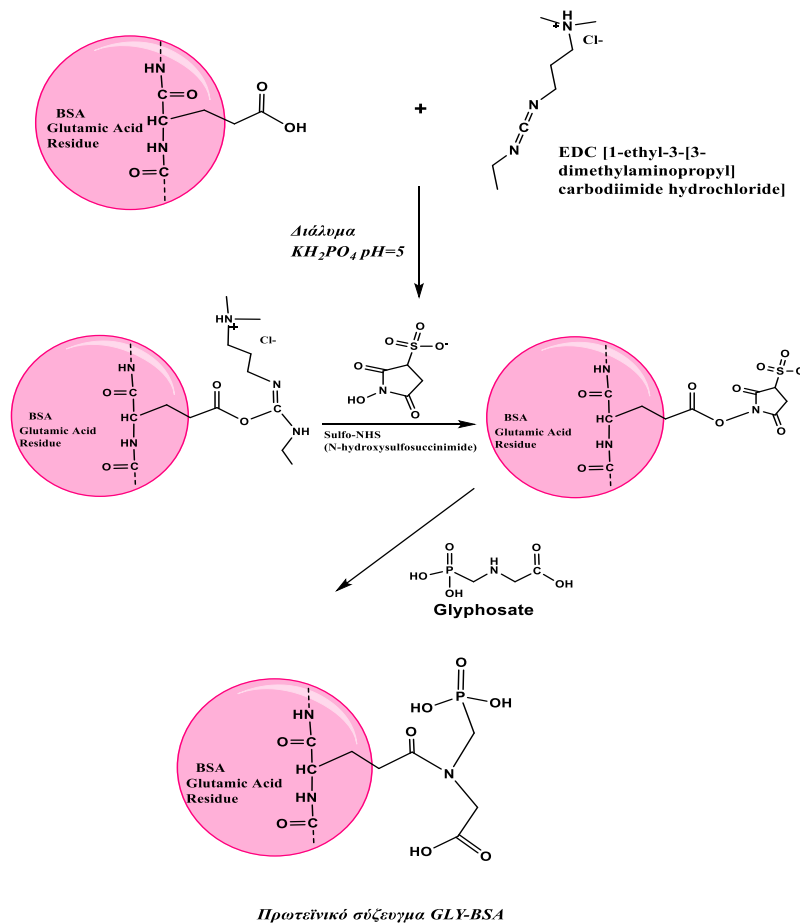
❖ Πρωτόκολλο απευθείας σύζευξης

Ποσότητα πρωτεΐνης, οβαλβουμίνης ή αλβουμίνης ορού βοός διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα MES 0.1 M, pH 5 ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 10 mg/mL. Επίσης ποσότητα glyphosate διαλυτοποιήθηκε στο ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα σε τελική συγκέντρωση 4 mg/mL. Σε υάλινο σωλήνα αναμίχθηκαν 200 μL διαλύματος πρωτεΐνης και 500 μL διαλύματος glyphosate. Κατόπιν στο σωλήνα προστίθενται στάγδην 100 μL διαλύματος (EDC)1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide σε δισ απεσταγμένο νερό συγκέντρωσης 10 mg/ml. Το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος για δύο ώρες με ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη διαπίδυσης με cutoff 12000 Da και διαπίδυση ως προς NaHCO₃ 0.1M, pH 8.5, 0.15 M NaCl, 0.05 mg/mL NaN₃ στους 4 °C. Το προϊόν της σύζευξης παραλήφθηκε και φυλάχτηκε στους 4 °C.

❖ Πρωτόκολλο σύζευξης δύο σταδίων I

Αλβουμίνης ορού βοός διαλυτοποιήθηκε σε διάλυμα KH₂PO₄ 0.1 M, pH 5.0, σε τελική συγκέντρωση 3 mg/mL. Ποσότητα διαλύθηκε σε διάλυμα K₂HPO₄ 0.1 M, pH 8.5 σε τελική συγκέντρωση 20 mg/mL. Σε υάλινο σωλήνα μεταφέρθηκαν 5 mL διαλύματος πρωτεΐνης και προστέθηκαν 40 mg EDC και 5 mg S-NHS. Το μίγμα αναδεύτηκε και αφέθηκε να αντιδράσει για 5 min σε θερμοκρασία

δωματίου. Στη συνέχεια προστέθηκε ίσος όγκος διαλύματος glyphosate και το τελικό μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 16-18 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Ακολούθησε διαπίδυση ως προς ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (PBS 50 mM, pH 7.4, 0.05 mg/mL NaN_3) στους 4 °C. Το προϊόν της σύζευξης παραλήφθηκε και φυλάχθηκε στους 4 °C



Εικόνα 21: Στάδια σύζευξης του glyphosate με οβαλβουμίνη ορού βοός με χρήση των αντιδραστηρίων EDC & S-NHS.

❖ Πρωτόκολλο σύζευξης δύο σταδίων II

Ποσότητα οβαλβουμίνης διαλυτοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα MES 0.1 M, pH 5.0, 0.5 M NaCl σε τελική συγκέντρωση 1 mg/L. Σε 1 mL διαλύματος πρωτεΐνης προστέθηκαν 0.4 mg EDC και 1.1 mg sulfo-NHS και το μίγμα αναδεύτηκε και αφέθηκε να αντιδράσει για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Παράλληλα σε υάλινο σωλήνα παρασκευάστηκε διάλυμα

glyphosate συγκέντρωσης 10 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS. Στο μίγμα της αντίδρασης προστέθηκαν 100 μ L από το διάλυμα του glyphosate και η ενεργοποιημένη πρωτεΐνη αφέθηκε να αντιδράσει με το glyphosate σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες υπό ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη διαπίδυσης με cutoff 12000 Da και διαπίδυση ως προς NaHCO_3 0.1M, pH 8.5, 0.15 M NaCl, 0.05 mg/mL NaN_3 στους 4 $^\circ\text{C}$. Το προϊόν της σύζευξης παραλήφθηκε και φυλάχθηκε στους 4 $^\circ\text{C}$.

❖ Πρωτόκολλο σύζευξης δύο σταδίων III

Παρασκευάστηκε διάλυμα αλβουμίνης ορού βοός τελικής συγκέντρωσης 1 mg/mL σε διάλυμα NaHCO_3 50 mM, pH 8.5. Σε 2 mL αυτού του διαλύματος προστέθηκε ποσότητα μηλεϊνικού ανυδρίτη ίση με x200 της ποσότητας της πρωτεΐνης. Το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει για δύο ώρες σε θερμοκρασία δωματίου και στη συνέχεια διαπιδύθηκε ολονυκτίως ως προς ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7.4, στους 4 $^\circ\text{C}$. Μετά την διαπίδυση, στο διάλυμα προστέθηκαν 0.8 mg EDC και 2.2 mg sulfo-NHS και το μίγμα αναδεύτηκε και αφέθηκε να αντιδράσει για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Στη συνέχεια προστέθηκαν 30 μ L υδατικού διαλύματος glyphosate συγκέντρωσης 20 mg/mL και το μίγμα αφέθηκε να αντιδράσει για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου σε σκοτεινό μέρος. Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη διαπίδυσης με cutoff 12000 Da και διαπίδυση ως προς NaHCO_3 0.1M, pH 8.5, 0.15 M NaCl, 0.05 mg/mL NaN_3 στους 4 $^\circ\text{C}$. Το προϊόν της σύζευξης παραλήφθηκε και φυλάχθηκε στους 4 $^\circ\text{C}$.

4.3 Τροποποίηση αντισωμάτων με βιοτίνη (βιοτινυλίωση)

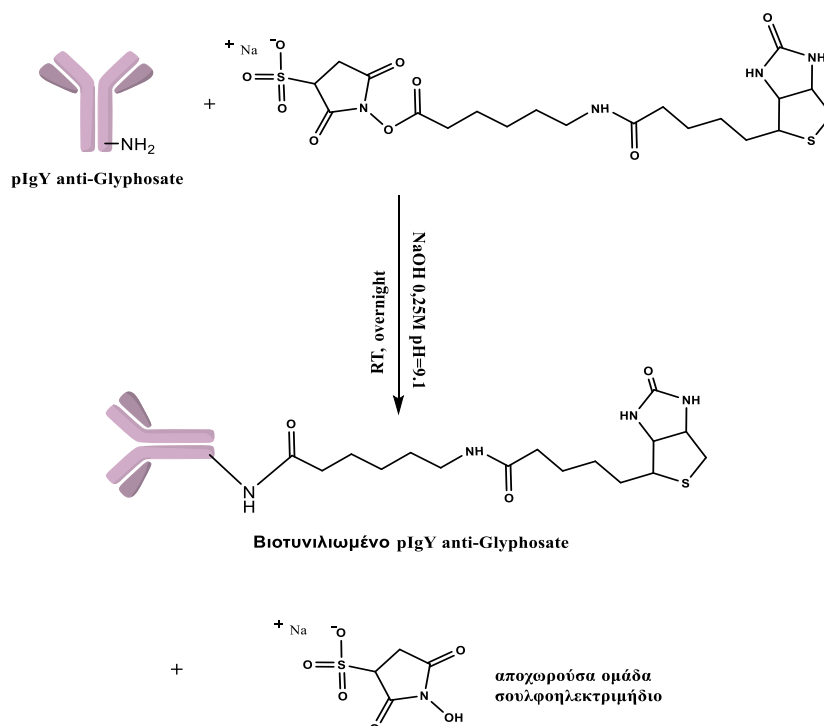
4.3.1 Αρχή μεθόδου

Η βιοτινυλίωση πολυκλωνικών ή μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι μια αντίδραση που εισάγει πολλαπλά μόρια βιοτίνης ανά μόριο αντισώματος. Χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο σουλφοηλεκτριμήδυλο εστέρας του 6-[(βιοτινόυλο)άμινο] εξανοϊκού οξέος (Sulfo-NHS-LC-biotin) σχηματίζεται πεπτιδικός δεσμός μεταξύ της ενεργοποιημένης καρβοξυλομάδας της βιοτίνης και

των ελεύθερων αμινομάδων του αντισώματος, κυρίως μέσω της πλευρικής ε-αμινομάδας των καταλοίπων λυσίνης. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής βιοτινυλιώθηκαν ένα αντίσωμα όρνιθας έναντι του glyphosate και ένα αντίσωμα αίγας έναντι των γ-σφαιρινών κουνελιού (Εικόνα 22).

4.3.2 Υλικά – Όργανα

- Πολυκλωνικό αντίσωμα όρνιθας έναντι του glyphosate (anti-glyphosate IgY 5 mg/mL, Sigma Sigma St Louis, Mo., USA)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα αίγας έναντι γ-σφαιρινών κουνελιού (Goat anti-rabbit IgG 1 mg/mL)
- Σουλφοηλεκτριμήδυλο εστέρας του 6-[(βιοτινούλο)αμινο] εξανοϊκού οξέος (Molecular Probes, Eugene, Or, USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 1M, pH 9.2
- Διάλυμα NaHCO_3 0.1M pH 8.5, 0.15 M NaCl, 0.05 mg/mL NaN_3
- Μεμβράνη Διαπίδωσης (cutoff 12000 Da Sigma, St Louis, Mo., USA)



Εικόνα 22: Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης βιοτινυλίωσης του ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος όρνιθας έναντι του ζιζανιοκτόνου glyphosate.

4.3.3 Πορεία Εργασίας

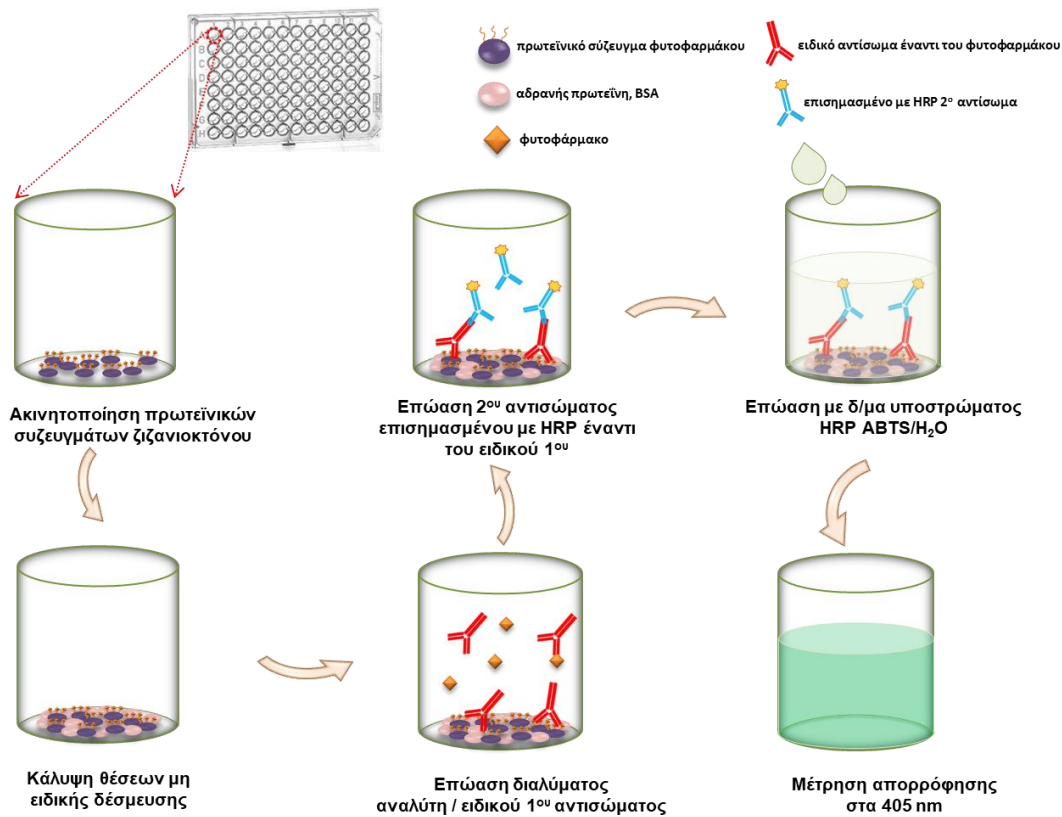
Ποσότητα αντισώματος (~ 1mg) διαπιδύεται ολονυκτίως ως προς 0.9% (w/v) NaCl. Παραλαμβάνεται το διάλυμα του αντισώματος και προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα Na₂CO₃/NaHCO₃ 1M, pH 9.2 σε αναλογία όγκου 1:3. Στο διάλυμα αυτό προστίθεται κατάλληλος όγκος διαλύματος Sulfo-NHS-LC-biotin συγκέντρωσης 100 mg/mL σε DMSO ώστε η κατά βάρος αναλογία ενεργοποιημένου εστέρα βιοτίνης προς το αντίσωμα να είναι 1:1,5. Το μίγμα αφήθηκε να αντιδράσει σε θερμοκρασία δωματίου για δύο ώρες υπό ανάδευση σε τακτά χρονικά διαστήματα. Ακολούθησε μεταφορά σε μεμβράνη διαπίδυσης με cutoff 12000 Da και διαπίδυση ως προς NaHCO₃ 0.1M, pH 8.5, 0.15 M NaCl, 0.05 mg/mL NaN₃ στους 4 °C. Το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα παραλήφθηκε και φυλάχτηκε στους 4 °C.

4.4 Ενζυμοανοσοχημικές μέθοδοι ανταγωνιστικού τύπου για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων

4.4.1 Αρχή Μεθόδου

Ο ανοσοχημικός προσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου βασίζεται στον ανταγωνισμό μεταξύ του ακινητοποιημένου στην στερεή επιφάνεια φυτοφαρμάκου ή του επισημασμένου φυτοφαρμάκου με το ελεύθερο φυτοφάρμακο στο δείγμα για τις θέσεις δέσμευσης του ειδικού αντισώματος. Ένας ανοσοχημικός προσδιορισμός ανταγωνιστικού τύπου μπορεί να έχει διαφορετικές διαμορφώσεις ανάλογα με το αν στη στερεή επιφάνεια έχει ακινητοποιηθεί 1) το ειδικό έναντι του φυτοφαρμάκου αντίσωμα είτε απευθείας είτε μέσω ενός δεύτερου αντισώματος (δηλαδή αντισώματος που έχει αναπτυχθεί έναντι των γ-σφαιρινών του είδους στο οποίο έχει αναπτυχθεί το ειδικό αντίσωμα) ή 2) το φυτοφάρμακο αφού πρώτα έχει συνδεθεί ομοιοπολικά σε μια φέρουσα πρωτεΐνη για την δημιουργία ενός πρωτεϊνικού συζεύγματος. Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής ακολουθήθηκε η 2^η διαμόρφωση (Εικόνα 23) όπου μετά την ακινητοποίηση του πρωτεϊνικού συζεύγματος του φυτοφαρμάκου και τον

αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων δέσμευσης της στερεής επιφάνειας, προστίθεται μίγμα προτύπων διαλυμάτων φυτοφαρμάκου ή δειγμάτων προς ανάλυση με το ειδικό έναντι του φυτοφαρμάκου αντίσωμα. Στο στάδιο αυτό λαμβάνει χώρα ο ανταγωνισμός, με αποτέλεσμα το ειδικό αντίσωμα που περιέχεται στο μίγμα να προσδένεται στο ακινητοποιημένο στην επιφάνεια φυτοφάρμακο με αντιστρόφως ανάλογη σχέση ως προς την συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου στο πρότυπο διάλυμα ή στο δείγμα. Συνεπώς απουσία φυτοφαρμάκου παρατηρείται η μέγιστη δέσμευση του αντισώματος στο ακινητοποιημένο στην στερεά επιφάνεια φυτοφάρμακο. Ακολούθως προστίθεται δεύτερο αντίσωμα επισημασμένο συνηθέστερα με το ένζυμο υπεροξειδάση της ραπανίδος (HRP) το οποίο προσδένεται στα ακινητοποιημένα ανοσοσυμπλέγματα. Η ανίχνευση των ακινητοποιημένων ανοσοσυμπλεγμάτων πραγματοποιείται με προσθήκη χρωμογόνου υποστρώματος της υπεροξειδάσης H_2O_2 /ABTS και μέτρηση της οπτικής απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Η ποσοτικοποίηση των αποτελεσμάτων γίνεται μέσω κατασκευής καμπύλης βαθμονόμησης των τιμών απορρόφησης των προτύπων διαλυμάτων φυτοφαρμάκου συναρτήσει της συγκέντρωσης του φυτοφάρμακου στα πρότυπα διαλύματα και κατασκευή της ευθείας παλινδρόμησης μέσω της οποίας μπορεί να προσδιοριστεί και η συγκέντρωση του φυτοφαρμάκου σε ένα εξεταζόμενο δείγμα.



Εικόνα 23: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων ανταγωνιστικού τύπου ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού φυτοφαρμάκου σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης.

4.4.2 Υλικά – Όργανα

- Πρότυπα διαλύματα paraquat, atrazine, glyphosate
- Πρωτεϊνικά συζεύγματα των φυτοφαρμάκων
- Πολυκλωνικό αντίσωμα όρνιθας έναντι του glyphosate (anti-glyphosate IgY, Sigma St Louis, Mo., USA)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του atrazine (anti-atrazine rabbit polyclonal antibody, United Immunoassay San Bruno, California)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του paraquat (anti-paraquat antibody, Selective Antibodies Ltd Newcastle upon Tyne, UK)
- Επισημασμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδος (HRP) αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού (goat anti-mouse IgG HRP Sigma St Louis, Mo., USA)

- Επισημασμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδος (HRP) αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού (goat anti-rabbit IgG HRP, Sigma St Louis, Mo., USA)
- Επισημασμένο με υπεροξειδάση της ραπανίδος (HRP) αντίσωμα κουνελιού κατά των γ-σφαιρινών όρνιθας (rabbit anti-chicken IgY HRP, Sigma St Louis, Mo., USA)
- Ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης: $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$ 50 mM, pH 9.2
- Διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμησης πλαστικού: NaHCO_3 0.1 M, pH 8.5, 1% (w/v) BSA
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης I: $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.4, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης II: Tris/HCl 50 mM, pH 8.9, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) γ-σφαιρίνες βοός
- Διάλυμα έκπλυσης: Tris/HCl 10 mM, pH 8.25, 0.9% (w/v) NaCl, 0.05% (w/v) Tween-20
- Διάλυμα αραίωσης επισημασμένου 2^{ου} αντισώματος: Tris/HCl 0,15 M, pH 8.25, 0.5% (w/v) BSA, 0.02% (w/v) thimerosal
- Ρυθμιστικό διάλυμα υποστρώματος υπεροξειδάσης: φωσφορικών/κιτρικών 0.05 M, pH 4.4, 3.2 mM $\text{NaBO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 1.9 mM ABTS
- Διαφανή φρεάτια μικροτιπλοδότησης (Greiner-Bio-one, Germany)
- Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης Victor³, Multilabel Readers (Perkin Elmer, USA)
- Πεχάμετρο, Model pH 127 (Xenon, Ελλάδα)

4.4.3 Πορεία Εργασίας μεθόδων ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού για τα ζιζανιοκτόνα paraquat, atrazine και glyphosate σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης

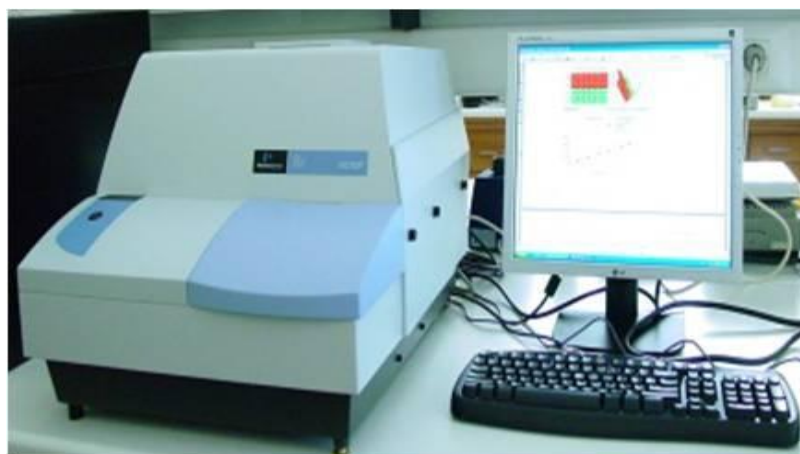
Φρεάτια μικροτιπλοδότησης επώαστηκαν με 100 μL διαλύματος πρωτεϊνικού συζεύγματος φυτοφαρμάκου, κατάλληλης συγκέντρωσης (Πίνακας 1) σε διάλυμα ακινητοποίησης για 16-18 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε απόχυση, έκπλυση των φρεατίων δύο φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης και επώαση

για 1 h σε RT με 300 μL διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων. Κατόπιν τα φρεάτια εκπλύθηκαν ξανά δις με διάλυμα έκπλυσης και προστέθηκαν σε αυτά 100 μL μίγματος 1:1 κατά όγκο προτύπου διαλύματος φυτοφαρμάκου ή εμβολιασμένου δείγματος νερού με διάλυμα του ειδικού έναντι του φυτοφαρμάκου αντισώματος. Στην περίπτωση του atrazine το μίγμα προτύπου διαλύματος ή δείγματος/ειδικού αντισώματος είχε προεπωαστεί για 30 min, στην περίπτωση του glyphosate τα πρότυπα διαλύματα/εμβολιασμένα δείγματα είχαν αντιδράσει με διάλυμα ηλεκτρικού ανυδρίτη 20% w/v σε κατά όγκο αναλογία 100:2 για 15 min σε RT, ενώ στην περίπτωση του paraquat το μίγμα προστέθηκε απευθείας στα φρεάτια μικροπιλοδότησης.

Για όλα τα φυτοφάρμακα η ανοσοαντίδραση διήρκησε 30 min υπό ανάδευση. Ακολούθως, τα φρεάτια εκπλύθηκαν τέσσερις φορές με 300 μL διαλύματος έκπλυσης και προστέθηκε διάλυμα του αντίστοιχου δεύτερου αντισώματος επισημασμένου με και επωάστηκαν υπό ανάδευση για άλλα 30 min. Ακολούθησε έκπλυση όπως προηγουμένως και προσθήκη 100 μL διαλύματος υποστρώματος HRP και ανάδευση επί 30 min σε RT. Η οπτική απορρόφηση μετράται στα 405 nm με τη συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης φρεατίων μικροπιλοδότησης όπως φαίνεται στην Εικόνα 6. Οι συγκεντρώσεις τόσο των ειδικών όσο και των δευτέρου αντισωμάτων παρατίθενται στον Πίνακα 4.

Πίνακας 4: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων των τελικών πρωτοκόλλων για τον ενζυμοανοδοχημικό προσδιορισμό των ζιζανιοκτόνων atrazine, paraquat & glyphosate σε φρεάτια μικροπιλοδότσης

Φυτοφάρμακο	Συγκέντρωση ακινητοποιημένου πρωτεϊνικού συζεύγματος	Συγκέντρωση ειδικού αντισώματος	Συγκέντρωση επισημασμένου με HRP 2 ^{ου} αντισώματος
atrazine	0.1 µg/mL	0.5 µg/mL	1:1500 αραίωση αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού
paraquat	0.75 µg/mL	1:30000 αραίωση ειδικού αντισώματος ποντικού	1:2000 αραίωση αντισώματος αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού
glyphosate	1 µg/mL	10 µg/mL	1:1000 αραίωση αντισώματος κουνελιού κατά των Υ-σφαιρινών όρνιθας



Εικόνα 24: Συσκευή μέτρησης οπτικής απορρόφησης σε φρεάτια μικροπιλοδότσης, Victor³ Multilabel Readers (PerkinElmer, USA)

4.5 Υδροφιλοποίηση αισθητήριας επιφάνειας

4.5.1 Αρχή Μεθόδου

Η υδροφιλοποίηση των επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου είναι μια διεργασία που αποσκοπεί στον καθαρισμό των ψηφίδων από διάφορους ρύπους και οργανικά κατάλοιπα κατά την παραμονή τους μετά την διαδικασία της θερμικής οξειδωσης. Εκτός από καθαρισμό, η διεργασία αυτή εμπλουτίζει την επιφάνεια της ψηφίδας με ελεύθερες ομάδες σιλανόλων, οι οποίες μπορούν να αντιδράσουν σε επόμενο στάδιο με οργανοσιλάνια ή πολυμερή επιτρέποντας την χημική ενεργοποίηση της επιφάνειας. Η υδροφιλοποίηση μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο με τρόπους είτε: 1) με εμβάπτιση της ψηφίδας σε μίγμα πυκνού H_2SO_4 / H_2O_2 (1:1) (Piranha solution) ή 2) με κατεργασία με πλάσμα οξυγόνου.

4.5.2 Υλικά – Όργανα

- Δισκίδια πυριτίου (Si-Mat, Germany) στα οποία είχε αναπτυχθεί με θερμική οξειδωση στρώμα SiO_2 πάχους 1000 nm και τα οποία είχαν κοπεί σε ψηφίδες διαστάσεων $5 \times 15 \text{ mm}^2$
- Πυκνό θειικό οξύ, 95-97 % (v/v) (Merck)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% (v/v) (CarloErba)
- Υάλινα σκεύη (τρυβλία, ράβδος, κύλινδρος)
- Μεταλλική λαβίδα
- Δις απεσταγμένο νερό
- Αέριο N_2
- Αντιδραστήρας εγχάραξης ενεργών ιόντων (NE330 parallel plate plasma reactor, Nextral, France)

4.5.3 Πορεία Εργασίας

Οι ψηφίδες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου εμβαπτίζονται σε 1:1 κατά όγκο μίγμα πυκνού H_2SO_4 / H_2O_2 εντός υάλινου τρυβλίου επί 20 min σε θερμοκρασία δωματίου. Κατόπιν εκπλένονται με περίσσεια νερού και ξηραίνονται σε ρεύμα αζώτου. Εναλλακτικά οι ψηφίδες τοποθετούνται στον αντιδραστήρα

εγγάραξης ενεργών ιόντων και εκτίθενται σε πλάσμα οξυγόνου επί 30 δευτερόλεπτα υπό πίεση 10 mTorr.

4.6 Χημική τροποποίηση αισθητήριας επιφάνειας

4.6.1 Αρχή Μεθόδου

Η χημική τροποποίηση των υδροφιλοποιημένων ψηφίδων πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου πραγματοποιείται μέσω επώασης με το αντιδραστήριο (3-αμινοπροπυλο)τριαιθοξυ-σιλάνιο (APTES). Σύμφωνα με την μέθοδο αυτή, κατά τη διάρκεια της επώασης, τα μόρια του σιλανίου σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τις σιλανόλες που έχουν δημιουργηθεί στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου κατά το στάδιο της υδροφιλοποίησης. Μετά από την απομάκρυνση των ψηφίδων από το διάλυμα σιλανοποίησης ακολουθεί κατεργασία σε υψηλή θερμοκρασία όπου λαμβάνει χώρα σχηματισμός ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των μορίων του APTES και της επιφάνειας μέσω συμπύκνωσης & απομάκρυνσης μορίων νερού. Η τροποποιημένη με APTES ψηφίδα πυριτίου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση βιομορίων είτε μέσω φυσικής προσρόφησης ή μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης.

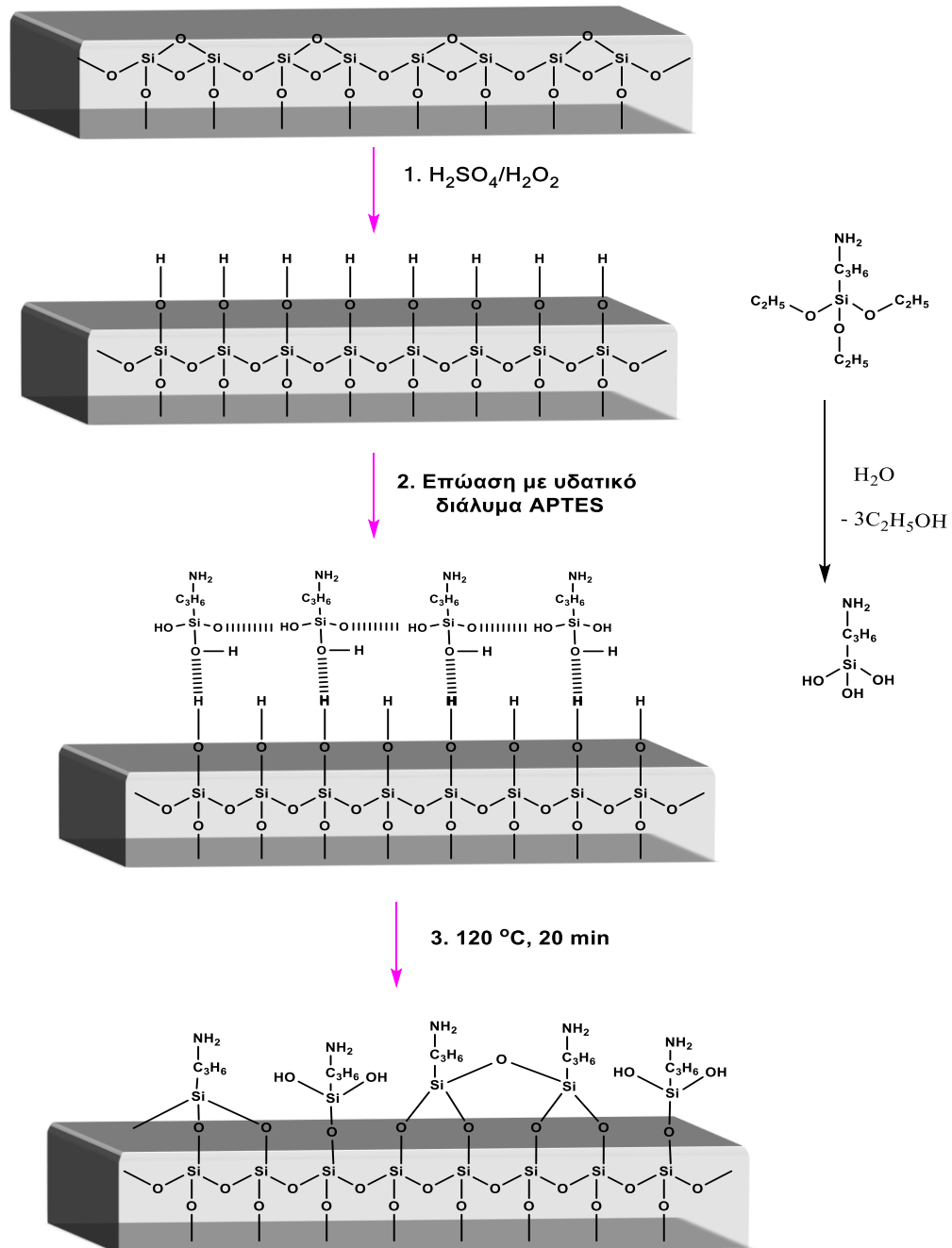
4.6.2 Υλικά – Όργανα

- Υδροφιλοποιημένες ψηφίδες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου
- 3-(αμινοπροπυλο)τριαιθοξυσιλάνιο, APTES (Sigma-Aldrich, ΗΠΑ)
- Υάλινα τρυβλία
- Δις απεσταγμένο νερό
- Επωαστικός κλίβανος Heraeus T6 (Thermo Electron, Γερμανία)

4.6.3 Πορεία Εργασίας

Οι υδροφιλοποιημένες ψηφίδες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου εμβαπτίζονται σε υδατικό διάλυμα APTES 2% (v/v) επί 20 min σε RT. Ακολούθως, οι επιφάνειες εκπλένονται ελαφρώς με νερό και ξηραίνονται σε ρεύμα αζώτου. Στη συνέχεια, οι ψηφίδες τοποθετούνται για 20 min σε επωαστικό κλίβανο σε θερμοκρασία 120 °C (Εικόνα 25). Οι σιλανοποιημένες ψηφίδες

ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύονται υπό κενό σε ξηραντήρα για διάστημα έως και δύο εβδομάδων.

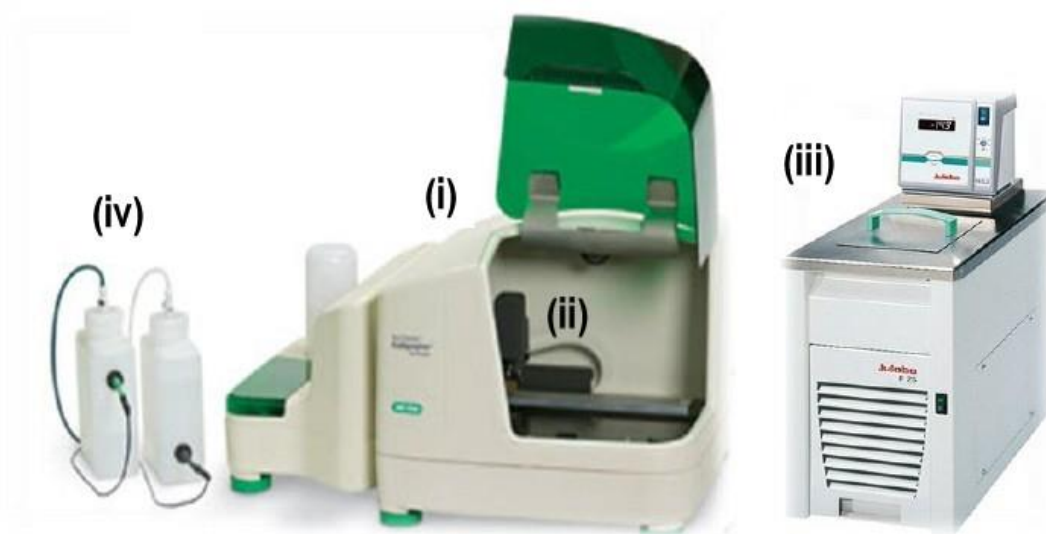


Εικόνα 25: Σχηματική απεικόνιση των σταδίων υδροφιλοποίησης και χημικής τροποποίησης με 3-(αμινοπρόπυλο)-τριαιθόξυ σιλάνιο επιφανειών πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου. Επίσης απεικονίζεται και η υδρόλυση του αντιδραστηρίου APTEs.

4.7 Μέθοδος εναπόθεσης πρωτεϊνικών συζευγμάτων φυτοφαρμάκων στην αισθητήρια επιφάνεια

4.7.1 Αρχή Μεθόδου

Η ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών συζευγμάτων των φυτοφαρμάκων στις σιλανοποιημένες ψηφίδες πυριτίου πραγματοποιείται μέσω εναπόθεσης διαλυμάτων των ουσιών αυτών στην αισθητήρια επιφάνεια και στη συνέχεια επώαση αυτών σε θερμοκρασία δωματίου ολονυκτίως προκειμένου να επιτευχθεί προσρόφηση των πρωτεϊνικών συζευγμάτων. Η διαδικασία εναπόθεσης βασίζεται στη χρήση ρομποτικής συσκευής εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer της Bio-Rad Laboratories Inc. (Εικόνα 26), με την οποία μικρός όγκος διαλύματος του εκάστοτε πρωτεϊνικού συζεύγματος τοποθετείται ως συστοιχία διαδοχικών αλληλεπικαλυπτόμενων μικροκηλίδων σε προκαθορισμένη περιοχή της αισθητήριας επιφάνειας.



Εικόνα 26: Συσκευή εναπόθεσης μικροκηλίδων BioOdyssey Calligrapher™ MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories Inc). Τα μέρη της συσκευής είναι: i) θάλαμος ελεγχόμενης υγρασίας, ii) ρομποτικός βραχίονας κίνησης κεφαλής, iii) αντλία διοχέτευσης αέρα και μονάδα ελέγχου θερμοκρασίας του θαλάμου, iv) πλαστικές φιάλες υγρού έκπλυσης ακίδας και συλλογής αποβλήτων.

4.7.2 Υλικά - Όργανα

- Σιλιανοποιημένες ψηφίδες πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου
- Ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης συζευγμάτων $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ 50 mM, pH 9,25
- Πρωτεϊνικά συζεύγματα ζιζανιοκτόνων PQ-VAL-BSA, PQ-CN-BSA, GLY-BSA, GLY-OVA, ATR-BSA
- Υδατικό διάλυμα έκπλυσης ακίδων: 1% (v/v) Triton X100 σε δις απεσταγμένο νερό
- Δις απεσταγμένο νερό

4.7.3 Πορεία Εργασίας

Εντός του θαλάμου ελεγχόμενης υγρασίας τοποθετείται η σιλιανοποιημένη επιφάνεια πυριτίου/διοξειδίου του πυριτίου, πλακίδιο με φρεάτια μικροπιλοδότησης που περιέχει το διάλυμα του πρωτεϊνικού συζεύγματος που πρόκειται να εναποτεθεί καθώς και λουτρό με το διάλυμα έκπλυσης των ακίδων. Για την εναπόθεση του διαλύματος των πρωτεϊνικών συζευγμάτων χρησιμοποιήθηκε συμπαγής ακίδα με πεπλατυσμένη κεφαλή διαμέτρου 375 μm της οποίας η κίνηση ελέγχεται από το λογισμικό της συσκευής. Πριν την έναρξη της εναπόθεσης, η ακίδα πλένεται εις τριπλούν με το διάλυμα έκπλυσης και στεγνώνεται σε ρεύμα αέρα. Έπειτα η ακίδα καθοδηγείται στο φρεάτιο που περιέχει το διάλυμα που πρόκειται να εναποτεθεί και εμβαπτίζεται σε αυτό. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ένα υμένιο από το διάλυμα στην άκρη της ακίδας, το οποίο εναποτίθεται με επαφή σε συγκεκριμένη θέση πάνω στην σιλιανοποιημένη ψηφίδα δημιουργώντας μια κηλίδα μεγέθους περίπου 300-400 μm . Στην παρούσα διατριβή και ειδικά στην περίπτωση του ταυτόχρονου προσδιορισμού των paraquat και atrazine, τα πρωτεϊνικά συζεύγματα των ζιζανιοκτόνων εναποτέθηκαν με τη μορφή δύο διακριτών ζωνών διάστασης $1.1 \times 3.6 \text{ mm}^2$ με εναπόθεση 10 σειρών των 35 κηλίδων και απόσταση μεταξύ των κηλίδων τόσο στο x όσο και στον y άξονα 100 μm . Στην περίπτωση του προσδιορισμού του glyphosate καθώς και γενικά για τον προσδιορισμό μεμονωμένων αναλυτών, το πρωτεϊνικό σύζευγμα εναποτέθηκε σε μία ενιαία

ζώνη διαστάσεων περίπου $5 \times 5 \text{ mm}^2$ με εναπόθεση 30 σειρών των 30 κηλίδων απόστασης 150 μm μεταξύ τους. Κατά αυτόν τον τρόπο στην πρώτη περίπτωση ο συνολικός όγκος του διαλύματος που εναποτίθεται στην επιφάνεια είναι περίπου 5 μL για κάθε πρωτεϊνικό σύζευγμα ενώ στην δεύτερη είναι περίπου 10 μL . Προς αποφυγή εξάτμισης του διαλύματος που έχει εναποτεθεί στην αισθητήρια επιφάνεια η εναπόθεση όπως και η ολονύκτια επώαση λαμβάνουν χώρα σε συνθήκες σταθερής υγρασίας (~ 70%). Μετά την επώαση των ψηφίδων με τα διαλύματα πρωτεϊνικών συζευγμάτων ακολουθεί έκπλυση τους με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και αποκλεισμός των ελευθέρων θέσεων μέσω εμβάπτισης για 1 ώρα σε ρυθμιστικό διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων δέσμευσης. Η βιολογικά ενεργοποιημένη αισθητήρια επιφάνεια εκπλένεται επιμελώς με ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης και απεσταγμένο νερό, ξηραίνεται σε ρεύμα αζώτου και είναι έτοιμη για απευθείας χρήση ή φυλάσσεται σε ξηραντήρα σε θερμοκρασία δωματίου για μελλοντική χρήση.

4.8 Ανίχνευση φυτοφαρμάκων με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός

4.8.1 Αρχή Μεθόδου

Η ανίχνευση της συγκέντρωσης αναλυτών φυτοφαρμάκων με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός βασίζεται στην μετατόπιση του φάσματος συμβολής σε μεγαλύτερα μήκη κύματος, ως αποτέλεσμα της αύξησης του πάχους της βιομοριακής στοιβάδας (Υποκεφάλαιο 2.4), εξαιτίας της δημιουργίας ανοσοσυμπλεγμάτων κατά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης και κατά συνέπεια του δείκτη διάθλασης. Ο ανοσοχημικός προσδιορισμός των φυτοφαρμάκων είναι ανταγωνιστικού τύπου και επομένως η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη στα πρότυπα διαλύματα ή στα δείγματα και της μετατόπισης του φάσματος συμβολής είναι αντιστρόφως ανάλογη. Κατά την διάρκεια της ανοσοαντίδρασης τα αντισώματα δεσμεύονται στα ακινητοποιημένα πρωτεϊνικά συζεύγματα δημιουργώντας ανοσοσυμπλέγματα, τα οποία στο επόμενο στάδιο αναγνωρίζονται από ένα δεύτερο αντίσωμα οδηγώντας σε

περαιτέρω αύξηση του φαινομένου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας και ενίσχυση του λαμβανόμενου σήματος.

4.8.2 Υλικά – Όργανα

- Επιφάνειες Si/SiO₂ τροποποιημένες με πρωτεϊνικά συζεύγματα των paraquat, atrazine ή glyphosate
- Πρότυπα διαλύματα paraquat, atrazine ή glyphosate
- Πολυκλωνικό αντίσωμα όρνιθας έναντι του glyphosate (anti-glyphosate IgY, Sigma St Louis, Mo., USA)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του atrazine (anti-atrazine rabbit polyclonal antibody, United Immunoassay San Bruno, California)
- Μονοκλωνικό αντίσωμα κουνελιού έναντι του paraquat (anti-paraquat antibody, Selective Antibodies Ltd Newcastle upon Tyne, UK)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών ποντικού (goat anti-mouse, Sigma, St Louis, Mo., USA)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα αιγός κατά των γ-σφαιρινών κουνελιού (goat anti-rabbit, Sigma, St Louis, Mo., USA)
- Πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού κατά των γ-σφαιρινών όρνιθας (rabbit anti-chicken, Sigma St Louis, Mo., USA)
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης I: Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 50 mM, pH= 7.4, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA
- Διάλυμα ανοσοαντίδρασης II: Tris/HCl 50 mM, pH 8.9, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) γ-σφαιρίνες βοός
- Διαλύματα έκπλυσης I: Na₂HPO₄/KH₂PO₄ 50 mM, pH= 7.4, 0.9% (w/v) NaCl &
- Διαλύματα έκπλυσης II: Tris/HCl 10 Mm, pH 8.25, 0.9% (w/v) NaCl
- Οπτικός αισθητήρας φασματοσκοπίας ανάκλασης λευκού φωτός (ThetaMetrisis, Ελλάδα) συνοδευόμενος από το λογισμικό FRMonitor (ThetaMetrisis, Ελλάδα)

Ο οπτικός ανοσοαισθητήρας που βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός αποτελείται από τα εξής μέρη:

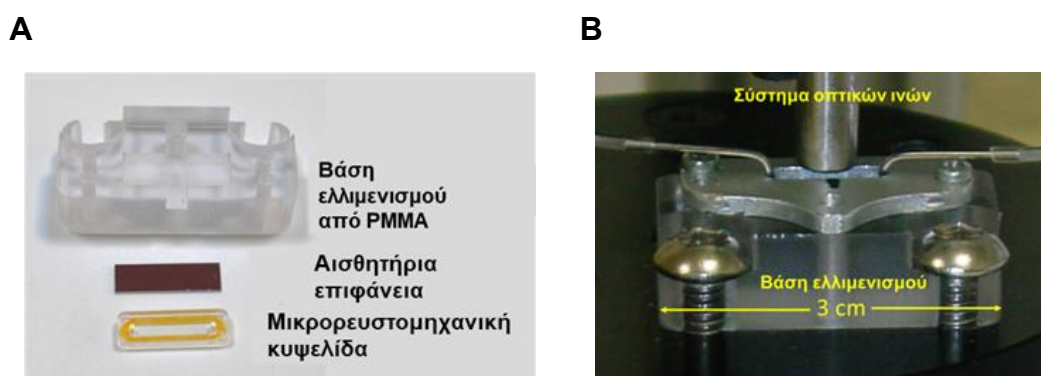
I. Οπτικό Σύστημα

Το οπτικό σύστημα περιλαμβάνει α) την οπτική πηγή, β) το σύστημα οπτικών ινών και γ) το φασματοφωτόμετρο. Η οπτική πηγή είναι μια λυχνία βολφραμίου που εκπέμπει φως σε μήκη κύματος μεγαλύτερα από τα 360 nm. Η τροφοδοσία της πηγής εξασφαλίζει σταθερότητα λειτουργίας για μεγάλα χρονικά διαστήματα ώστε να ανιχνεύονται απρόσκοπτα οι μικρές μεταβολές του φάσματος συμβολής. Για την συλλογή των φασμάτων ανάκλασης χρησιμοποιήθηκε το φασματοφωτόμετρο Maya 2000Pro της εταιρείας OceanOptics, το οποίο καλύπτει περιοχή μηκών κύματος από 400 έως 1100 nm. Το σύστημα των οπτικών ινών αποτελείται από έξι ίνες, διαμέτρου 200 μm, κατανεμημένες σε περιφέρεια κύκλου οι οποίες μεταφέρουν το φως από την πηγή στην επιφάνεια και μία ίνα διαμέτρου επίσης 200 μm στο κέντρο του κύκλου για τη συλλογή του φάσματος ανάκλασης. Το σύστημα των οπτικών ινών στερεώνεται σε κατάλληλο ικρίωμα έτσι ώστε η θέση τους να είναι σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος ενώ η θέση της ψηφίδας ως προς το σύστημα οπτικών ινών ρυθμίζεται σε απόσταση μερικών εκατοστών ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή ανάκλαση του προσπίπτοντος φωτός.

II. Αισθητήρια Επιφάνεια, μικρορευστομηχανική κυψελίδα και βάση ελλιμενισμού

Η αισθητήρια επιφάνεια είναι μια ψηφίδα πυριτίου διαστάσεων 5x15 mm² στην οποία είχε αποθεθεί στρώμα SiO₂ πάχους 1000 nm και η οποία έχει υποστεί τις διαδικασίες της υδροφιλοποίησης, της χημικής τροποποίησης και της ακινητοποίησης των πρωτεϊνικών συζευγμάτων των αναλυτών προς ανίχνευση. Η μικρορευστομηχανική κυψελίδα είναι κατασκευασμένη από μια επίπεδη επιφάνεια πλεξιγκλάς (PMMA, poly(methyl methacrylate) πάχους 2 mm, στην οποία έχουν ανοιχτεί οπές για την προσαρμογή σωλήνων μέσω των οποίων επιτρέπεται η διασύνδεση με εξωτερική αντλία και με τα δοχεία των διάφορων διαλυμάτων που διοχετεύονται πάνω από την αισθητήρια επιφάνεια κατά τη διάρκεια της ανοσοανάλυσης. Στη μια όψη της επιφάνειας από πλεξιγκλάς έχει

τοποθετηθεί αυτοκόλλητη μεμβράνης διπλής όψης μέρος της οποίας έχει κοπεί με δέσμη laser και απομακρυνθεί ώστε να δημιουργηθεί μια μικροροϊκή κυψελίδα, ύψους 200 μm , κατά την τοποθέτηση της στην αισθητήρια επιφάνεια. Το κανάλι, με διαστάσεις 12 mm x 2.5 mm x 0.2 mm (ΜxΠxΥ), είναι σχεδιασμένο με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλίζεται η απρόσκοπτη διαβίβαση των διαφόρων διαλυμάτων με σταθερή ταχύτητα καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος αλλά και να αποφεύγεται η δημιουργία φυσαλίδων. Όπως φαίνεται και στην Εικόνα 27B η ενσωματωμένη με τη μικρορευστομηχανική κυψελίδα αισθητήρια επιφάνεια τοποθετείται στη βάση ελλιμενισμού (docking station), επίσης από πλεξιγκλάς, η οποία φέρει εσοχή που επιτρέπει την εισαγωγή και σταθεροποίηση της ψηφίδας σε συγκεκριμένη θέση ως προς το οπτικό σύστημα.

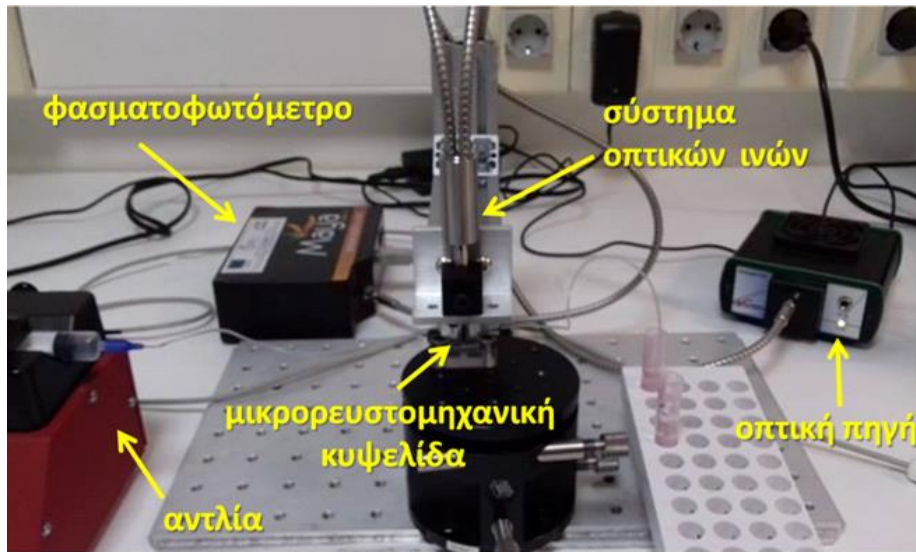


Εικόνα 27: A) Βιολογικά ενεργοποιημένη αισθητήρια επιφάνεια, μικρορευστομηχανική κυψελίδα και βάση ελλιμενισμού και B) το σύνολο αυτών μετά από κατάλληλη συναρμολόγηση με προσαρμογή των σωλήνων εισόδου και εξόδου υγρών τοποθετημένα κάτω από το σύστημα των οπτικών ινών.

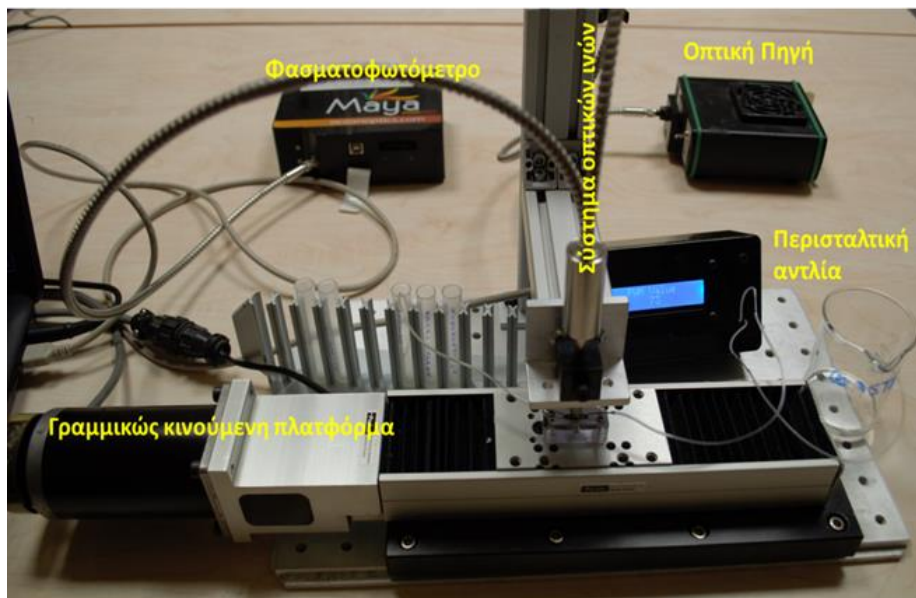
III. Κινούμενη τράπεζα XY ή σταθερή βάση

Η συναρμολογημένη με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα αισθητήρια επιφάνεια τοποθετείται στην βάση ελλιμενισμού η οποία βιδώνεται είτε σε σταθερή βάση ή σε γραμμικώς κινούμενη τράπεζα XY. Η κινούμενη τράπεζα κινείται με βήμα 500 μm και η λειτουργία της ελέγχεται από το λογισμικό FRMonitor.

A



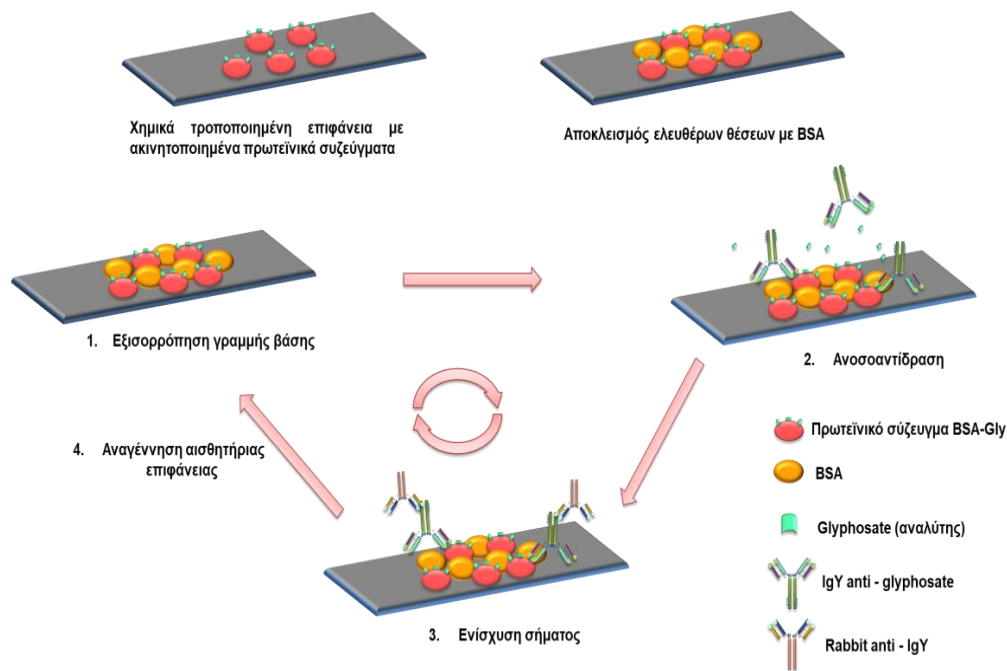
B



Εικόνα 28: Διάταξη οπτικού αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός για την ανίχνευση ενός αναλύτη (A) και για την ταυτόχρονη ανίχνευση των αναλυτών (B).

4.8.3 Ανίχνευση μεμονωμένου αναλύτη

Η ενεργοποιημένη με το πρωτεϊνικό σύζευγμα του εκάστοτε αναλύτη επιφάνεια συναρμολογείται με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα προσαρμόζεται σε σταθερή βάση και το σύνολο τοποθετείται κάτω από το σύστημα οπτικών ινών ορατού φωτός. Στις οπές εισόδου και εξόδου της μικρορευστομηχανικής κυψελίδας προσαρμόζονται σωλήνες μέσω των οποίων με την βοήθεια εξωτερικής περισταλτικής αντλίας, η οποία είναι συνδεδεμένη με τον σωλήμα εξόδου, διαβιβάζονται πάνω από την αισθητήρια επιφάνεια τα διαλύματα για κάθε στάδιο της ανοσοανάλυσης. Μέσω του λογισμικού FR Monitor πραγματοποιείται προσαρμογή του πειραματικού με το θεωρητικό φάσμα συμβολής για δεδομένο αρχικό πάχος της στοιβάδας διοξειδίου του πυριτίου και ξεκινά η καταγραφή του σήματος και η παρακολούθηση των αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στην αισθητήρια επιφάνεια σε πραγματικό χρόνο. Όπως παρουσιάζεται σχηματικά στην Εικόνα 30, αρχικά από τη μικρορευστομηχανική κυψελίδα διαβιβάζεται επί 5 min ρυθμιστικό δ/μα ανοσοαντίδρασης έως ότου ληφθεί σταθερό σήμα γραμμής βάσης. Κατόπιν διαβιβάζεται μίγμα προτύπου διαλύματος του εκάστοτε αναλύτη και διαλύματος ειδικού αντισώματος έναντι του αναλύτη σε αναλογία όγκων 1:1. Ακολουθεί ενίσχυση του σήματος μέσω διέλευσης δεύτερου αντισώματος, το οποίο δεσμεύεται στα ανοσοσυμπλέγματα που έχουν δημιουργηθεί κατά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης. Η ανοσοανάλυση ολοκληρώνεται διαβιβάζοντας για 30 sec διάλυμα έκπλυσης και στη συνέχεια για 1 min διάλυμα αναγέννησης.



Εικόνα 29: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας ανοσοχημικού προσδιορισμού του ζιζανιοκτόνου glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός όπου μετά την ακινητοποίηση του πρωτεϊνικού συζεύγματος και τον αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων η αισθητήρια επιφάνεια συναρμολογείται στον οπτικό αισθητήρα και πραγματοποιούνται τα εξής: 1) εξισορρόπηση γραμμής βάσης με διαβίβαση διαλύματος ανοσοαντίδρασης πάνω από την αισθητήρια επιφάνεια, 2) ανοσοαντίδραση με διαβίβαση μίγματος, πρότυπου διαλύματος glyphosate και διαλύματος anti-glyphosate αντισώματος σε αναλογία όγκων 1:1, 3) ενίσχυση του σήματος με διαβίβαση 2^{ου} αντισώματος rabbit anti-IgY, 4) αναγέννηση της αισθητήριας επιφάνειας με διαβίβαση διαλύματος HCl 50 mM.

Η αισθητήρια επιφάνεια εξισορροπείται με διαβίβαση ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοαντίδρασης και είναι έτοιμη για ένα νέο κύκλο ανοσοανάλυσης. Στον Πίνακα 5 αναγράφονται οι συγκεντρώσεις των ανοσοαντιδραστηρίων, η ταχύτητα ροής, ο όγκος των προτύπων διαλυμάτων και συνολικός χρόνος ανάλυσης για την ανίχνευση καθενός από τα τρία φυτοφάρμακα μεμονωμένα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.

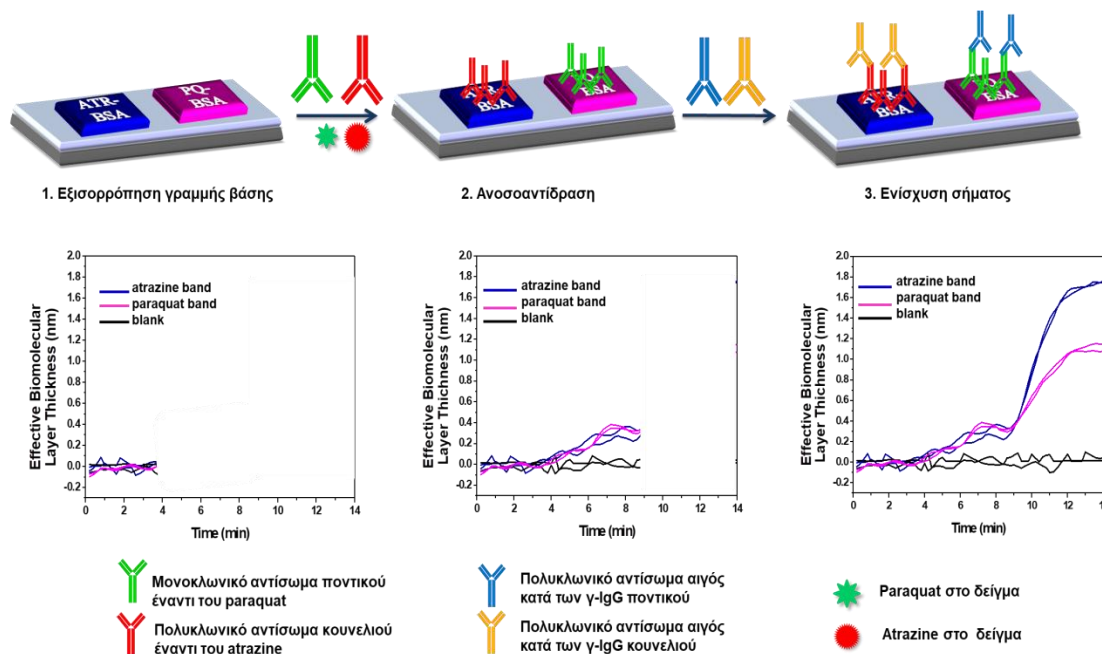
Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις αντιδραστηρίων, ταχύτητα ροής, όγκος προτύπων διαλυμάτων και συνολικός χρόνος ανάλυσης για την ανίχνευση καθενός από τα τρία φυτοφάρμακα μεμονωμένα με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.

	glyphosate	paraquat	atrazine
Συγκέντρωση πρωτεϊνικού σύζευγματος	50 µg/mL	50 µg/mL	10 µg/mL
Συγκέντρωση ειδικού αντισώματος	50 µg/mL	αραίωση 1/3000	2 µg/mL
Συγκέντρωση 2 ^{ου} αντίσωμα	1 µg/mL	5 µg/mL	5 µg/mL
Ταχύτητα ροής	30 µL/min	50 µL/min	50 µL/min
Όγκος προτύπου διαλύματος που διαβιβάζεται	375 µL	175 µL	175 µL
Χρόνος ανοσοαντίδρασης	15 min	7 min	7min
Συνολικός χρόνος ανάλυσης	25 min	12 min	12 min

4.8.4 Ταυτόχρονη ανίχνευση των paraquat & atrazine

Η αρχή μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των paraquat και atrazine είναι σε γενικές γραμμές ίδια με αυτήν που περιγράφηκε για τον προσδιορισμό των μεμονωμένων αναλυτών και επίσης διατηρήθηκαν οι συγκεντρώσεις των διαφόρων αντιδραστηρίων όπως περιγράφονται στον Πίνακα 5. Η διαφορά έγκειται πρώτον στο ότι στην αισθητήρια επιφάνεια είναι ακινητοποιημένα σε διακριτές ζώνες πρωτεϊνικά συζεύγματα και των δύο ζιζανιοκτόνων και δεύτερον ότι η συναρμολογημένη με την μικρορευστομηχανική κυψελίδα αισθητήρια επιφάνεια τοποθετείται σε γραμμικώς κινούμενη τράπεζα XY. Η πορεία του ανοσοπροσδιορισμού είναι επίσης παρόμοια με αυτή των

μεμονωμένων αναλυτών, με την διαφορά ότι τα διαλύματα που διαβιβάζονται περιέχουν μίγμα αντιδραστηρίων για τον προσδιορισμό των δύο αναλυτών.



Εικόνα 30: Σχηματική αναπαράσταση των σταδίων του ταυτόχρονου ανοσοπροσδιορισμού των ζιζανιοκτόνων paraquat και atrazine (επάνω) και μεταβολή του φαινομένου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας κατά τη διάρκεια διαβίβασης μηδενικού προτύπου διαλύματος κατά τα διάφορα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού (κάτω).

Καθ' όλη την διάρκεια της μέτρησης η τράπεζα κινείται κατά μήκος του άξονα x με βήμα 10 μm κάθε 1 sec, σαρώνοντας με αυτόν τον τρόπο όλο το μήκος της αισθητήριας επιφάνειας. Κάθε δευτερόλεπτο συλλέγεται από το φασματοφωτόμετρο και ένα φάσμα συμβολής το οποίο αντιστοιχεί σε διαφορετική περιοχή της αισθητήριας επιφάνειας. Από το σύνολο των φασμάτων που συλλέγονται, από το λογισμικό καταγράφονται 9 φάσματα συμβολής από 9 διαφορετικές περιοχές τις επιφάνειας, τα οποία αντιστοιχούν ανά 3 στις δύο περιοχές που έχουν τροποποιηθεί με τα πρωτεϊνικά συζεύγματα του paraquat και του atrazine και μία ενδιάμεση περιοχή όπου ανταποκρίνεται στο σήμα μη ειδικής δέσμησης. Οι μετρήσεις λαμβάνονται σε αρχεία τύπου .txt και μέσω επεξεργασίας με το πρόγραμμα Matlab λαμβάνονται τα γραφήματα του φαινομένου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας συναρτήσει του χρόνου. Στην

Εικόνα 30 παρουσιάζονται τα στάδια του ταυτόχρονου ανοσοπροσδιορισμού των paraquat και atrazine καθώς και τα γραφήματα μεταβολής του φαινόμενου πάχους της βιομοριακής στοιβάδας που αντιστοιχούν σε πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης για 6 περιοχές της αισθητήριας επιφάνειας οι οποίες ανά δύο αντιστοιχούν στα πρωτεϊνικά συζεύγματα των δύο αναλυτών και στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης αντίστοιχα.

5 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση ενζυμοανοσοχημικών μεθόδων προσδιορισμού των φυτοφαρμάκων paraquat, atrazine, glyphosate σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης

Της ανάπτυξης των ανοσοχημικών προσδιορισμών για τα τρία φυτοφάρμακα στόχους με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός προηγήθηκε η ανάπτυξη και βελτιστοποίηση ενζυμοανοσοχημικών μεθόδων (ELISA) για καθέναν από τους αναλύτες σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης. Στόχος ήταν αφενός να καθοριστούν οι συνθήκες της ανάλυσης, όπως π.χ., το είδος των πρωτεϊνικών συζευγμάτων ακινητοποίησης, τα ρυθμιστικά διαλύματα κλπ, αφετέρου να χρησιμοποιηθούν αυτές οι μέθοδοι ως συγκριτικές των μεθόδων προσδιορισμού με τον οπτικό αισθητήρα. Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν είναι ανταγωνιστικού τύπου και η βελτιστοποίησή τους έγινε με κριτήριο το σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης, την ευαισθησία της ανίχνευσης και το σήμα της μη ειδικής δέσμευσης. Η βελτιστοποίηση περιελάμβανε τα παρακάτω στάδια, τα οποία αναλύονται διεξοδικά στα υποκεφάλαια 5.1.2 έως 5.1.6 :

- επιλογή του πρωτεϊνικού συμπλέγματος για τους αναλύτες paraquat και glyphosate και προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης πρωτεϊνικού συμπλέγματος για όλους τους αναλύτες
- επιλογή του ειδικού αντισώματος για το atrazine και προσδιορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης των ειδικών αντισωμάτων όλων των αναλυτών
- μελέτη της σύστασης των ρυθμιστικών διαλυμάτων για τα διάφορα στάδια της ανοσοαντίδρασης
- μελέτη της επίδρασης της προεπάσης των προτύπων διαλυμάτων με το ειδικό αντίσωμα στην ευαισθησία της ανίχνευσης
- μελέτη της επίδρασης της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης και στην ευαισθησία της ανίχνευσης

Τέλος ειδικά για το ζιζανιοκτόνο glyphosate μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι συνθήκες αντίδρασης με τον ηλεκτρικό ανυδρίτη πριν την ανοσοαντίδραση. Επίσης για τον συγκεκριμένο αναλύτη αναπτύχθηκε και ανοσοχημικός προσδιορισμός σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης ο οποίος βασίζεται στο σύστημα βιοτίνης-αβιδίνης ο οποίος περιγράφεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 5.1.6.

5.1.1 Επιλογή και βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης πρωτεϊνικών συζευγμάτων και ειδικών αντισωμάτων των τριών φυτοφαρμάκων

Για τα φυτοφάρμακα paraquat και atrazine λόγω της απουσίας εμπορικά διαθέσιμων πρωτεϊνικών συζευγμάτων για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροπιτλοδότησης παρασκευάστηκαν για συζεύγματα με αλβουμίνη ορού βοός (BSA) και ωαλβουμίνη (OVA) χρησιμοποιώντας διαφορετικά πρωτόκολλα σύζευξης τα οποία περιγράφονται αναλυτικά στο Υποκεφάλαιο 4.2. Συγκεκριμένα για το ζιζανιοκτόνο glyphosate παρασκευάστηκαν έξι πρωτεϊνικά συζεύγματα εκ των οποίων τρία με οβαλβουμίνη και τρία με αλβουμίνη ορού βοός, ενώ για το ζιζανιοκτόνο paraquat παρασκευάστηκαν πρωτεϊνικά συζεύγματα για κάθε παράγωγο όλα με φέρουσα πρωτεΐνη BSA. Στην περίπτωση του glyphosate το οποίο διαθέτει δύο ομάδες, την καρβοξυλική και την δευτεροταγή αμίνη, ικανές προς αντίδραση με ελεύθερες αμινομάδες ή καρβοξυλομάδες, αντίστοιχα, στο μόριο της πρωτεΐνης, διερευνήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα σύζευξης, ενώ αντίθετα στην περίπτωση του paraquat και τα δύο παράγωγα φέρουν ομάδες που αντιδρούν με ελεύθερες αμινομάδες της φέρουσας πρωτεΐνης για την δημιουργία αμιδικού δεσμού (Εικόνα 20). Έτσι για το glyphosate διερευνήθηκε το πρωτόκολλο της απευθείας σύζευξης, όπως φαίνεται από την Εικόνα 21, σύμφωνα με το οποίο λαμβάνει πρώτα χώρα ενεργοποίηση της καρβοξυλικής ομάδας του glyphosate και στη συνέχεια αντίδραση με τις πλευρικές αμινομάδες καταλοίπων λυσίνης στην εκάστοτε φέρουσα πρωτεΐνη χρησιμοποιώντας διαφορετική αναλογία μοριακή αναλογία glyphosate προς φέρουσα πρωτεΐνη. Επίσης διερευνήθηκαν τρία διαφορετικά πρωτόκολλα σύζευξης δύο σταδίων, σύμφωνα με τα οποία πρώτα ενεργοποιούνται καρβοξυλικές ομάδες καταλοίπων ασπαρτικού ή γλουταμικού οξέος της φέρουσας πρωτεΐνης τα οποία στη συνέχεια

αντιδρούν με την δευτεροταγή αμινομάδα στο μόριο του glyphosate. Στον Πίνακα 6 παρουσιάζονται όλα τα συζεύγματα που παρασκευάστηκαν, οι μέθοδοι σύζευξης και οι μοριακές αναλογίες glyphosate προς φέρουσα πρωτεΐνη που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 6: Συνοπτικός πίνακας πρωτεϊνικών συζευγμάτων για τα ζιζανιοκτόνα glyphosate, paraquat μαζί με τις μοριακές αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν.

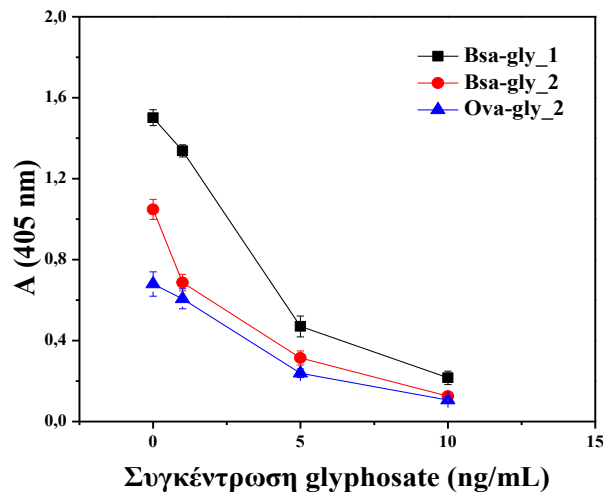
Κωδική Ονομασία Πρωτεϊνικού Συζεύγματος	Πρωτόκολλο Σύζευξης	Μοριακή αναλογία glyphosate: φέρουσα πρωτεΐνη
Ova-gly_1	απευθείας σύζευξη	120
Ova-gly_2	απευθείας σύζευξη	250
Ova-gly_3	δύο σταδίων II	120
BSA-gly_1	δύο σταδίων I	2500
BSA-gly_2	απευθείας σύζευξη	300
BSA-MA-gly_3	δύο σταδίων III	2
PQ-VAL-BSA	απευθείας σύζευξη	165
PQ-CN-BSA_1	-	150
PQ-CN-BSA_2	-	75

Για κάθε πρωτεϊνικό σύζευγμα ελέχθησαν διαφορετικές συγκεντρώσεις για ακινητοποίηση στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης σε συνδυασμό με διαφορετικές συγκεντρώσεις ειδικού αντισώματος όρνιθας (IgY) έναντι του glyphosate όσον αφορά το απόλυτο αναλυτικό σήμα και την ευαισθησία της ανίχνευσης. Για τα συζεύγματα Ova-gly_1 και Ova-gly_3 παρατηρήθηκε ότι χρειαζόνταν υψηλές (> 20 µg/mL) συγκεντρώσεις τόσο του συζεύγματος όσο και του ειδικού

αντισώματος ώστε να επιτευχθεί επαρκές αναλυτικό σήμα ($A \geq 1$ για το διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης), πιθανά λόγω της χαμηλής μοριακής αναλογίας, ενώ για το Ova-gly_2 αντίστοιχες τιμές οπτικής απορρόφησης λαμβάνονταν για συγκεντρώσεις από 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Επιπλέον, για όμοιες τιμές σήματος μηδενικού προτύπου, το Ova-gly_2 παρείχε μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης. Όσον αφορά το σύζευγμα BSA-MA-gly δεν ελήφθη επαρκές αναλυτικό σήμα ακόμα και για συγκεντρώσεις ίσες με 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Το σύζευγμα αυτό παρασκευάστηκε όπως περιγράφεται στο πρωτόκολλο σύζευξης δύο σταδίων III στο εδάφιο 5.2.3.2 μέσω αντίδρασης της BSA με περίσσεια μηλεϊνικού ανυδρίτη, η οποία έχει ως αποτέλεσμα οι ελεύθερες αμινομάδες της πρωτεΐνης να αντιδρούν σχηματίζοντας αμιδικούς δεσμούς με το προϊόν υδρόλυσης του ανυδρίτη. Κατά αυτόν τον τρόπο στο επόμενο στάδιο υπάρχει τουλάχιστον διπλάσιος αριθμός ελεύθερων καρβοξυλικών ομάδων προς ενεργοποίηση με το καρβοδιϊμίδιο και για αυτό τον λόγο επιλέχθηκε και εξαιρετικά χαμηλή μοριακή αναλογία glyphosate:φέρουσα πρωτεΐνη. Παραταύτα είναι πιθανό ότι ο αριθμός των μορίων glyphosate που εισήχθησαν ανά μόριο πρωτεΐνης να είναι πολύ χαμηλός. Αντίθετα τα άλλα δύο συζεύγματα με BSA παρείχαν επαρκές σήμα και ευαισθησία συγκεντρώσεις μικρότερες ή ίσες με 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Επομένως, από τα έξι συνολικά συζεύγματα glyphosate-πρωτεΐνη που παρασκευάστηκαν τα Ova-gly_1, Ova-gly_3 και BSA-MA-gly απορρίφθηκαν καθώς δεν παρείχαν ικανοποιητικό αναλυτικό σήμα παρά μόνο σε συνδυασμό με πολύ υψηλές συγκεντρώσεις ειδικού αντισώματος, ενώ τα υπόλοιπα τρία επιλέχθηκαν για περαιτέρω πειράματα.

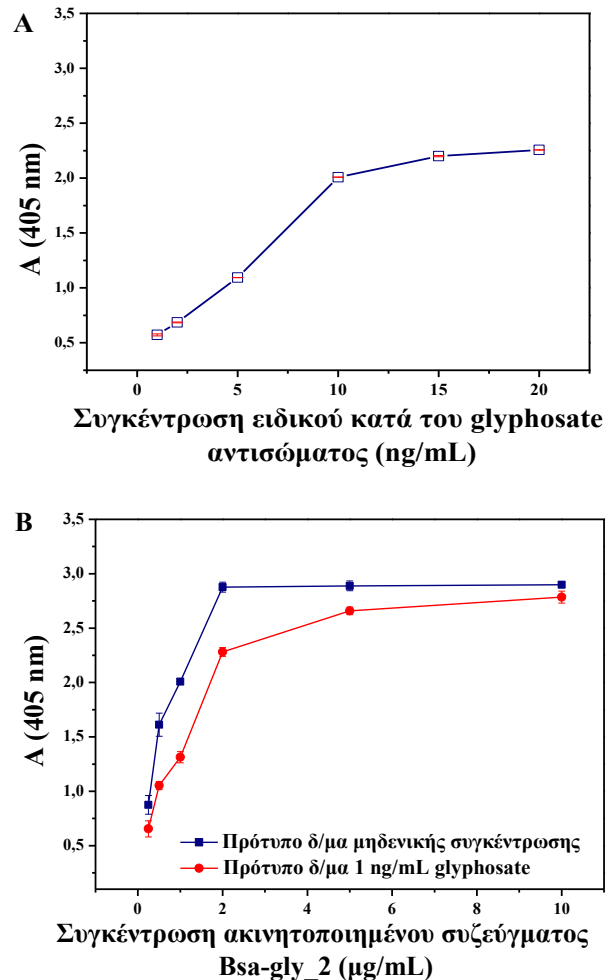
Για να μπορέσουν να συγκριθούν μεταξύ τους τα υπόλοιπα τρία συζεύγματα, επιλέχθηκε ως συγκέντρωση ακινητοποίησης το 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ σε συνδυασμό με συγκέντρωση ειδικού αντισώματος 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και ελήφθησαν οι αντίστοιχες καμπύλες εκτόπισης χρησιμοποιώντας πρότυπα διαλύματα glyphosate. Όπως φαίνεται από το Σχήμα 1 τα δύο συζεύγματα με BSA παρέχουν υψηλότερο αναλυτικό σήμα συγκριτικά με το Ova-gly_2. Επίσης, όσον αφορά την εκτόπιση, τα δύο συζεύγματα με BSA παρέχουν σχεδόν ίδιες εκτοπίσεις εκτός από το πρότυπο συγκέντρωσης 1 ng/mL σε glyphosate, όπου με το σύζευγμα BSA-gly_2 παρατηρείται κατά 20% μεγαλύτερη εκτόπιση σε σχέση με το σύζευγμα BSA-gly_1. Για τον λόγο αυτόν το σύζευγμα BSA-gly_2, το

οποίο παρασκευάστηκε με απευθείας σύζευξη και μοριακή αναλογία στο μίγμα της αντίδρασης glyphosate:φέρουσα πρωτεΐνη 300, επιλέχθηκε για την ανάπτυξη του ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού του glyphosate.



Σχήμα 1: Καμπύλες εκτόπισης που ελήφθησαν για καθένα από τα τρία πρωτεϊνικά συζεύγματα BSA-gly_1 (■), BSA-gly_2 (●) και Ova-gly_3 (▲) χρησιμοποιώντας 1 µg/mL για ακινητοποίηση στα φρεάτια σε συνδυασμό με συγκέντρωση ειδικού αντισώματος 5 µg/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Αρχικά, χρησιμοποιώντας το σύζευγμα Bsa-gly_2 σε συγκέντρωση 1 µg/mL προσδιορίστηκε το αναλυτικό σήμα για το μηδενικό πρότυπο για συγκεντρώσεις του ειδικού αντισώματος έναντι του glyphosate που κυμαίνονταν από 1 έως 20 µg/mL. Όπως παρατηρούμε στο Σχήμα 2A, για τη δεδομένη συγκέντρωση συζεύγματος Bsa-gly_2 μέγιστες τιμές αναλυτικού σήματος λαμβάνονται όταν χρησιμοποιείται συγκέντρωση αντισώματος ≥ 10 µg/mL. Ως εκ τούτου η συγκέντρωση 10 µg/mL επιλέγει ώστε να προσδιορισθεί η βέλτιστη συγκέντρωση Bsa-gly_2 στο διάλυμα ακινητοποίησης.

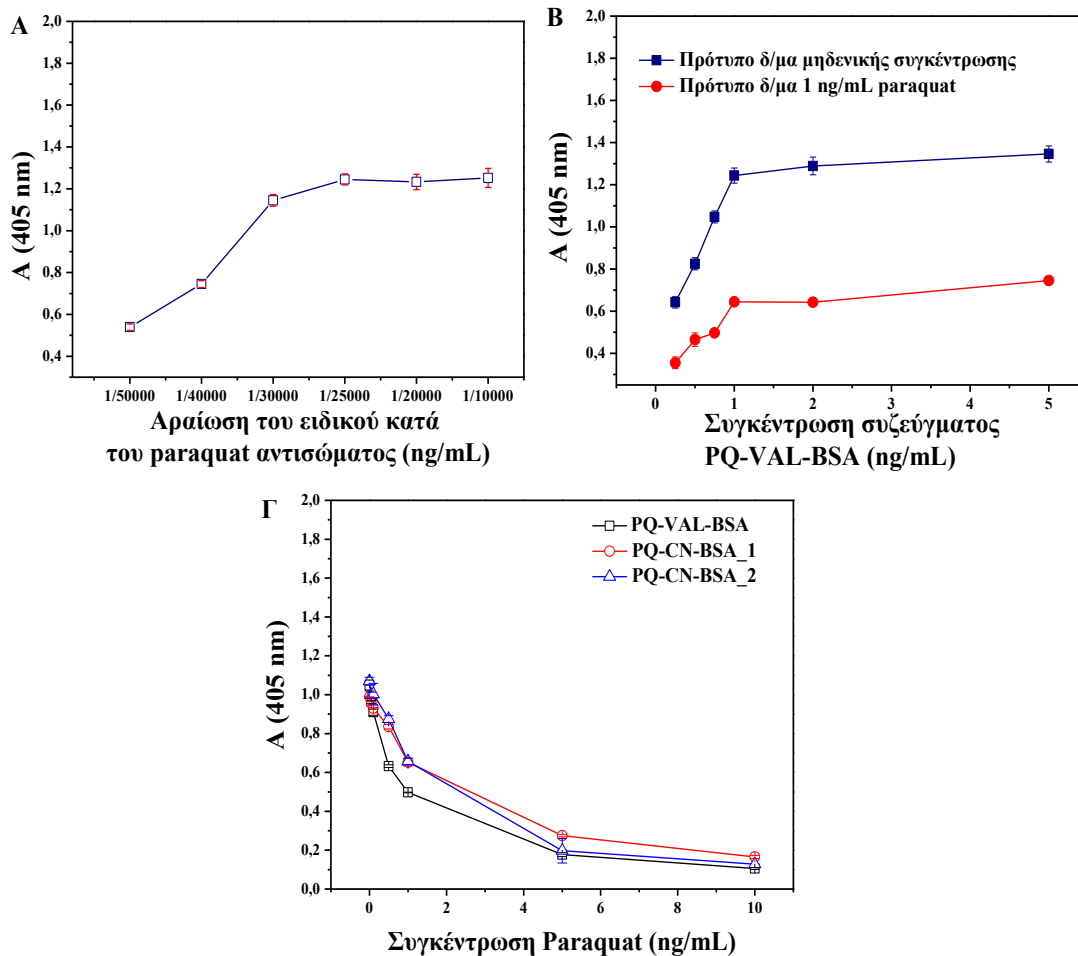


Σχήμα 2: (A) Τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος έναντι του glyphosate. (B) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (■) και διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 1 ng/mL (●) για συγκέντρωση ειδικού αντισώματος 10 μg/mL συναρτήσει της συγκέντρωσης του συζεύγματος BSA-gly_2 στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Οι συγκεντρώσεις Bsa-gly_2 που ελέγχθηκαν κυμαίνονταν από 0,25 έως 10 μg/mL. Στο Σχήμα 2B, παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν τόσο για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης όσο και για πρότυπο διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 1 ng/mL. Όπως φαίνεται και στο σχήμα υψηλό αναλυτικό σήμα (>1.0) ελήφθη για συγκέντρωση συζεύγματος στο διάλυμα ακινητοποίησης ίση με ή μεγαλύτερη από 500 ng/mL. Όσον αφορά στην

ευαισθησία της ανίχνευσης, δηλαδή την επί τοις εκατό πτώση του αναλυτικού σήματος, για το πρότυπο διάλυμα 1 ng/mL, παρατηρείται για συγκέντρωση BSA-gly_2 στο διάλυμα ακινητοποίησης ίση με 1 µg/mL. Επομένως αυτός ο συνδυασμός συγκέντρωσης ακινητοποιημένου συζεύγματος και ειδικού αντισώματος επελέγη για την βελτιστοποίηση των υπολοίπων παραμέτρων του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate αλλά και για το τελικό πρωτόκολλο.

Όσον αφορά το paraquat παρασκευάστηκαν τρία διαφορετικά πρωτεϊνικά συζεύγματα με φέρουσα πρωτεΐνη BSA, ένα χρησιμοποιώντας το παράγωγο με βαλερικό οξύ σε μοριακή αναλογία paraquat-πρωτεΐνη 150:1 και δύο με το παράγωγο με κυανουρικό χλωρίδιο σε μοριακή αναλογία paraquat-πρωτεΐνη 150:1 και 75:1. Για κάθε πρωτεϊνικό σύζευγμα ελέγχθηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις για επικάλυψη των φρεατίων μικροπιλοδότησης σε συνδυασμό με διαφορετικές συγκεντρώσεις του ειδικού έναντι του paraquat αντισώματος σχετικά με την επίδραση στο σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης. Ενδεικτικά στο Σχήμα 3Α παρουσιάζονται οι τιμές απορρόφησης για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης από φρεάτια που έχουν επικαλυφθεί με διάλυμα PQ-VAL-BSA συγκέντρωσης 750 ng/mL για αραιώσεις ειδικού αντισώματος από 1/50000 έως 1/10000. Όπως προκύπτει από το σχήμα, μέγιστες τιμές οροφής ελήφθησαν για αραιώση ίση με ή μικρότερη από 1/30000 και μικρότερο. Για αυτήν την αραιώση του ειδικού αντισώματος ελέγχθηκε η επίδραση της μεταβολής της συγκέντρωσης (0.25, 0.5, 0.75, 1, 2 & 5 µg/mL) του ακινητοποιημένου στα φρεάτια PQ-VAL-BSA τόσο στο αναλυτικό σήμα του προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης όσο και στην εκτόπιση για πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1 ng/mL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 4B από όπου προκύπτει ότι η μέγιστη εκτόπιση για το πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 1 ng/mL (47%) σε συνδυασμό με υψηλό σήμα για το πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης επετεύχθη για συγκέντρωση πρωτεϊνικού συζεύγματος PQ-VAL-BSA 750 ng/mL και αραιώση ειδικού αντισώματος 1/30000.



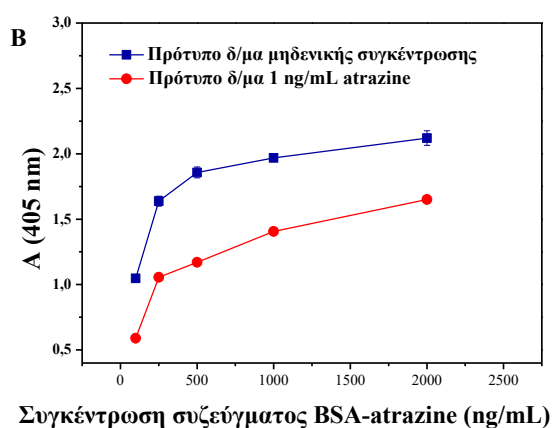
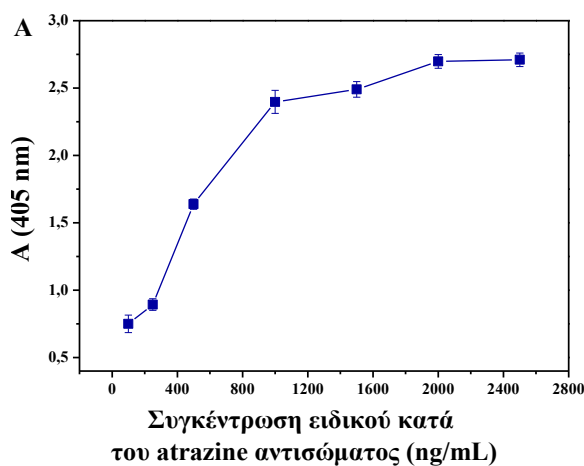
Σχήμα 3: (Α) Τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσει της αραίωσης του ειδικού έναντι του paraquat αντισώματος. (Β) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (■) και για το πρότυπο διάλυμα paraquat συγκεντρώσεως 1ng/mL (●) για αραίωση ειδικού αντισώματος 1/ 30000 συναρτήσει της συγκέντρωσης του συζεύγματος PQ-VAL-BSA στο διάλυμα ακινητοποίησης. (Γ) Καμπύλες εκτόπισης για τα τρία διαφορετικά πρωτεϊνικά συζεύγματα του paraquat PQ-VAL-BSA (□), PQ-CN-BSA_1 (○), PQ-CN-BSA_2 (Δ). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Μετά τον καθορισμό των βέλτιστων συνδυασμών συγκεντρώσεων συζεύγματος/αντισώματος και για τα τρία συζεύγματα ελήφθησαν για αυτούς του συνδυασμούς καμπύλες βαθμονόμησης. Συγκεκριμένα, σε φρεάτια μικροπιλοδότησης ακινητοποιήθηκαν το PQ-VAL-BSA σε συγκέντρωση 750 ng/mL και τα PQ-CN-BSA_1 & PQ-CN-BSA_2 σε συγκέντρωση 5 μg/mL και

ελήφθησαν καμπύλες βαθμονόμησης χρησιμοποιώντας αραιώσεις ειδικού αντισώματος 1/30000 και 1/20000. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 3Γ από όπου φαίνεται ότι το σύζευγμα με το βαλερικό οξύ παρέχει σημαντικά μεγαλύτερα ποσοστά εκτόπισης και επομένως αυξημένη ευαισθησία σε σχέση με τα άλλα δύο συζεύγματα. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε το σύζευγμα PQ-VAL-BSA για περαιτέρω βελτιστοποίηση του ανοσοχημικού προσδιορισμού του paraquat.

Σχετικά με το φυτοφάρμακο atrazine δεν χρειάστηκε η παρασκευή κάποιου πρωτεϊνικού συμπλέγματος καθώς αυτό ήταν εμπορικά διαθέσιμο, παρόλα αυτά εξετάστηκαν δύο είδη ειδικών αντισωμάτων, ένα πολυκλωνικό αντίσωμα κουνελιού και ένα μονοκλωνικό αντίσωμα ποντικού. Παρόλο που και τα δύο αντισώματα έδιναν πολύ υψηλά αναλυτικά σήματα, εντούτοις το μονοκλωνικό αντίσωμα παρουσίαζε πάρα πολύ χαμηλή ευαισθησία και ως εκ τούτου απορρίφθηκε. Για το πολυκλωνικό αντίσωμα προσδιορίστηκε η συγκέντρωση που παρείχε επαρκές αναλυτικό σήμα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης, για δεδομένη συγκέντρωση συζεύγματος BSA-atrazine ίση με 1 $\mu\text{g/mL}$. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 4Α για συγκεντρώσεις αντισώματος ίση με ή μεγαλύτερες από 500 ng/mL το αναλυτικό σήμα είναι επαρκές ενώ αποκτά τιμές οροφής για συγκέντρωση ειδικού αντισώματος ίση με ή μεγαλύτερη από 2 $\mu\text{g/mL}$. Στη συνέχεια, επιλέγοντας ως συγκέντρωση ειδικού αντισώματος τα 500 ng/mL μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος τόσο στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία της αντίδρασης. Για το σκοπό αυτό ακινητοποιήθηκε σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης το σύζευγμα BSA-atrazine από διαλύματα συγκέντρωσης 100, 250, 500, 1000 & 2000 ng/mL . Στο Σχήμα 4B παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης και ενός προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 1 ng/mL συναρτήσει της συγκέντρωσης του ακινητοποιημένου συζεύγματος. Η βέλτιστη ευαισθησία, εκτόπιση ίση με 56% για το πρότυπο συγκέντρωσης 1 ng/mL ως προς το σήμα μηδενικού προτύπου, λαμβάνεται όταν χρησιμοποιείται συγκέντρωση συζεύγματος 100 ng/mL στο διάλυμα ακινητοποίησης, ενώ για όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις παρατηρείται μείωση της ευαισθησίας. Συμπερασματικά, ο συνδυασμός 100 ng/mL συζεύγματος BSA-atrazine στο

διάλυμα ακινητοποίησης και 500 ng/mL ειδικού αντισώματος υιοθετήθηκε στο τελικό πρωτόκολλο του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού και στις υπόλοιπες δοκιμές βελτιστοποίησης.



Σχήμα 4: (A) Τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσε της συγκέντρωσης του ειδικού έναντι του atrazine αντισώματος. (B) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (■) και πρότυπο διάλυμα atrazine συγκέντρωσης 1ng/mL (●) για συγκέντρωση ειδικού αντισώματος 500 ng/mL συναρτήσε της συγκέντρωσης του συζεύγματος BSA-atrazine στο διάλυμα ακινητοποίησης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

5.1.2 Βελτιστοποίηση σύστασης ρυθμιστικών διαλυμάτων ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού

Στα πλαίσια της ανάπτυξης ενζυμοανασοχημικών προσδιορισμών των τριών φυτοφαρμάκων σε φρεάτια μικροπιλοδότησης βελτιστοποιήθηκε η σύσταση των ρυθμιστικών διαλυμάτων για τα διάφορα στάδια του εκάστοτε προσδιορισμού. Συγκεκριμένα εξετάστηκε η σύσταση του διαλύματος της ανοσοαντίδρασης, του διαλύματος αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων του στερεού φορέα και του διαλύματος εκπλύσεων.

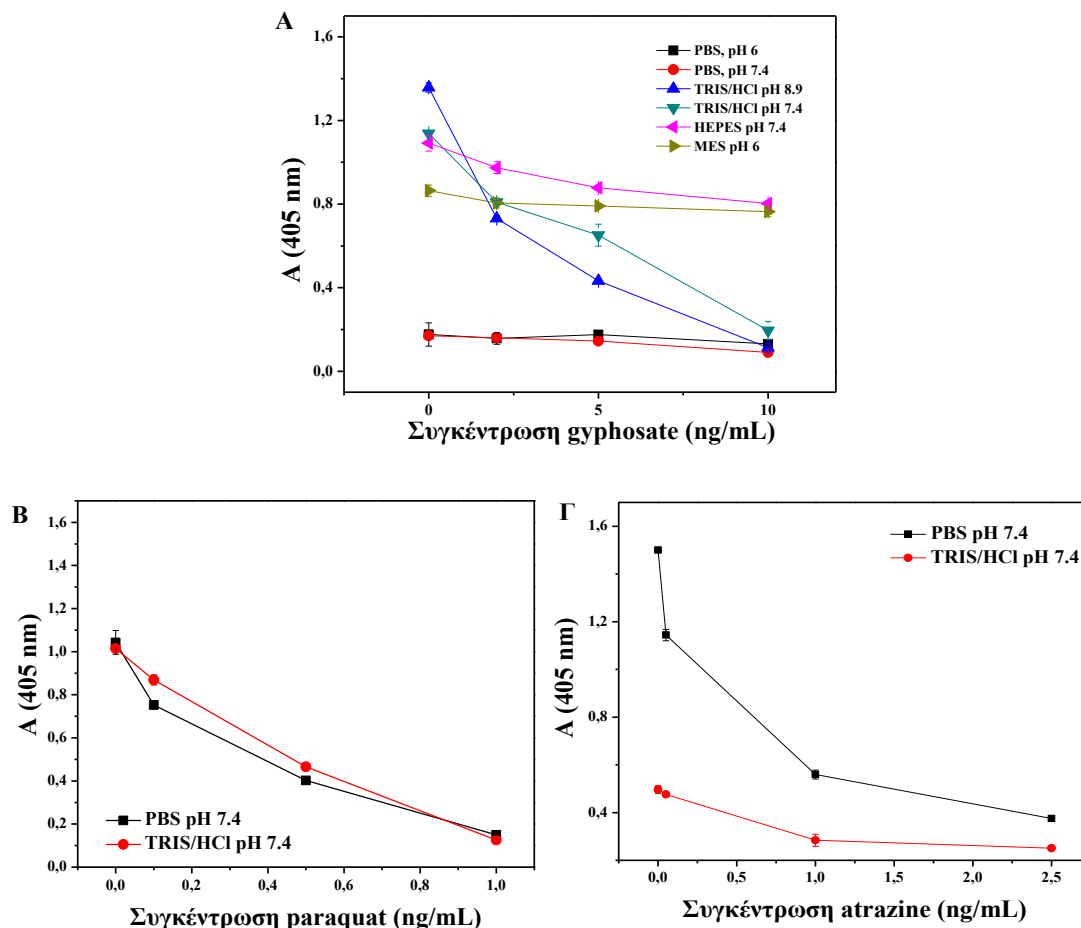
Για την επιλογή του καταλληλότερου ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοαντίδρασης για τον ενζυμοανασοχημικό προσδιορισμό του glyphosate ελέγχθηκαν τα εξής διαλύματα:

1. $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 50 mM, pH 6, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) blgG
2. $\text{HPO}_4^{2-}/\text{H}_2\text{PO}_4^-$ 50 mM, pH 7.4, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) blgG
3. Tris-HCl 50 mM, pH 8.9, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) blgG
4. Tris-HCl 50 mM, pH 7.4, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) blgG
5. HEPES 50 mM, pH 7.4, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) blgG
6. MES 50 mM, pH 6, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) blgG

Για όλες τις περιπτώσεις ως διάλυμα ακινητοποίησης του πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA_gly_2 στα φρεάτια μικροπιλοδότησης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών 50 mM, pH 9.25, ενώ ως διάλυμα αποκλεισμού των ελευθέρων θέσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1 M, pH 8.5, που περιείχε 1% (w/v) BSA.

Η βέλτιστη σύσταση του ρυθμιστικού διαλύματος ανοσοαντίδρασης επιλέχθηκε βάσει της τιμής του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης καθώς και των τιμών που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα glyphosate συγκέντρωσης 2.5, 5 και 10 ng/mL. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5A μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl παρουσιάζει τα καλύτερα

αποτελέσματα τόσο από πλευράς μέγιστου αναλυτικού σήματος όσο και μεγαλύτερης εκτόπισης παρουσία glyphosate.

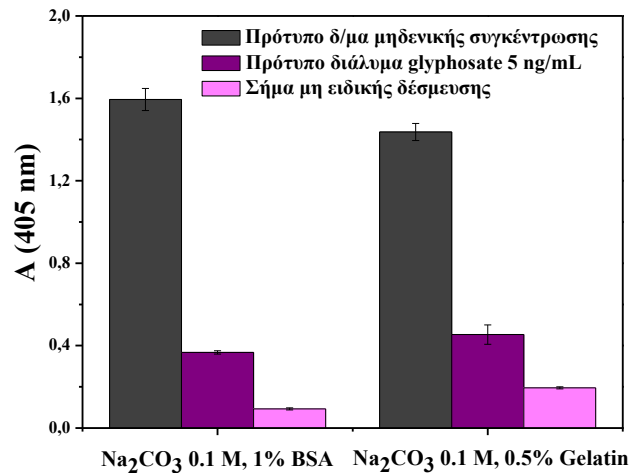


Σχήμα 5: (Α) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα glyphosate συγκέντρωσης 0, 2.5, 5 και 10 ng/mL όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4 (■), φωσφορικών pH 6 (◆), Tris/HCl 50 mM, pH 8.9 (▲), Tris/HCl 50 mM, pH 7.4 (▲), HEPES 50 mM, pH 7.4 (◄), MES 50 mM, pH 6 (▶) που περιείχαν 0.2% (w/v) BSA, 0.9% (w/v) NaCl, 0.05% (w/v) bIgG. (B & Γ) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για τα πρότυπα διαλύματα paraquat συγκέντρωσης 0, 0.1, 0.5, 1 και πρότυπα διαλύματα atrazine 0, 0.05, 1, 2.5 ng/mL, αντίστοιχα, όταν ως διάλυμα ανοσοαντίδρασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4 (■) ή TRIS/HCl 50 mM pH 7.4 (●), που περιέχουν 0.2% (w/v) BSA, 0.9% (w/v) NaCl. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Για τους άλλους δύο αναλύτες, δηλαδή το paraquat και το atrazine, εξετάστηκαν δύο διαλύματα ως ρυθμιστικά διαλύματα ανοσοαντίδρασης, το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4 και το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 τα οποία περιείχαν 0.2% (w/v) BSA & 0.9% (w/v) NaCl. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 5B, όσον αφορά τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό του paraquat, και τα δύο διαλύματα παρείχαν παρόμοιες τιμές σήματος για το μηδενικό πρότυπο με το διάλυμα φωσφορικών να παρέχει οριακά πιο ευαίσθητη καμπύλη. Αντίθετα, όπως προκύπτει από το Σχήμα 5Γ, όταν χρησιμοποιείται το Tris-HCl 50 Mm, pH 7.4 ως ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης στον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό του atrazine επηρεάζει αρνητικά το απόλυτο αναλυτικό σήμα το οποίο μειώνεται σε ποσοστό ~60% σε σχέση με το σήμα που λαμβάνεται για το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.4.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνουμε ότι για τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό του glyphosate το βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης είναι το Tris-HCl 50 mM pH 8.9, 0.9% (w/v) NaCl, 0.2% (w/v) BSA, 0.05% (w/v) bIgG, ενώ για τον προσδιορισμό των paraquat & atrazine το βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα είναι το διάλυμα φωσφορικών 50 mM pH 7.4, 0.2% (w/v) BSA & 0.9% (w/v) NaCl.

Ως διαλύματα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων εξετάστηκε το ρυθμιστικό διάλυμα όξινων ανθρακικών (0.1 M, pH 8.5) το οποίο περιείχε πρωτεΐνη αλβουμίνη ορού βοός σε περιεκτικότητα 1% (w/v) ή ζελατίνη σε περιεκτικότητα 0.5% (w/v). Στο Σχήμα 6 παρουσιάζονται οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης, διάλυμα συγκέντρωσης 5 ng/mL σε glyphosate καθώς και το σήμα μη ειδικής δέσμευσης που προσδιορίστηκε από μη επικαλυμμένα με σύζευγμα για τα δύο διαλύματα αποκλεισμού που εξετάστηκαν.

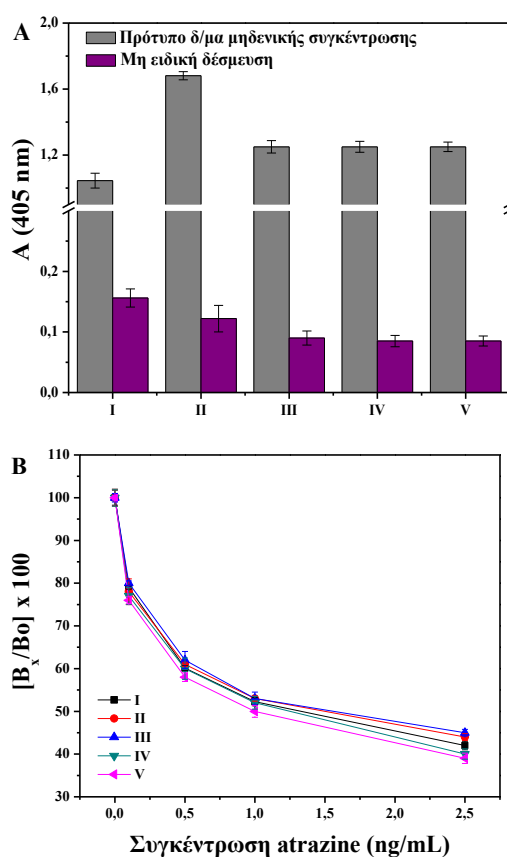


Σχήμα 6: Τιμές απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες), για πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 5 ng/mL (μωβ στήλες) glyphosate καθώς και το σήμα μη ειδικής δέσμευσης (ροζ στήλες) όταν για τον αποκλεισμό των ελευθέρων θέσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα Na₂CO₃ 0.1 M, pH 8.5, που περιέχει BSA 1% (w/v) 0.5% (w/v) ζελατίνη. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων ±SD.

Παρατηρούμε ότι χρησιμοποιώντας ζελατίνη ως πρωτεΐνη αποκλεισμού το σήμα της μη ειδικής δέσμευσης αυξάνεται στο διπλάσιο κ σε σχέση με το αντίστοιχο σήμα που λαμβάνεται όταν χρησιμοποιείται BSA και ταυτόχρονα μειώνεται η ευαισθησία της ανίχνευσης. Επομένως ως διάλυμα αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων επιλέχθηκε το διάλυμα όξινων ανθρακικών 0.1 M, pH 8.5, το οποίο περιέχει με 1% (w/v) διαλυμένη αλβουμίνη ορού βοός.

Ένα ακόμη διάλυμα του οποίου βελτιστοποιήθηκε η σύσταση είναι το ρυθμιστικό διάλυμα εκπλύσεων και συγκεκριμένα η περιεκτικότητα του σε επιφανειοδραστικό Tween 20. Η προσθήκη επιφανειοδραστικού μπορεί να αυξήσει το απόλυτο αναλυτικό σήμα, να επηρεάσει την ευαισθησία της καμπύλης αλλά και το σήμα μη ειδικής δέσμευσης. Ως ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης επιλέχθηκε για τον ενζυμοανασοχημικό προσδιορισμό του glyphosate ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 50 mM, pH 8.9, 0.9% (w/v) NaCl και για τους προσδιορισμούς των paraquat & atrazine PBS 50 mM, pH 7.4. Μελετήθηκε η επίδραση της προσθήκης 0.05% (v/v) Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα έκπλυσης τόσο στο σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης όσο και στο σήμα της

μη ειδικής δέσμευσης. Πιο αναλυτικά, συγκρίθηκαν οι τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν από φρεάτια στα οποία οι εκπλύσεις είχαν πραγματοποιηθεί με διάλυμα που δεν περιείχε Tween 20 με αυτές που ελήφθησαν από φρεάτια που είχαν εκπλυθεί με διάλυμα που περιείχε Tween 20 μετά από καθένα από τα διάφορα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού, δηλαδή για εκπλύσεις μετά την ακινητοποίηση του εκάστοτε πρωτεϊνικού συζεύγματος, μετά τον αποκλεισμό των ελεύθερων θέσεων των φρεατίων μικροπιλοδότησης, μετά την ανοσοαντίδραση και μετά την αντίδραση με το δεύτερο αντίσωμα.



Σχήμα 7: (Α) Τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα atrazine μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) και οι αντίστοιχες τιμές μη ειδικής δέσμευσης (μωβ στήλες) και (Β) καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν όταν πραγματοποιήθηκε έκπλυση με διάλυμα χωρίς Tween 20 σε όλα τα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού (I) ή έκπλυση με διάλυμα που περιείχε 0.05% (v/v) Tween 20 σε όλα τα στάδια μετά την ακινητοποίηση του συζεύγματος BSA-atrazine (II), σε όλα τα στάδια μετά τον αποκλεισμό των ελεύθερων θέσεων (III), σε όλα τα στάδια μετά την ανοσοαντίδραση (IV) και τέλος στο στάδιο μετά την επώαση με το διάλυμα του δευτέρου αντισώματος (V). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Στο Σχήμα 7A παρουσιάζονται ενδεικτικά τα αποτελέσματα αυτής της δοκιμής για τον αναλύτη atrazine όσον αφορά τις τιμές οπτικής απορρόφησης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης καθώς και τις τιμές που αντιστοιχούν στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης. Από το σχήμα προκύπτει, ότι η έκπλυση με διάλυμα που περιέχει Tween 20 αυξάνει το ειδικό σήμα κατά περίπου 40% ενώ παράλληλα μειώνει σημαντικά το μη ειδικό σήμα. Επίσης οι λόγοι σήματος μηδενικού προτύπου προς σήμα μη ειδικής δέσμευσης που ελήφθησαν όταν χρησιμοποιήθηκε διάλυμα έκπλυσης το οποίο περιείχε Tween 20 μετά από κάθε στάδιο του ανοσοπροσδιορισμού ήταν εφάμιλλοι.

Στο Σχήμα 7B παρουσιάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα atrazine συγκέντρωσης 0, 0.1, 0.5, 1 & 2.5 ng/mL ng/mL, όταν οι εκπλύσεις είχαν πραγματοποιηθεί με διάλυμα που δεν περιείχε Tween 20 ή με διάλυμα που περιείχε Tween 20 μετά από καθένα από τα διάφορα στάδια του ανοσοπροσδιορισμού, από το Σχήμα 7B προκύπτει ότι η προσθήκη Tween 20 στο ρυθμιστικό διάλυμα δεν επηρεάζει την καμπύλη βαθμονόμησης. Ως εκ τούτου, το ρυθμιστικό διάλυμα PBS 50 mM, pH 7.4, 0.05% (v/v) Tween 20 υιοθετήθηκε για όλες οι εκπλύσεις κατά τον ενζυμοανοσοχημικό προσδιορισμό του atrazine.

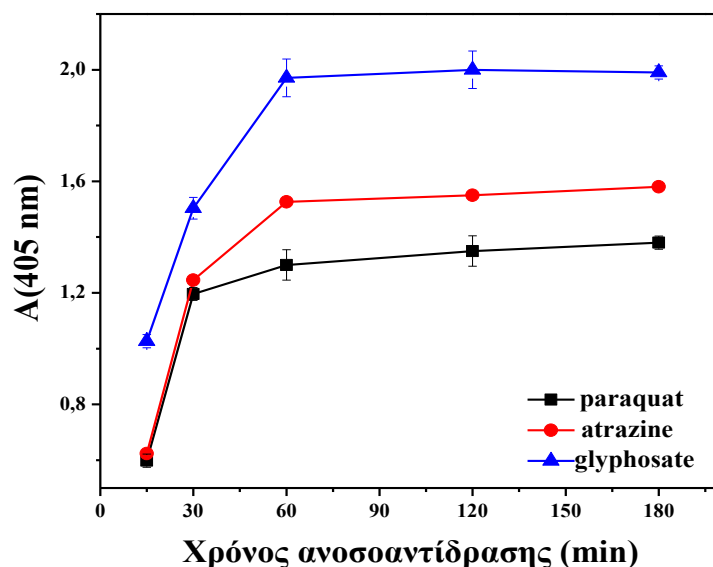
Παρόμοια αποτελέσματα ελήφθησαν για τις αντίστοιχες δοκιμές που αφορούσαν τις εκπλύσεις κατά τα στάδια του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού του paraquat αλλά και του glyphosate. Συμπερασματικά και για τους τρεις αναλύτες υιοθετήθηκε η προσθήκη επιφανειοδραστικού Tween 20 0.05 % (v/v) στα ρυθμιστικά διαλύματα έκπλυσης για όλες τις εκπλύσεις μεταξύ των σταδίων του εκάστοτε προσδιορισμού.

5.1.3 Μελέτη χρονικής διάρκειας ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών

Μια πολύ σημαντική παράμετρος στους ενζυμοανοσοχημικούς προσδιορισμούς, η οποία επηρεάζει τόσο το αναλυτικό σήμα όσο και την ευαισθησία της ανίχνευσης, είναι ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης. Στα πλαίσια

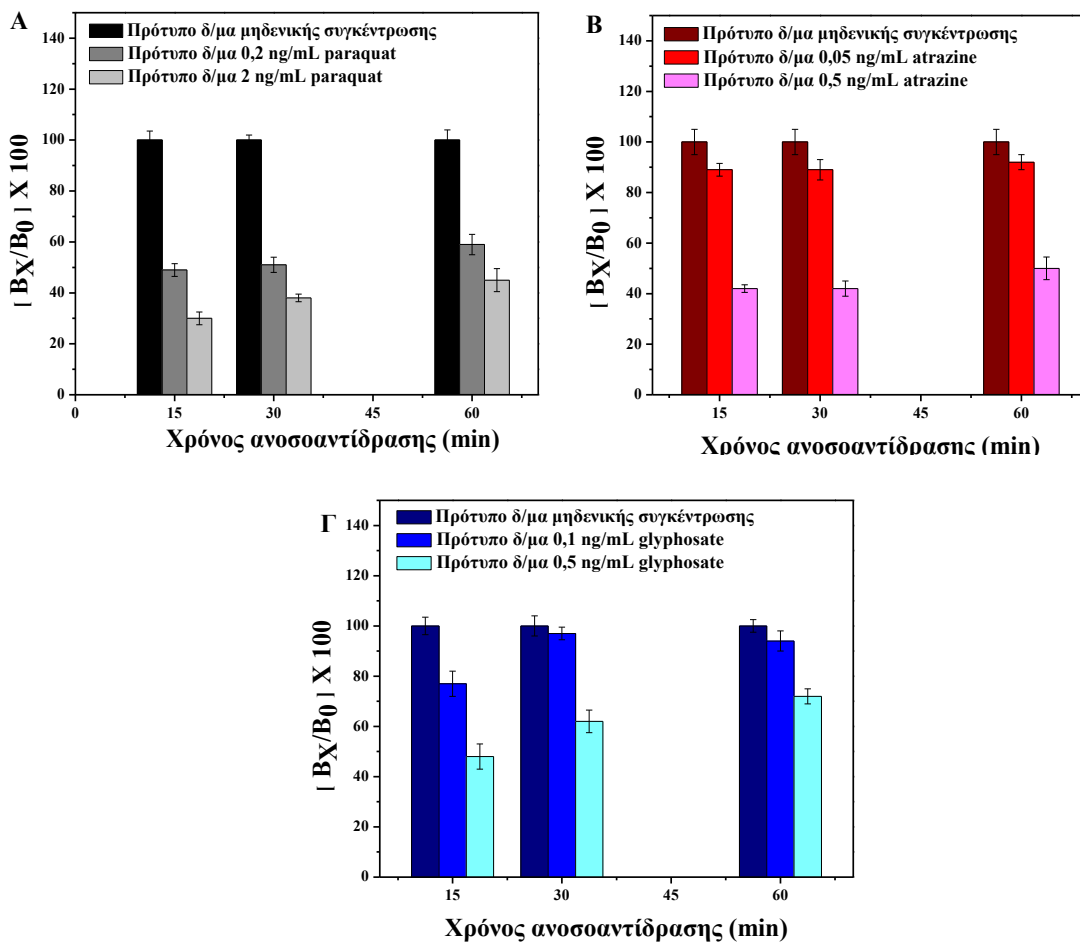
της ανάπτυξης των ενζυμοανοδοχημικών προσδιορισμών για τα τρία φυτοφάρμακα, χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες για κάθε αναλύτη όπως προσδιορίστηκαν στα προηγούμενα υποκεφάλαια 5.1.1 - 5.1.2, προσδιορίστηκαν οι βέλτιστοι χρόνοι ανοσοαντίδρασης διατηρώντας τον χρόνο αντίδρασης με τα επισημασμένα αντισώματα έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού, κουνελιού ή όρνιθας σταθερό στα 30 min. Στο Σχήμα 8 παρουσιάζεται η μεταβολή του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για τα πρότυπα διαλύματα μηδενικής συγκέντρωσης των τριών αναλυτών συναρτήσει του χρόνου ανοσοαντίδρασης. Παρατηρείται αύξηση του αναλυτικού σήματος όσο αυξάνεται ο χρόνος ανοσοαντίδρασης ενώ και για τους τρεις αναλύτες μέγιστες τιμές οροφής του διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης λαμβάνονται για χρόνο μεγαλύτερο ή ίσο των 60 min. Παραταύτα τιμή απορρόφησης ~ 1 λαμβάνεται για χρονική διάρκεια ανοσοαντίδρασης ίση με 15 min ανοσοαντίδρασης για το glyphosate ενώ για τα paraquat και atrazine πάνω από 80% του μέγιστου σήματος επιτυγχάνεται για διάρκεια ανοσοαντίδρασης 30 min.

Στο Σχήμα 9 παρουσιάζονται τα επί τοις εκατό ποσοστά που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα καθενός από τους τρεις αναλύτες ως προς το σήμα του αντίστοιχου μηδενικού προτύπου για διάρκεια ανοσοαντίδρασης 15, 30 και 60 min. Συγκεκριμένα στο Σχήμα 9Α παρατηρούμε ότι η επί τοις εκατό ποσοστιαία πτώση του σήματος που αντιστοιχεί σε πρότυπα διαλύματα του paraquat συγκέντρωσης 0.2 ng/mL και 2 ng/mL είναι σταθερή για τους τρεις χρόνους αντίδρασης που εξετάστηκαν.



Σχήμα 8: Επίδραση της χρονικής διάρκειας της ανοσοαντίδρασης στις τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπα διαλύματα μηδενικής συγκέντρωσης paraquat (■), atrazine (●) και glyphosate (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

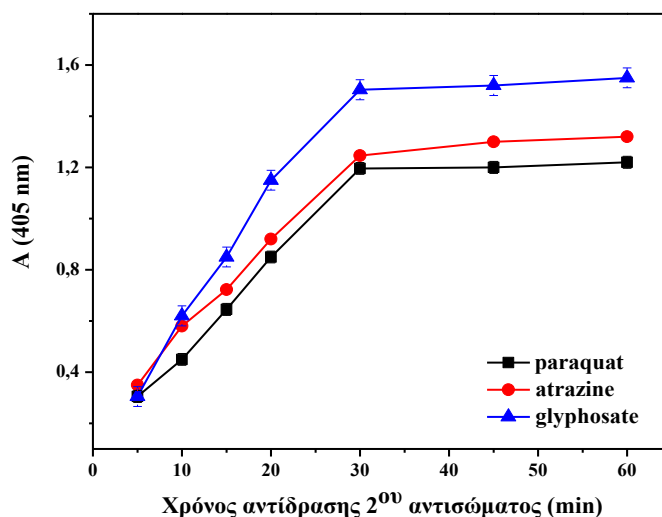
Ομοίως από το Σχήμα 9B προκύπτει ότι για πρότυπα διαλύματα atrazine 0.05 και 0.5 ng/mL η επί τοις εκατό ποσοστιαία πτώση του σήματος, και επομένως η ευαισθησία της ανίχνευσης, αυξάνεται καθώς ο χρόνος ανοσοαντίδρασης αυξάνει από 15 σε 60 min όπου εδώ μεγαλύτερη επίδραση παρουσιάζουν τα 60 min ανοσοαντίδρασης. Τέλος, όσον αφορά το glyphosate οι τιμές ποσοστιαίας πτώσης του αναλυτικού σήματος και για τα δύο πρότυπα διαλύματα παρουσίαζαν σταδιακή μείωση, και επομένως μείωση της ευαισθησίας ανίχνευσης, (Σχήμα 9Γ) συναρτήσε του χρόνου ανοσοαντίδρασης. Επομένως λαμβάνοντας υπ' όψιν τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στα σχήματα 8 και 9, ο χρόνος ανοσοαντίδρασης που επιλέχθηκε για το τελικό πρωτόκολλο του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού των paraquat και atrazine σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης ήταν 30 min ενώ για του glyphosate τα 15 min.



Σχήμα 9: Επί τοις εκατό ποσοστά που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα (Α) paraquat, (Β) atrazine και (Γ) glyphosate ως προς το σήμα του αντίστοιχου μηδενικού προτύπου για διάρκεια ανοσοαντίδρασης 15 min, 30 min & 60 min.

Εκτός από την χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης, βελτιστοποιήθηκε και ο χρόνος αντίδρασης των επισημασμένων με υπεροξειδάση της ραπανάδος $2^{\omega\nu}$ αντισωμάτων με τα ειδικά αντισώματα για κάθε αναλύτη. Συγκεκριμένα μελετήθηκε ο χρόνος αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια ειδικό αντίσωμα έναντι του paraquat, του αντισώματος των γ-σφαιρινών κουνελιού με το ειδικό αντίσωμα έναντι του atrazine και του αντισώματος των γ-σφαιρινών όρνιθας με το ειδικό αντίσωμα έναντι του glyphosate. Στο Σχήμα 10 παρουσιάζεται η μεταβολή του αναλυτικού σήματος που ελήφθη για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης του paraquat, atrazine και glyphosate, αντίστοιχα, συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του αντισώματος έναντι των γ-σφαιρινών ποντικού, κουνελιού ή

όρνιθας με τα ακινητοποιημένα στα φρεάτια ειδικά αντισώματα έναντι καθενός από τα φυτοφάρμακα, διατηρώντας τον βέλτιστο χρόνο ανοσοαντίδρασης σταθερό (30 min για το atrazine και το paraquat, 15 min για το glyphosate). Όπως προκύπτει από το Σχήμα 10 μέγιστες τιμές οροφής για τα πρότυπα διαλύματα μηδενικής συγκέντρωσης και των τριών αναλυτών ελήφθησαν για χρόνο αντίδρασης των δευτέρων αντισωμάτων με τα ειδικά έναντι των φυτοφαρμάκων αντισώματα μεγαλύτερο ή ίσο από 30 min, για το λόγο αυτό, ο χρόνος των 30 min υιοθετήθηκε στο τελικό πρωτόκολλο των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών.

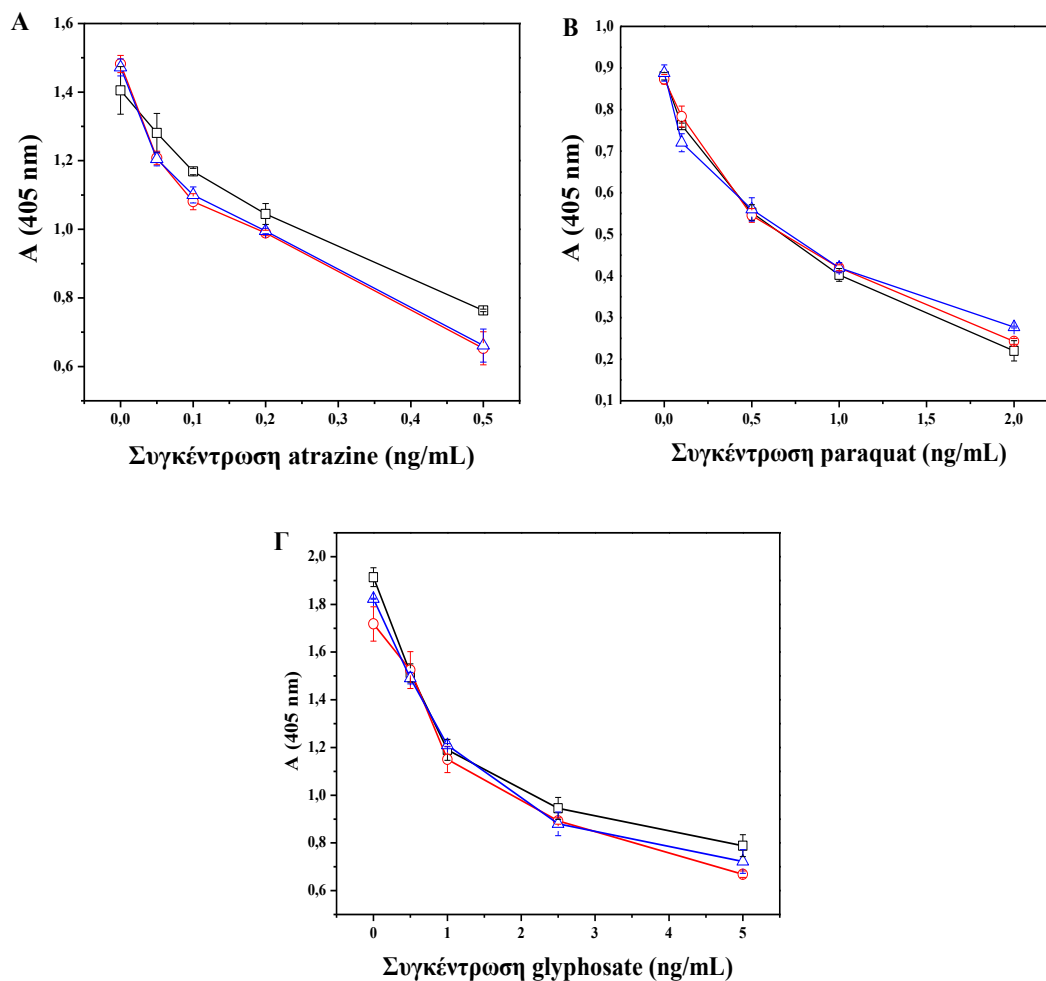


Σχήμα 10: Τιμές οπτικής απορρόφησης που λαμβάνονται για πρότυπα διαλύματα μηδενικής συγκέντρωσης του paraquat (■), atrazine (●) και glyphosate (▲) συναρτήσει του χρόνου αντίδρασης του αντίστοιχου δευτέρου αντισώματος με τα ακινητοποιημένα στα φρεάτια ειδικά αντισώματα έναντι κάθε αναλύτη. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

5.1.4 Μελέτη επίδρασης της προεπώασης και βελτιστοποίηση της τροποποίησης του glyphosate

Μια ακόμη παράμετρος που μελετήθηκε είναι η προεπώαση των διαλυμάτων των αναλυτών με το ειδικό έναντι του κάθε αναλύτη αντίσωμα πριν την επώαση με το ακινητοποιημένο στα φρεάτια μικροπιλοδότησης αναλύτη με

τη μορφή πρωτεϊνικού συζεύγματος. Συγκεκριμένα χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συγκεντρώσεις ακινητοποιημένων συζευγμάτων, ειδικών αντισωμάτων και συνθηκών ανοσοανάλυσης, όπως καθορίστηκαν στα Υποκεφάλαια 5.1.1 – 5.1.3 ελήφθησαν καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη χωρίς και με την παρεμβολή ενός σταδίου προεπώασης. Πιο συγκεκριμένα παρασκευάστηκαν μίγματα προτύπων διαλυμάτων του atrazine (0.05, 0.1, 0.2, & 0.5 ng/mL), του paraquat (0.1, 0.5, 1, 2 ng/mL) και glyphosate (0.5, 1, 2.5, 5 ng/mL) με το διάλυμα του εκάστοτε ειδικού αντισώματος κατά του φυτοφαρμάκου στην βέλτιστη συγκέντρωση. Τα μίγματα αυτά είτε προστέθηκαν απευθείας στα φρεάτια μικροπιλοδότησης χωρίς προεπώαση είτε αφέθηκαν να αντιδράσουν για 30 min ή 60 min πριν την προσθήκη στα φρεάτια μικροπιλοδότησης. Στο Σχήμα 11 παρατίθενται οι καμπύλες βαθμονόμησης από όπου διαπιστώνεται ότι για τα paraquat (Σχήμα 11B) και glyphosate (Σχήμα 11Γ) η προεπώαση είτε δεν είχε καμία επίδραση ούτε στο απόλυτο αναλυτικό σήμα αλλά ούτε και στην ευαισθησία της καμπύλης ή είχε και οριακά αρνητική επίδραση. Αντίθετα όπως προκύπτει από το Σχήμα 11A για το atrazine προεπώαση επί 30 ή 60 min αύξησε το αναλυτικό σήμα και ταυτόχρονα βελτίωσε την ευαισθησία. Συμπερασματικά από τη μελέτη προέκυψε ότι το στάδιο της προεπώασης δεν είναι απαραίτητο στον προσδιορισμό των paraquat και glyphosate ενώ για το atrazine υιοθετήθηκε στο τελικό πρωτόκολλο ένα στάδιο προεπώασης 30 min.

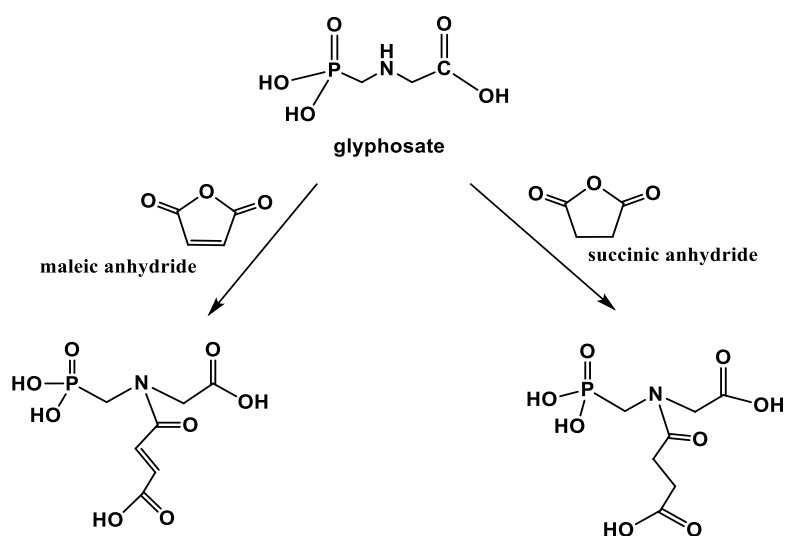


Σχήμα 11: Καμπύλες βαθμονόμησης atrazine (A), paraquat (B) και glyphosate (Γ) που ελήφθησαν χωρίς προεπίπωση των προτύπων διαλυμάτων με το διάλυμα του αντίστοιχου ειδικού αντισώματος (□), ή με προεπίπωση 30 min (○) ή 60 min (△). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα [119, 209, 210] τροποποίηση του glyphosate με έναν ανυδρίτη (οξικό, ηλεκτρικό, μηλεϊνικό, κλπ), ο οποίος αντιδρά με την δευτεροταγή αμινομάδα του glyphosate, οδηγεί σε τέτοια αλλαγή της δομής του μορίου που ενδέχεται να αυξήσει την ικανότητα δέσμευσης του ελεύθερου αναλύτη από το ειδικό αντίσωμα σε σχέση με το ακινητοποιημένο με τη μορφή πρωτεϊνικού συζεύγματος glyphosate, ενισχύοντας κατά αυτόν τον τρόπο την ευαισθησία της ανίχνευσης. Η καλύτερη αναγνώριση του τροποποιημένου glyphosate από το ειδικό αντίσωμα, σχετίζεται με τον τρόπο με τον οποίο αναπτύχθηκε το συγκεκριμένο αντίσωμα και συγκεκριμένα με τη χημεία

της σύνδεσης του φυτοφαρμάκου στην φέρουσα πρωτεΐνη για την παρασκευή του ανοσογόνου καθώς είναι πιθανό το αντίσωμα να αναγνωρίζει όχι μόνο το μόριο του glyphosate αλλά και τη γέφυρα σύνδεσης με την πρωτεΐνη.

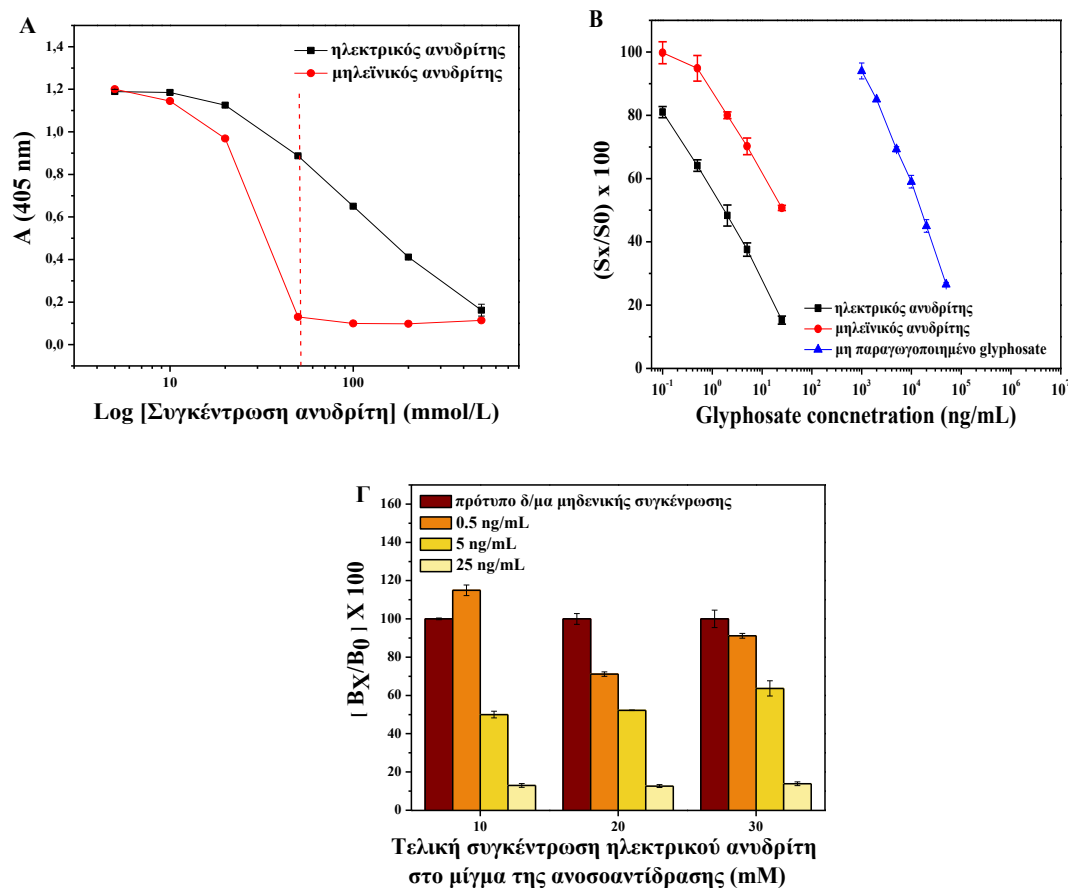
Στη συγκεκριμένη μελέτη και βασιζόμενοι σε βιβλιογραφικά δεδομένα εξετάστηκαν ως αντιδραστήρια για την παραγωγοποίηση του glyphosate ο μηλεϊνικός και ο ηλεκτρικός ανυδρίτης [209]. Στην Εικόνα 31 παρουσιάζονται οι αντιδράσεις παραγωγοποίησης του glyphosate μέσω αντίδρασης με μηλεϊνικό (maleic anhydride) ή ηλεκτρικό (succinic anhydride) ανυδρίτη, αντίστοιχα. Το πρωτόκολλο της παραγωγοποίησης περιλαμβάνει προσθήκη 2 μL διαλύματος ανυδρίτη που έχει παρασκευαστεί σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO) σε 100 μL προτύπου διαλύματος glyphosate ή δείγματος του οποίου το pH είχε ρυθμιστεί σε ~ 8.0 με προσθήκη 10% (ο/ο) διαλύματος NaHCO_3 0.5 M και αφήνονται να αντιδράσουν σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολουθεί αναλυτική περιγραφή της βελτιστοποίησης του πρωτοκόλλου παραγωγοποίησης του glyphosate με ανυδρίτη.



Εικόνα 31: Αντίδραση του glyphosate με μηλεϊνικό (maleic anhydride) ή ηλεκτρικό (succinic anhydride) ανυδρίτη.

Αρχικά εξετάστηκε εάν οι ανυδρίτες αναγνωρίζονται από το ειδικό αντίσωμα, έτσι ώστε να προσδιορισθεί εκείνη η συγκέντρωση ανυδρίτη η οποία

να εξασφαλίζει περίσσεια ανυδρίτη ακόμα και για δείγματα υψηλής συγκέντρωσης σε glyphosate αλλά ταυτόχρονα τόσο η ποσότητα του υδρολυμένου όσο και του μη αντιδρώντος ανυδρίτη να μην παρεμβαίνει στην ανοσοαντίδραση.



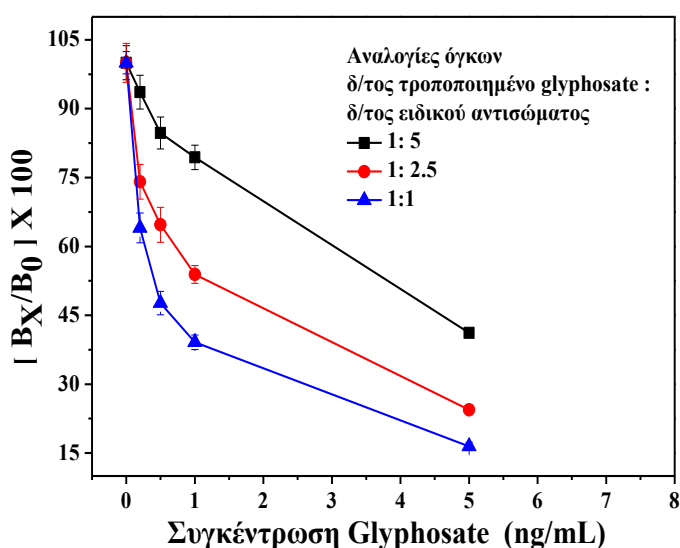
Σχήμα 12: (Α) Επίδραση της συγκέντρωσης του μηλεϊνικού (●) και του ηλεκτρικού (■) ανυδρίτη στο σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης. (Β) Καμπύλες βαθμονόμησης glyphosate που ελήφθησαν με πρότυπα διαλύματα τα οποία είχαν παραγωγοποιηθεί με μηλεϊνικό (●) ή ηλεκτρικό ανυδρίτη (■) σε τελική συγκέντρωση ανυδρίτη 20 mM καθώς και με πρότυπα διαλύματα χωρίς παραγωγοποίηση με ανυδρίτη (▲). (Γ) Επίδραση τριών διαφορετικών τελικών συγκεντρώσεων ηλεκτρικού ανυδρίτη (10 mM, 20mM, 50 mM) στην που λαμβάνεται για πρότυπα διαλύματα glyphosate συγκέντρωσης 0.5, 5 & 25 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Στο Σχήμα 12Α παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης των δύο ανυδριτών στο σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης, από όπου προκύπτει ότι υπάρχει σημαντική επίδραση στο σήμα, ειδικά για τον μηλεϊνικό ανυδρίτη, για συγκεντρώσεις ίσες με ή μεγαλύτερες από 50 mM. Επομένως επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 20 mM και για τους δύο ανυδρίτες ώστε να ελεγχθεί η επίδραση του ανυδρίτη στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 12Β, η καμπύλη βαθμονόμησης που ελήφθη με πρότυπα διαλύματα στα οποία το glyphosate είχε αντιδράσει με ηλεκτρικό ανυδρίτη έχει σημαντικά βελτιωμένη ευαισθησία ανίχνευσης συγκριτικά με την καμπύλη βαθμονόμησης που ελήφθη με πρότυπα διαλύματα που είχαν αντιδράσει με μηλεϊνικό ανυδρίτη. Επίσης, από το σχήμα προκύπτει ότι στην περίπτωση που τα πρότυπα διαλύματα του glyphosate χρησιμοποιήθηκαν χωρίς τροποποίηση (μπλε γραμμή, Σχήμα 12Β), το όριο ανίχνευσης είναι 1.5 µg/mL. Διαπιστώνουμε επομένως την αναγκαιότητα του βήματος της παραγωγοποίησης του glyphosate με ανυδρίτη, και ειδικότερα με ηλεκτρικό ανυδρίτη, καθώς βελτιώνει κατά δύο τάξεις μεγέθους την ευαισθησία της ανίχνευσης.

Ακολούθως διερευνήθηκε εκτενέστερα η επίδραση της συγκέντρωσης του ηλεκτρικού ανυδρίτη στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Συγκεκριμένα συγκρίθηκαν οι εκτοπίσεις που αντιστοιχούσαν σε πρότυπα διαλύματα glyphosate όταν η παραγωγοποίηση πραγματοποιηθεί με τέτοια ποσότητα ηλεκτρικού ανυδρίτη ώστε η συγκέντρωση του στο μίγμα της ανοσοαντίδρασης να είναι 10 mM, 20 mM ή 50 mM, αντίστοιχα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 12Γ, η μεγαλύτερη επίδραση παρατηρείται για το πρότυπο με την μικρότερη συγκέντρωση σε glyphosate (0.5 ng/mL) για το οποίο η βέλτιστη εκτόπιση επιτυγχάνεται για συγκέντρωση ανυδρίτη ίση με 20 mM. Αντίθετα για συγκέντρωση 10 mM πιθανώς η ποσότητα ηλεκτρικού ανυδρίτη εξαρχής δεν επαρκεί για αποτελεσματική τροποποίηση του αναλύτη, καθώς ταυτόχρονα με την τροποποίηση ο ανυδρίτης υδρολύεται, ενώ για τελική συγκέντρωση 50 mM πιθανώς απομένει στο μίγμα της ανοσοαντίδρασης ικανή ποσότητα υδρολυμένου ανυδρίτη η οποία δρα σαν παρεμποδιστής μειώνοντας την ευαισθησία της ανίχνευσης. Οπότε για την περαιτέρω βελτιστοποίηση του ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate αλλά και για το τελικό πρωτόκολλο του ανοσοπροσδιορισμού

επιλέχθηκε τελική συγκέντρωση ηλεκτρικού ανυδρίτη στο μίγμα της ανοσοαντίδρασης 20 mM.

Ο καθορισμός της βέλτιστης συγκέντρωσης του ανυδρίτη στο μίγμα της ανοσοαντίδρασης πραγματοποιήθηκε διατηρώντας σε όλα τα πειράματα που προηγήθηκαν αναλογία όγκου του παραγωγοποιημένου πρότυπου διαλύματος αναλύτη και του διαλύματος ειδικού αντισώματος στο μίγμα της ανοσοαντίδρασης 1:1. Όμως λόγω του γεγονότος ότι ο ηλεκτρικός ανυδρίτης αρχικά διαλύεται σε DMSO, η παρουσία του οποίου μπορεί να επηρεάζει την ανοσοαντίδραση, και στην προσπάθεια περαιτέρω βελτίωσης της ευαισθησίας της ανίχνευσης, μελετήθηκε η αύξηση της κατά όγκον αναλογία παραγωγοποιημένου προτύπου διαλύματος προς διάλυμα αντισώματος, διατηρώντας την ποσότητα του ηλεκτρικού ανυδρίτη που χρησιμοποιείται για τροποποίηση ίδια σε όλες τις περιπτώσεις (η οποία οδηγεί σε τελική συγκέντρωση 20 mM όταν η κατά όγκον αναλογία είναι 1:1).



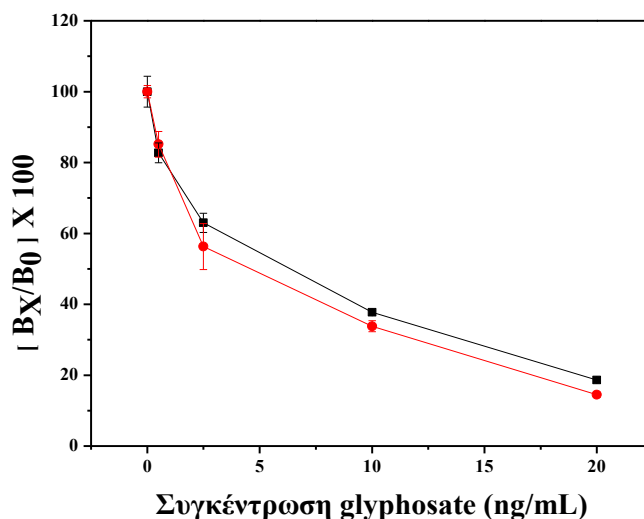
Σχήμα 13: Επίδραση στην καμπύλη βαθμονόμησης της αναλογίας όγκων προτύπου διαλύματος glyphosate προς το διάλυμα του ειδικού αντισώματος στο τελικό μίγμα της ανοσοαντίδρασης. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 13 εκτός από την αναλογία 1:1, εξετάστηκαν οι αναλογίες 1:2.5, και 1:5. Όπως προκύπτει από το σχήμα, οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για αναλογίες 1:2.5 και 1:5 οδήγησαν σε μείωση της ευαισθησίας συγκριτικά με την καμπύλη που ελήφθη για αναλογία όγκων 1:1. Οπότε στο τελικό πρωτόκολλο διατηρήθηκε η αναλογία όγκων 1:1 μεταξύ προτύπου διαλύματος glyphosate και ειδικού αντισώματος αφού με αυτήν επιτυγχάνονταν η βέλτιστη καμπύλη βαθμονόμησης.

5.1.5 Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση ενζυμοανοσοχημικού προσδιορισμού για το φυτοφάρμακο glyphosate σε φρεάτια μικροτιλοδότησης με ανίχνευση που βασίζεται στο σύστημα βιοτίνη-στρεπταβιδίνη

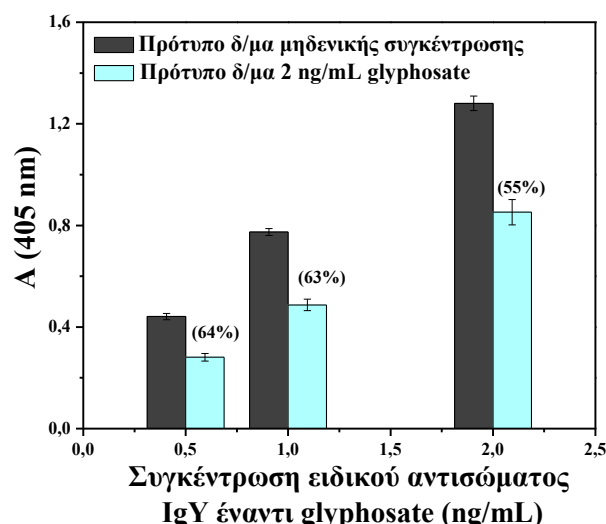
Στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της ευαισθησίας της ανίχνευσης του glyphosate διερευνήθηκε η εφαρμογή του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης για την ενίσχυση του σήματος. Πιο συγκεκριμένα εξετάστηκε η χρήση βιοτινυλιωμένου ειδικού αντισώματος ή βιοτινυλιωμένου αντισώματος κατά των γ-σφαιρινών όρνιθας (2^ο αντίσωμα). Στην πρώτη περίπτωση η ανίχνευση του ανοσοσυμπλέγματος πραγματοποιήθηκε απευθείας με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με υπεροξειδάση της ραπανίδος μετά την ολοκλήρωση της ανοσοαντίδρασης ενώ στην δεύτερη περίπτωση μετά το πέρας της ανοσοαντίδρασης ακολούθησε αρχικά επώαση με το βιοτινυλιωμένο αντίσωμα κατά των γ-σφαιρινών όρνιθας και στην συνέχεια επώαση με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με υπεροξειδάση της ραπανίδος. Και στις δύο περιπτώσεις οι ενζυμοανοσοχημικοί προσδιορισμοί βελτιστοποιήθηκαν αναφορικά με την συγκέντρωση του βιοτινυλιωμένου ειδικού αντισώματος ή του βιοτινυλιωμένου 2^{ου} αντισώματος. Όλες οι υπόλοιπες παράμετροι όπως τα διαλύματα των διαφόρων σταδίων, ο χρόνος ανοσοαντίδρασης και η παραγωγοποίηση του αναλύτη με ηλεκτρικό ανυδρίτη διατηρήθηκαν όπως καθορίστηκαν στα προηγούμενα υποκεφάλαια. Όσον αφορά την διαμόρφωση που περιελάμβανε βιοτινυλιωμένο ειδικό αντίσωμα έναντι του glyphosate διαπιστώθηκε ότι χρειαζόνταν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες αντισώματος σε σχέση με αυτές που απαιτούντο όταν χρησιμοποιούνταν μη βιοτινυλιωμένο αντίσωμα για να επιτευχθεί ικανοποιητικό αναλυτικό σήμα γεγονός που επέδρασε αρνητικά στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Η ανάγκη χρήσης μεγαλύτερων συγκεντρώσεων

ειδικού αντισώματος αποδόθηκε σε μερική απώλεια της δραστικότητας του αντισώματος κατά τη διαδικασία της βιοτινυλίωσης.



Σχήμα 14: Καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν είτε με επισημασμένο με HRP 2^ο αντίσωμα (■), είτε με βιοτινυλιωμένο 2^ο αντίσωμα σε συνδυασμό με στρεπταβιδίνη επισημασμένη με HRP (●). Και στις δύο περιπτώσεις η συγκέντρωση του συζεύγματος BSA-Gly_2 είναι 2 μg/mL και του ειδικού κατά του glyphosate αντισώματος 2 μg/mL. Το επισημασμένο με HRP 2^ο αντίσωμα χρησιμοποιήθηκε σε αραιώση 1:1000 ενώ το βιοτινυλιωμένο 2^ο αντίσωμα σε συγκέντρωση 5 μg/mL και η στρεπταβιδίνη-HRP σε συγκέντρωση 500 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Όσον αφορά στη 2^η διαμόρφωση ελέγχθηκε εάν η χρήση του βιοτινυλιωμένου 2^{ου} αντισώματος πλεονεκτεί έναντι της χρήσης επισημασμένου με HRP 2^{ου} αντισώματος χρησιμοποιώντας τις ίδιες συγκεντρώσεις συζεύγματος BSA-gly_2, ειδικού έναντι του glyphosate αντισώματος αλλά και ίδιου χρόνου ανοσοαντίδρασης. Βρέθηκε ότι με την χρήση βιοτινυλιωμένου 2^{ου} αντισώματος το αναλυτικό σήμα αυξήθηκε περίπου ~45% ενώ όπως διαπιστώνεται από το Σχήμα 14, οι καμπύλες βαθμονόμησης διέφεραν ελάχιστα.



Σχήμα 15: Τιμές οπτικής απορρόφησης για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης και διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 2 ng/mL συναρτήσει της συγκέντρωσης του ειδικού έναντι του glyphosate αντισώματος για συγκέντρωση συζεύγματος BSA-gly_2 2 μg/mL, βιοτινυλιωμένου 2^{ου} αντισώματος 5 μg/mL και στρεπταβιδίνης-HRP 500 ng/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

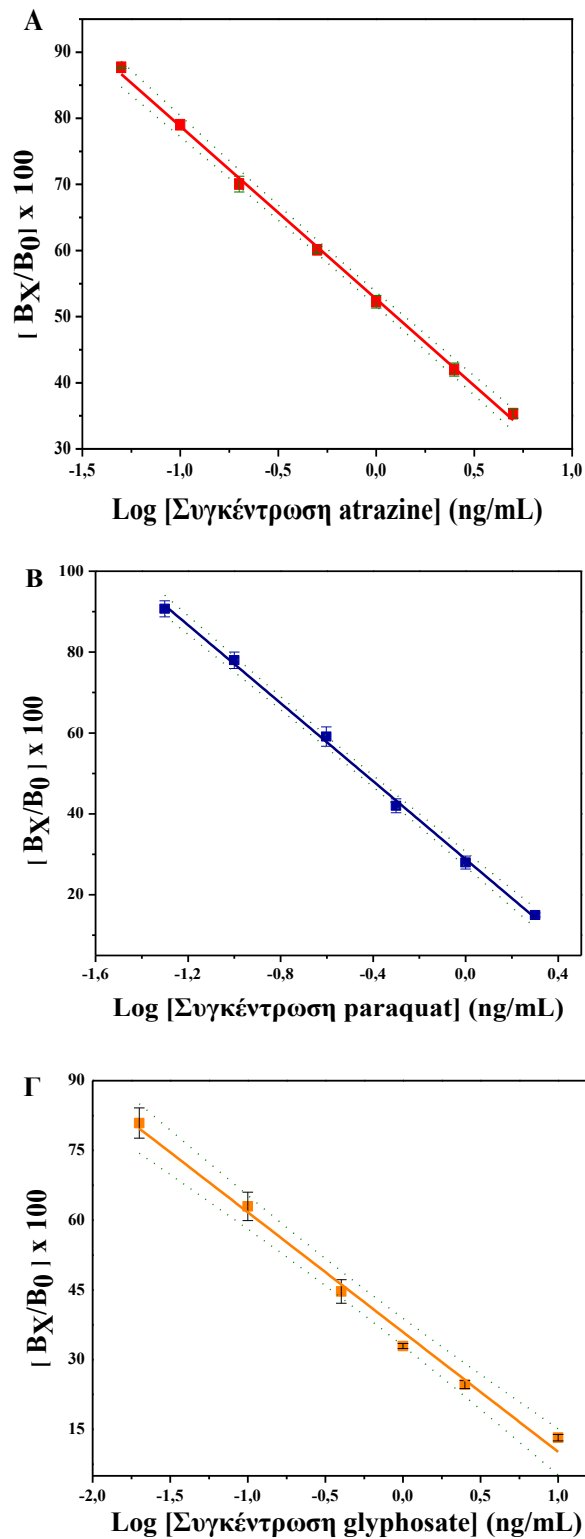
Βάσει του αποτελέσματος αυτού, διερευνήθηκε εάν χρησιμοποιώντας βιοτινυλιωμένο 2^ο αντίσωμα θα ήταν δυνατό να μειωθεί η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος και στην προσπάθεια επομένως βελτιστοποίησης της ευαισθησίας μέσω μείωσης του ειδικού αντισώματος με το σύστημα στρεπταβιδίνης-βιοτίνης δοκιμάστηκαν συγκριτικά άλλες δύο συγκεντρώσεις IgY (1 μg/mL και 0.5 μg/mL) διατηρώντας σταθερή την συγκέντρωση του ακινητοποιημένου συζεύγματος. Σύμφωνα με το Σχήμα 15, όπου παρουσιάζονται οι απορροφήσεις τόσο για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης όσο και για πρότυπο διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 2 ng/mL συναρτήσει της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος έναντι του glyphosate, μειώνοντας την συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος το αναλυτικό σήμα μειώνεται σημαντικά χωρίς να βελτιώνεται η ευαισθησία της ανίχνευσης. Ως εκ τούτου η διαμόρφωση ανοσοπροσδιορισμού που περιελάμβανε βιοτινυλιωμένο 2^ο αντίσωμα και στρεπταβιδίνη-HRP δεν υιοθετήθηκε.

5.1.6 Αναλυτικά χαρακτηριστικά και αξιολόγηση ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού των paraquat, atrazine & glyphosate

Αφού ολοκληρώθηκε η βελτιστοποίηση των ενζυμοανοδοχημικών προσδιορισμών και των τριών φυτοφαρμάκων σε φρεάτια μικροπιλοδότησης, όπως περιγράφηκε αναλυτικά στα υποκεφάλαια 5.1.1 έως 5.1.4 καταρτίστηκαν τα τελικά πρωτόκολλα ανάλυσης (υποκεφάλαιο 4.4.3, Πίνακας 3) και αξιολογήθηκαν οι ενζυμοανοδοχημικοί προσδιορισμοί ως προς τα αναλυτικά τους χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα στα επόμενα εδάφια (5.1.6.1 – 5.1.6.3) περιγράφεται λεπτομερώς η κατασκευή καμπύλων βαθμονόμησης γραμμικής παλινδρόμησης σε στάθμη εμπιστοσύνης 95%, η αξιολόγηση της ακρίβειας των προσδιορισμών μέσω πειραμάτων διασταυρούμενης δραστηριότητας και η μελέτη της επίδρασης της μήτρας του δείγματος στην ευαισθησία της ανίχνευσης.

5.1.6.1 Καμπύλες Βαθμονόμησης και αναλυτικά χαρακτηριστικά

Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν με το τελικό πρωτόκολλο του εκάστοτε ενζυμοανοδοχημικού προσδιορισμού για το atrazine, το paraquat και το glyphosate παρουσιάζονται στα Σχήματα 16Α, 16Β και 16Γ αντίστοιχα. Στον Πίνακα 7 παρουσιάζονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των ενζυμοανοδοχημικών προσδιορισμών των τριών φυτοφαρμάκων. Το όριο ανίχνευσης (Limit Of Detection, LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (Limit Of Quantification, LOQ) για κάθε φυτοφάρμακο προσδιορίστηκαν ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 100-3SD ή 100-6SD 16 επαναληπτικών μετρήσεων του εκάστοτε προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης. Για κάθε ενζυμοανοδοχημικό προσδιορισμό προσδιορίστηκε επιπλέον και η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστιαία πτώση του αναλυτικού σήματος ίση με 50% (Inhibition Concentration, IC) ως προς το σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης.



Σχήμα 16: Καμπύλες βαθμονόμησης για τον ενζυμοανοδοχημικό προσδιορισμό του (Α) atrazine, (Β) paraquat και (Γ) glyphosate σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης. Οι διάστικτες πράσινες γραμμές ανταποκρίνονται σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας των ενζυμοανασοχημικών προσδιορισμών, η οποία εκφράζεται ως ο συντελεστής διακύμανσης της μέσης τιμής των μετρήσεων (CV%), παρασκευάστηκαν για κάθε φυτοφάρμακο τρία δείγματα ελέγχου σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων σε νερό δικτύου. Η ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από τρεις επαναληπτικές μετρήσεις των δειγμάτων ελέγχου εντός του ίδιου προσδιορισμού, ενώ η διαναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από μέτρηση των δειγμάτων εις διπλούν σε 10 διαφορετικές μέρες σε διάστημα ενός μήνα.

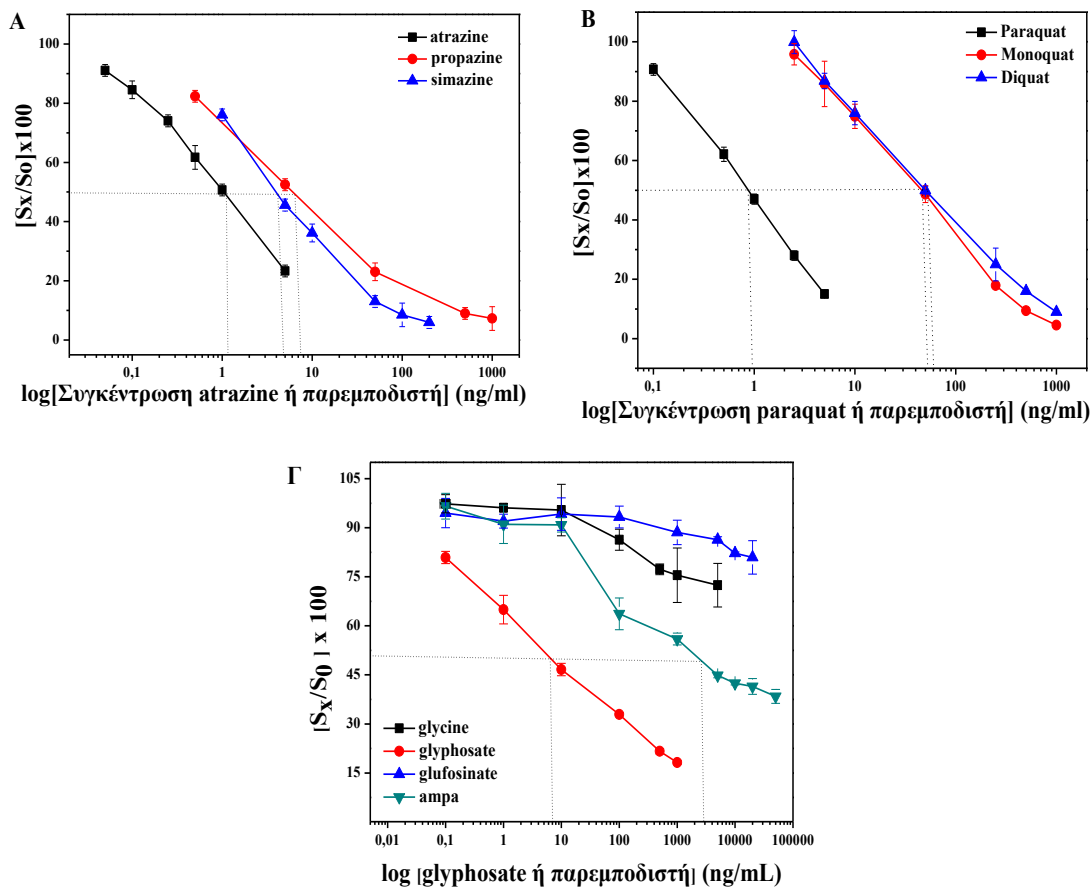
Πίνακας 7: Αναλυτικά χαρακτηριστικά των ενζυμοανασοχημικών προσδιορισμών σε φρεάτια μικροπιτλοδότησης των τριών φυτοφαρμάκων.

	atrazine	paraquat	glyphosate
Όριο Ανίχνευσης LOD (ng/mL)	0.02	0.05	0.007
Όριο Ποσοτικοποίησης LOQ (ng/mL)	0.04	0.10	0.015
Ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα	1.0 – 2.3	0.95 – 1.5	2.2 – 4.5
Δια-αναλυτική επαναληψιμότητα	3.2 – 4.8	2.3 – 3.2	5.4 – 7.2
Γραμμική Δυναμική Περιοχή (ng/mL)	0.04 – 5.0	0.10 – 2.0	0.015 – 10.0
IC₅₀ (ng/mL)	1.24	0.4	0.3

5.1.6.2 Ειδικότητα ενζυμοανασοχημικών προσδιορισμών

Τα αντισώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί στην παρούσα διατριβή παρότι έχουν αναπτυχθεί έναντι των τριών φυτοφαρμάκων στόχων, δύναται να αναγνωρίζουν ουσίες δομικά όμοιες με τον εκάστοτε προσδιοριζόμενο αναλύτη οι

οποίες μπορεί να περιέχονται στα προς ανάλυση δείγματα. Για να ελεγχθεί επομένως η ειδικότητα των ενζυμοανασοχημικών προσδιορισμών που αναπτύχθηκαν με τα συγκεκριμένα αντισώματα διεξήχθησαν πειράματα διασταυρούμενης δραστηριότητας, όπου ουσίες δομικά όμοιες με τα προσδιοριζόμενα ζιζανιοκτόνα εξετάστηκαν ως προς την αναγνώρισή τους από τα αντισώματα.



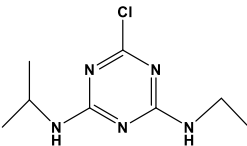
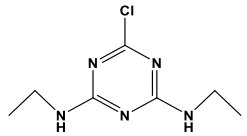
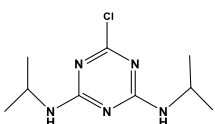
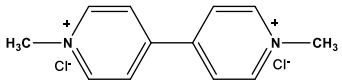
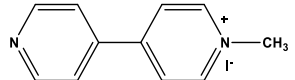
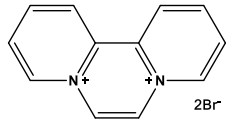
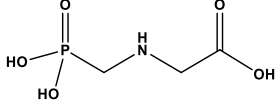
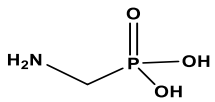
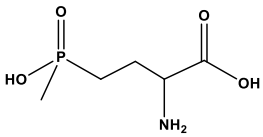
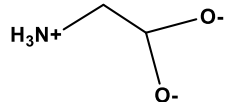
Σχήμα 17: Καμπύλες βαθμονόμησης των (A) atrazine, (B) paraquat και (Γ) glyphosate καθώς και των ουσιών που εξετάστηκαν ως προς τη διασταυρούμενη δραστηριότητα. Οι διακεκομμένες γραμμές αντιπροσωπεύουν την συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε ποσοστό εκτόπισης 50% (IC₅₀) στην καμπύλη βαθμονόμησης του εκάστοτε αναλύτη. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Η διασταυρούμενη δραστηριότητα μιας ουσίας εκφράζεται ως ο λόγος της συγκέντρωσης του προσδιοριζόμενου αναλύτη προς τη συγκέντρωση της υπό

εξέταση ουσίας για τις οποίες προκαλείται εκτόπιση σήματος κατά 50%. Όσο μικρότερος αυτός ο λόγος τόσο πιο ειδικό το αντίσωμα για τον αναλύτη που ανιχνεύει.

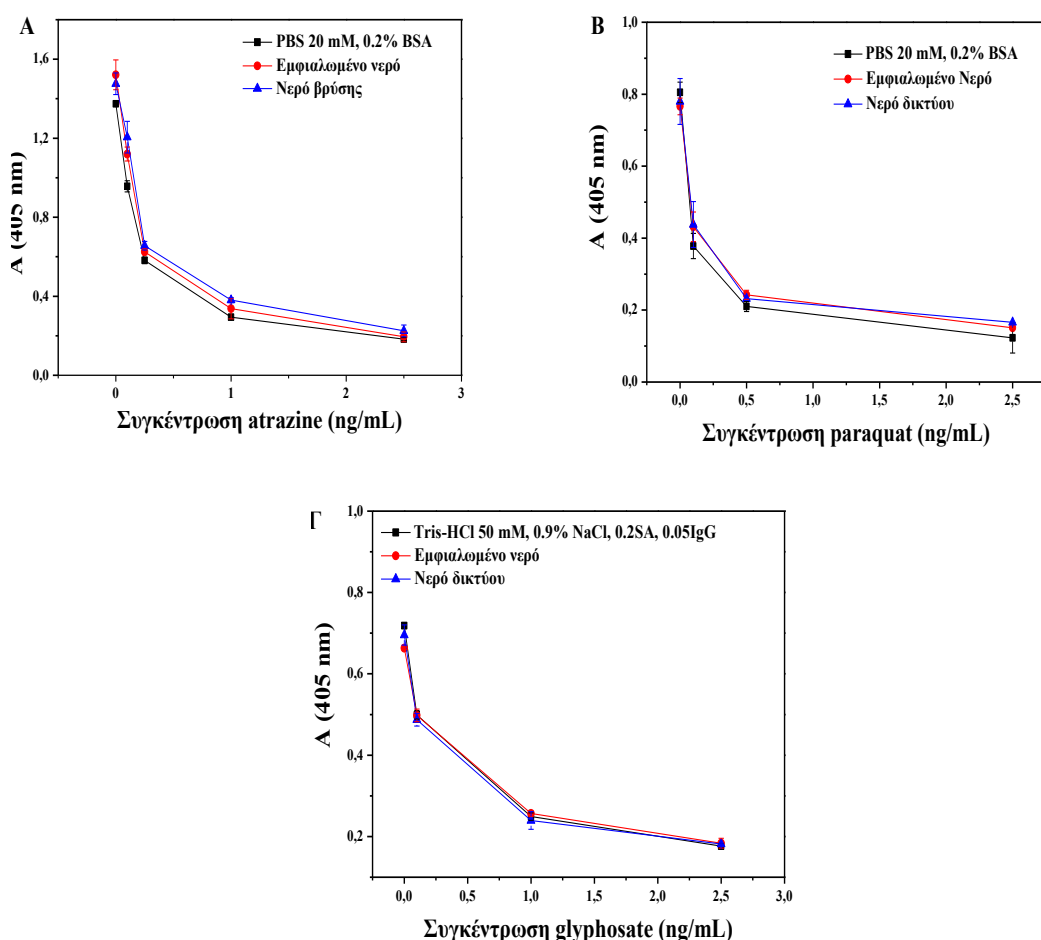
Για τον ενζυμοανασοχημικό προσδιορισμό του paraquat ελέγχθηκαν οι ουσίες monoquat και diquat, για τον προσδιορισμό του atrazine ελέγχθηκαν οι ουσίες propazine και simazine και τέλος για τον προσδιορισμό του glyphosate οι ουσίες αμινομέθυλο φωσφονικό οξύ (AMPA), glufosinate και γλυκίνη. Οι καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη και τις αντίστοιχες ουσίες που ελέγχονται για διασταυρούμενη δραστικότητα παρατίθενται στο Σχήμα 17 ενώ στον Πίνακα 8 παρατίθενται τα επί τοις εκατό ποσοστά διασταυρούμενης δραστικότητας (%CR) για τις ουσίες, οι συγκεντρώσεις που αντιστοιχούν σε ποσοστό εκτόπισης 50% (IC₅₀) και οι συντακτικοί τύποι όλων των ουσιών. Για το glyphosate, υπολογίστηκαν και οι επί τοις εκατό τιμές διασταυρούμενης δραστικότητας για ποσοστό εκτόπισης 80% καθώς οι καμπύλες των glufosinate και glycine δεν έφταναν το ποσοστό 50%. Οι τιμές αυτές παρέχονται εντός παρενθέσεων στον Πίνακα 8. Από τον πίνακα προκύπτει ότι το αντίσωμα κατά του atrazine παρουσιάζει μικρά ποσοστά διασταυρούμενης δραστικότητας με τις άλλες δύο τριαζίνες που ελέγχθηκαν, γεγονός το οποίο οφείλεται στη μεγάλη δομική ομοιότητα της συγκεκριμένης τάξης φυτοφαρμάκων, καθιστώντας το συγκεκριμένο αντίσωμα καταλληλότερο για σάρωση τριαζινών. Αντιθέτως τα αντισώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό των paraquat και glyphosate διαθέτουν μεγάλη εκλεκτικότητα ως προς τον αναλύτη που προσδιορίζουν.

Πίνακας 8: Συντελεστές διασταυρούμενης δραστηριότητας δομικά όμοιων ουσιών με τους προσδιοριζόμενους αναλύτες atrazine, paraquat και glyphosate.

Προσδιοριζόμενη ουσία ή Παρεμποδιστής	Συντακτικός Τύπος	IC ₅₀ (ng/mL)	%CR
atrazine		0.60	100
simazine		2.4	25.0
propazine		3.6	16.7
paraquat		0.36	100
monoquat			0
diquat		-	0
glyphosate		0.35 (0.023)	100
ampa		1500 (11.7)	0.02
glufosinate		(450)	<0.001
glycine		(20000)	<0.001

5.1.6.3 Μελέτη επίδρασης της μήτρας του δείγματος στον ενζυμοανοδοχημικό προσδιορισμό

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι ο προσδιορισμός των τριών ζιζανιοκτόνων σε πόσιμο νερό. Για το λόγο αυτό, στα πλαίσια της ανάπτυξης των ανοσοχημικών προσδιορισμών διερευνήθηκε η επίδραση του νερού δικτύου και μιας ενδεικτικής ετικέτας εμφιαλωμένου νερού πηγής στο απόλυτο αναλυτικό σήμα και τη μορφή των καμπυλών βαθμονόμησης. Πιο αναλυτικά, παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα για καθένα από τα τρία ζιζανιοκτόνα σε νερό δικτύου και σε εμφιαλωμένο νερό.



Σχήμα 18: Καμπύλες βαθμονόμησης που λαμβάνονται με πρότυπα διαλύματα τα οποία έχουν παρασκευαστεί σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης (■), εμφιαλωμένο νερό (●) και σε νερό δικτύου (▲). Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή 3 επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

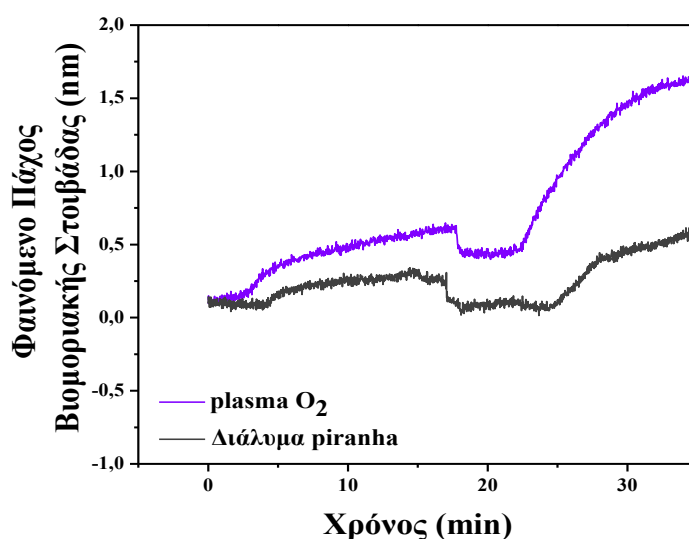
Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συγκρίθηκαν τόσο ως προς το απόλυτο αναλυτικό σήμα για το μηδενικό πρότυπο διάλυμα όσο και ως προς την ευαισθησία των καμπυλών βαθμονόμησης με εκείνα που ελήφθησαν για πρότυπα διαλύματα που είχαν παρασκευαστεί σε διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Στα Σχήματα 18Α, 18Β & 18Γ παρουσιάζονται οι καμπύλες βαθμονόμησης για κάθε μία ουσία. Σύμφωνα με το σχήμα, δεν παρατηρείται σημαντική επίδραση του νερού δικτύου ούτε του εμφιαλωμένου νερού τόσο στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Ως εκ τούτου, αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων το ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης

5.2 Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση μεθόδου προσδιορισμού του φυτοφαρμάκου glyphosate με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός

Για την ανάπτυξη του ανοσοχημικού προσδιορισμού για το ζιζανιοκτόνο glyphosate στον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός υιοθετήθηκαν κάποιες παράμετροι που είχαν βελτιστοποιηθεί στον αντίστοιχο προσδιορισμό σε φρεάτια μικροπιλοδότησης όπως το διάλυμα της ανοσοαντίδρασης, το διάλυμα έκπλυσης, το είδος και η περιεκτικότητα του ανυδρίτη καθώς και η αναλογία όγκων μεταξύ του ενεργοποιημένου πρότυπου διαλύματος και του διαλύματος ειδικού αντισώματος. Στα επόμενα υποκεφάλαια (5.2.1 – 5.2.6) παρουσιάζονται αναλυτικά οι παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν εκ νέου στον αισθητήρα και συγκεκριμένα το είδος και η βέλτιστη συγκέντρωση πρωτεϊνικού συζεύγματος, η βέλτιστη συγκέντρωση ειδικού αντισώματος, η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης και ο τρόπος ενίσχυσης του σήματος. Επιπλέον μελετήθηκαν και παράμετροι που αφορούν τη μέθοδο υδροφιλοποίησης των επιφανειών, την ταχύτητα ροής των αντιδραστηρίων εντός της μικροροϊκής κυψελίδας, την ικανότητα αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας και την σταθερότητα τους κατά τη φύλαξη. Στο υποκεφάλαιο 5.5 παρατίθενται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της αναπτυχθείσας μεθόδου καθώς και η αξιολόγηση της ακρίβειας της μεθόδου.

5.2.1 Επιλογή μεθόδου υδροφιλοποίησης των αισθητηρίων επιφανειών

Οι αισθητήριες επιφάνειες Si/SiO₂ υπόκεινται σε μια διαδικασία υδροφιλοποίησης με στόχο αφενός μεν τον καθαρισμό τους από ρύπους, αφετέρου δε τον εμπλουτισμό των επιφανειών με ελεύθερες ομάδες σιλανολών ούτως ώστε να διευκολυνθεί η χημική τροποποίησή τους με οργανοσιλάνια. Για την υδροφιλοποίηση των επιφανειών δοκιμάστηκαν δύο μέθοδοι: 1) καθαρισμός με διάλυμα H₂SO₄/H₂O₂ (διάλυμα Piranha) και 2) κατεργασία σε πλάσμα O₂, όπως περιγράφονται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 4.5, ενώ και στις δύο περιπτώσεις η χημική τροποποίηση των υδροφιλοποιημένων επιφανειών πραγματοποιήθηκε μέσω σιλανοποίησης με το αντιδραστήριο (3-αμινοπροπυλο)τριαθοξυ-σιλάνιο (APTES). Στη συνέχεια στις τροποποιημένες επιφάνειες ακινητοποιήθηκε ποσότητα πρωτεϊνικού συζεύγματος του glyphosate και πραγματοποιήθηκε ανοσοχημικός προσδιορισμός σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στο εδάφιο 4.8.2.



Σχήμα 19: Αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης από επιφάνειες οι οποίες είχαν υδροφιλοποιηθεί με κατεργασία σε 1) διάλυμα Piranha (γκρι γραμμή) ή 2) πλάσμα O₂ (μωβ γραμμή). Οι επιφάνειες είχαν επικαλυφθεί με 50 μg/mL συζεύγματος BSA-gly και για τον ανοσοπροσδιορισμό διαβιβάστηκε διάλυμα ειδικού αντισώματος συγκέντρωσης 50 μg/mL για 15 min και 2^{ου} αντισώματος συγκέντρωσης 1 μg/mL για 10 min.

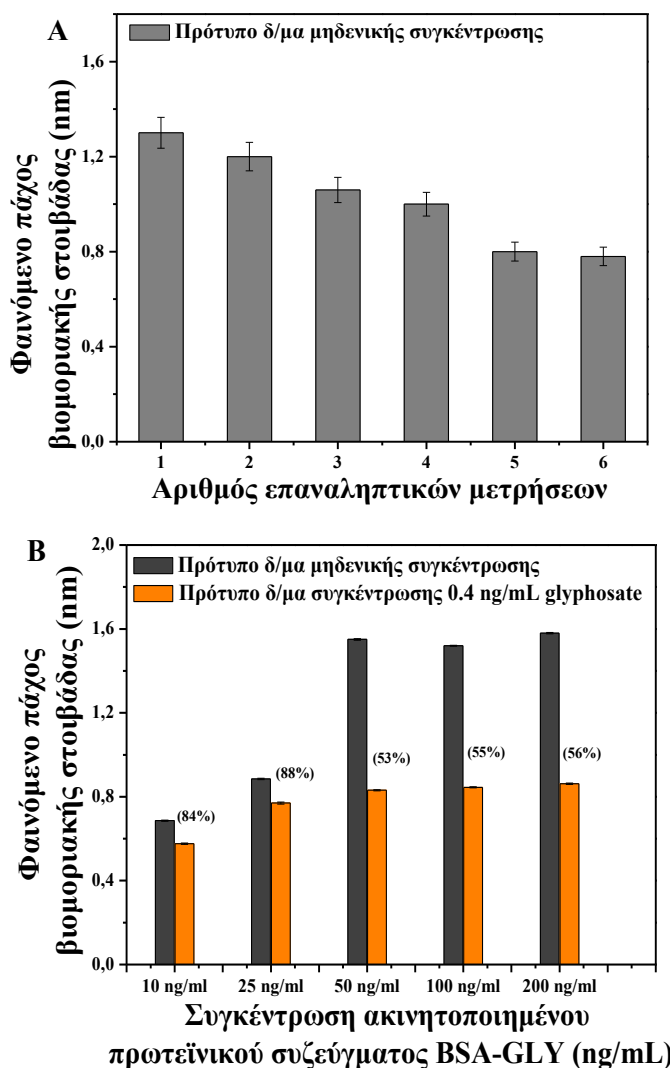
Στο Σχήμα 19 παρουσιάζονται οι αποκρίσεις του αισθητήρα για πρότυπο διάλυμα glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης από επιφάνειες που είχαν υδροφιλοποιηθεί με τα δύο υπό εξέταση πρωτόκολλα. Από το Σχήμα 19 διαπιστώνεται ότι οι δύο μέθοδοι διέφεραν σημαντικά ως προς τις τιμές αναλυτικού σήματος για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα η επιφάνεια που είχε κατεργαστεί με διάλυμα Piranha παρείχε αναλυτικό σήμα περίπου τρεις φορές χαμηλότερο σε σχέση με την επιφάνεια που είχε υποστεί κατεργασία σε πλάσμα O₂. Η διαφορά αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η μέθοδος υδροφιλοποίησης με κατεργασία σε πλάσμα O₂ είναι πιο ήπια και πιο επαναλήψιμη οδηγώντας σε καλύτερη σιλιανοποίηση των επιφανειών και ως εκ τούτου αποτελεσματικότερη ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών συζευγμάτων.

5.2.2 Επιλογή και βελτιστοποίηση συγκέντρωσης πρωτεϊνικού συζεύγματος ακινητοποίησης

Από τα διαφορετικά πρωτεϊνικά συμπλέγματα του glyphosate που παρασκευάστηκαν ελέγχθηκαν στα πλαίσια της ανάπτυξης του ενζυμοανασοχημικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης, εκείνα που παρείχαν τα υψηλότερα τα σήματα, δηλαδή τα Ova-gly_2 και BSA_gly_2, αποφασίστηκε να δοκιμαστούν και στον αισθητήρα ανάκλαση λευκού φωτός. Πιο συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις 10, 25, 50, 100 και 200 μg/mL για την επικάλυψη των τροποποιημένων με APTES επιφανειών. Η επιλογή έγινε με κριτήριο την επίτευξη μέγιστου σήματος για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης, την ευαισθησία της ανίχνευσης και την αντοχή του ακινητοποιημένου συζεύγματος στην διαδικασία αναγέννησης της επιφάνειας.

Για το πρωτεϊνικό σύζευγμα με ωαλβουμίνη, Ova-gly_2 παρατηρήθηκε ότι ικανοποιητικό σήμα για το πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης λαμβανόταν για συγκέντρωση ίση με ή μεγαλύτερη από 200 μg/mL. Η συγκέντρωση αυτή φάνηκε να δυσχεραίνει τον ανταγωνισμό του διαλυμένου αναλύτη στο δείγμα για τις ειδικές θέσεις δέσμευσης του αντισώματος μειώνοντας την ευαισθησία της ανίχνευσης. Επίσης όπως φαίνεται και στο Σχήμα 20Α παρατηρήθηκε πτώση του

σήματος του μηδενικού προτύπου κατά 35% μόλις μετά από έξι διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης με την ίδια αισθητήρια επιφάνεια. Ως εκ τούτου το πρωτεϊνικό σύζευγμα με वालबुमिνη απορρίφθηκε και οι δοκιμές συνεχίστηκαν με το πρωτεϊνικό σύζευγμα με αλβουμίνη ορού βοός.



Σχήμα 20: (A) Σήματα για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης που ελήφθησαν από επιφάνεια τροποποιημένη με 200 µg/mL Ova-gly_2 μετά από έξι διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης εντός της ίδιας ημέρας. (B) Σήματα για πρότυπο διάλυμα διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) και διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 2 ng/mL (πορτοκαλί στήλες) που ελήφθησαν για συγκεντρώσεις πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA_gly_2 10, 25, 50 & 100 µg/mL . Ο χρόνος ανοσοαντίδρασης ήταν 15 min και η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος 50 µg/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Για σταθερή συγκέντρωση ειδικού αντισώματος μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του συζεύγματος BSA_gly_2 τόσο στο αναλυτικό σήμα όσο και στην ευαισθησία της ανίχνευσης. Όπως προκύπτει από το Σχήμα 20B, επαρκές αναλυτικό σήμα (≥ 1) και ποσοστιαία πτώση του σήματος παρουσία του αναλύτη επιτεύχθηκε για συγκέντρωση συζεύγματος ίση με ή μεγαλύτερη από 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του συζεύγματος δεν βελτιώνει ούτε το αναλυτικό σήμα ούτε και την ευαισθησία της αντίδρασης παρέμειναν σταθερά. Επομένως επιλέχθηκε η συγκέντρωση 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ συζεύγματος BSA_gly_2 στο διάλυμα ακινητοποίησης για τα υπόλοιπα πειράματα αλλά και στο τελικό πρωτόκολλο του ανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.

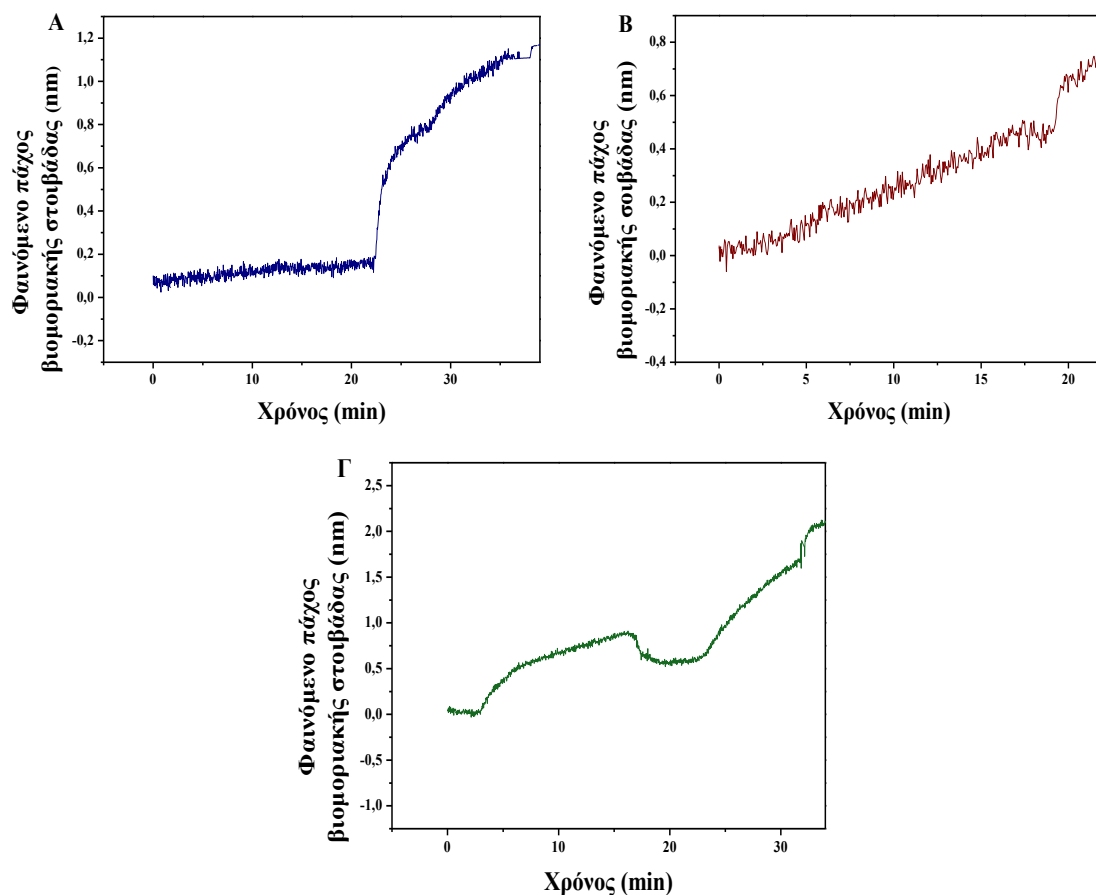
5.2.3 Επιλογή και βελτιστοποίηση τρόπου ενίσχυσης σήματος

Το στάδιο ενίσχυσης του σήματος στον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός είναι ιδιαίτερα κρίσιμο καθώς η ενίσχυση του σήματος μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της ποσότητας του ειδικού αντισώματος στο στάδιο της ανοσοαντίδρασης γεγονός με θετική επίδραση στην ευαισθησία του προσδιορισμού. Έτσι, στα πλαίσια της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης του ανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate εξετάστηκαν οι ακόλουθοι τρόποι ενίσχυσης σήματος μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης:

- 1) Διαβίβαση αντισώματος κουνελίου κατά των γ -σφαιρινών όρνιθας (2° αντίσωμα)
- 2) Χρήση βιοτινυλιωμένου αντισώματος όρνιθας έναντι του glyphosate (biot-IgY) και εν συνεχεία διαβίβαση διαλύματος στρεπταβιδίνης
- 3) Διαβίβαση βιοτινυλιωμένου $2^{\text{ου}}$ αντισώματος αιγός κατά των γ -σφαιρινών κουνελίου και εν συνεχεία διαβίβαση διαλύματος στρεπταβιδίνης

Στο Σχήμα 21 παρουσιάζονται οι αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός για πρότυπο διάλυμα glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης όπου η ενίσχυση

σήματος μετά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης πραγματοποιήθηκε με καθέναν από τους τρεις τρόπους που περιγράφηκαν πιο πάνω.



Σχήμα 21 : Αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης με επιφάνεια στην οποία είχαν ακινητοποιηθεί 50 $\mu\text{g/mL}$ πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA-gly₂ και η ενίσχυση σήματος πραγματοποιήθηκε με χρήση (Α) 2^{ου} αντισώματος κουνελιού κατά των γ -σφαιρινών όρνιθας, (Β) βιοτινυλιωμένου ειδικού έναντι του glyrhosate αντισώματος και στρεπταβιδίνης, (Γ) βιοτινυλιωμένου 2^{ου} αντισώματος κουνελιού κατά των γ -σφαιρινών όρνιθας και στρεπταβιδίνης. Και στις τρεις περιπτώσεις η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος ήταν 25 $\mu\text{g/mL}$.

Αρχικά δοκιμάστηκε η ενίσχυση του σήματος με διαβίβαση 2^{ου} αντισώματος δηλαδή αντισώματος κουνελιού κατά των γ -σφαιρινών όρνιθας. Όπως φαίνεται και από το Σχήμα 21Α η απόκριση ήταν ιδιαίτερα ικανοποιητική καθώς ξεπέρασε σημαντικά το 1 nm. Ως δεύτερος τρόπος ενίσχυσης σήματος δοκιμάστηκε η χρήση βιοτινυλιωμένου ειδικού αντισώματος σε συνδυασμό με στρεπταβιδίνη, όμως το απόλυτο σήμα που ελήφθη για πρότυπο διάλυμα

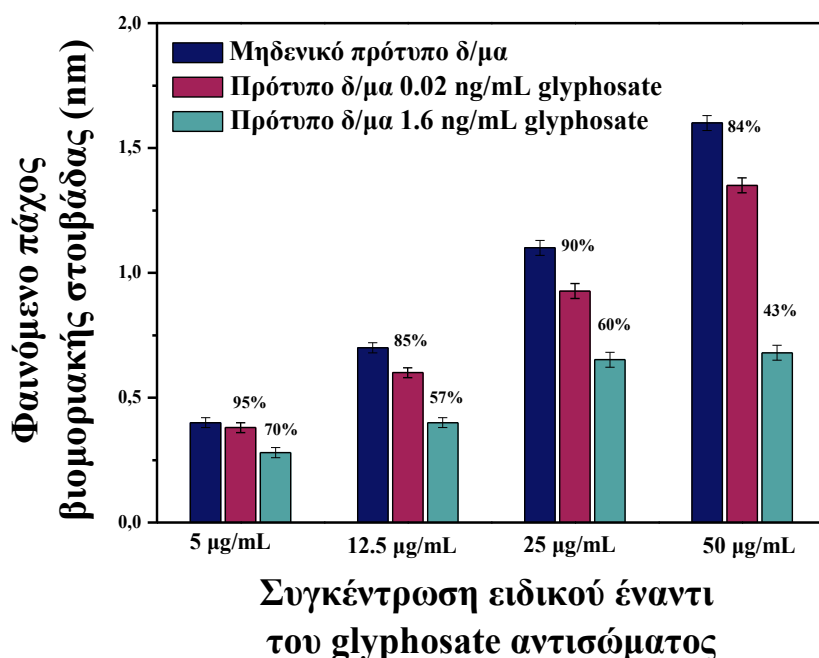
μηδενικής συγκέντρωσης ήταν αρκετά χαμηλό (~0.7 nm) σε σχέση με το σήμα που ελήφθη με το 2^ο αντίσωμα (Σχήμα 21B). Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι το πάχος της βιομοριακής στοιβάδας αυξάνεται λιγότερο κατά την πρόσδεση των μορίων της στρεπταβιδίνης τα οποία έχουν 2 φορές μικρότερο μέγεθος σε σχέση με τα μόρια του αντισώματος αντισταθμίζοντας το γεγονός ότι λόγω μικρότερης στερεοχημικής παρεμπόδισης είναι δυνατόν να συνδεθούν περισσότερα μόρια στρεπταβιδίνης ανά μόριο ειδικού αντισώματος σε σχέση με τα πιο ογκώδη μόρια δευτέρου αντισώματος. Όσον αφορά τον 3^ο τρόπο ενίσχυσης σήματος ο οποίος περιλαμβάνει τρία επιπλέον στάδια, συγκεκριμένα μετά την ανοσοαντίδραση διαβιβάζεται βιοτινυλιωμένο αντίσωμα κουνελιού κατά των γ-σφαιρινών όρνιθας και τέλος διάλυμα στρεπταβιδίνης, η απόκριση που ελήφθη για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης ήταν περίπου 2 φορές μεγαλύτερη συγκριτικά με τον 1^ο τρόπο ενίσχυσης σήματος και 2.5 φορές σε σχέση με τον 2^ο όπου είχε χρησιμοποιηθεί η ίδια συγκέντρωση αντισώματος.

Παρά αύξηση του σήματος με τον 3^ο τρόπο ενίσχυσης, η συνολική διάρκεια του προσδιορισμού αυξάνεται κατά 10 min και επίσης λόγω των επιπλέον σταδίων αυξάνεται η πολυπλοκότητα του προσδιορισμού. Ως εκ τούτου επιλέχθηκε και βελτιστοποιήθηκε περαιτέρω ο 1^{ος} τρόπος ενίσχυσης σήματος ο οποίος συνδυάζει κατάλληλο σήμα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης, ικανοποιητική ευαισθησία ανίχνευσης και απλότητα στο χειρισμό.

5.2.4 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ειδικού αντισώματος έναντι του glyphosate

Μια πολύ σημαντική παράμετρος που βελτιστοποιήθηκε είναι η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος έναντι του glyphosate. Η βελτιστοποίηση έγινε με κριτήρια το σήμα του μηδενικού πρότυπου διαλύματος και την ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Συνήθως η αύξηση της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος σε έναν ανοσοπροσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου οδηγεί σε αύξηση του σήματος του μηδενικού προτύπου χωρίς ωστόσο αυτό πάντα να αυξάνει επίσης και την ευαισθησία της ανίχνευσης. Στο Σχήμα 22

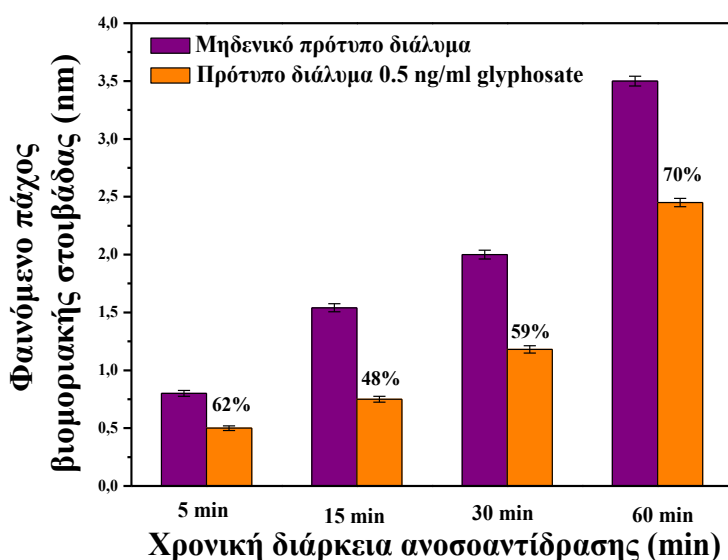
παρουσιάζονται τα σήματα μηδενικού προτύπου διαλύματος και δύο προτύπων διαλυμάτων glyphosate συγκέντρωσης 0.02 ng/mL και 1.6 ng/mL για τέσσερις συγκεντρώσεις ειδικού αντισώματος 5, 12.5, 25 & 50 µg/mL. Από το σχήμα παρατηρούμε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος αυξάνεται το σήμα του μηδενικού πρότυπου διαλύματος και βελτιώνεται η ευαισθησία του προσδιορισμού όπως αποδεικνύεται από τα επί τοις εκατό ποσοστά εκτόπισης σήματος που αναγράφονται για κάθε πρότυπο πάνω από τις αντίστοιχες στήλες σε σχέση με το μηδενικό πρότυπο. Βάσει αυτών των αποτελεσμάτων επιλέχθηκε η συγκέντρωση των 50 µg/mL ειδικού αντισώματος για το τελικό πρωτόκολλο.



Σχήμα 22: Σήματα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (μπλε στήλες) και προτύπων διαλυμάτων glyphosate συγκέντρωσης 0.02 ng/mL (ροζ στήλες) & 1.6 ng/mL (πράσινες στήλες) για συγκεντρώσεις ειδικού αντισώματος, 5, 12.5, 25 και 50 µg/mL. Σε όλες τις περιπτώσεις ο χρόνος ανοσοαντίδρασης ήταν 15 min, η συγκέντρωση του συζεύγματος BSA-gly 50 µg/mL και το 2^ο αντίσωμα διαβιβάστηκε για 10 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

5.2.5 Μελέτη χρονικής διάρκειας ανοσοχημικού προσδιορισμού

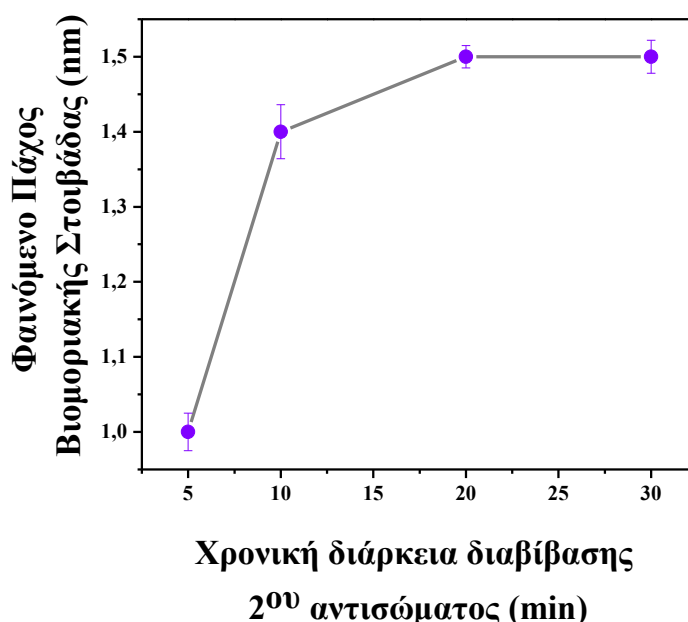
Κατά την ανάπτυξη του ανοσοχημικού προσδιορισμού βελτιστοποιήθηκε η χρονική διάρκεια των δύο σταδίων της ανοσοαντίδρασης, δηλαδή η διάρκεια διαβίβασης πάνω από την βιολογικά ενεργοποιημένη αισθητήρια επιφάνεια του μίγματος ειδικού αντισώματος και πρότυπου διαλύματος αναλύτη καθώς επίσης και η χρονική διάρκεια διαβίβασης 2^{ου} αντισώματος το οποίο αναγνωρίζει τα ανοσοσυμπλέγματα που έχουν σχηματιστεί κατά το πρώτο στάδιο. Ως κριτήριο τέθηκε η αύξηση του σήματος του μηδενικού προτύπου και παράλληλα η διατήρηση της ευαισθησία της ανίχνευσης.



Σχήμα 23: Αποκρίσεις που ελήφθησαν με το αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (μωβ στήλες) και διάλυμα glyphosate 5 ng/mL (πορτοκαλί στήλες) για χρόνους ανοσοαντίδρασης, 5, 15, 30, 60 λεπτά. Η συγκέντρωση του συζεύγματος BSA-gly ήταν 50 μg/mL, του ειδικού αντισώματος 50 μg/mL ενώ ο χρόνος διέλευσης του 2^{ου} αντισώματος ήταν 10 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Μελετήθηκαν τέσσερεις χρόνοι ανοσοαντίδρασης 5, 15, 30 και 60 λεπτά. Από το Σχήμα 23 είναι φανερό ότι καθώς αυξάνεται η διάρκεια της ανοσοαντίδρασης αυξάνεται το σήμα του μηδενικού προτύπου, λόγω της αύξησης της ποσότητας του ειδικού αντισώματος που διαβιβάζεται πάνω από το

ακίνητοποιημένο σύζευγμα. Ταυτόχρονα όμως αυξάνεται και το σήμα που αντιστοιχεί σε πρότυπο διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 5 ng/mL, μειώνοντας έτσι την ευαισθησία της ανίχνευσης όπως φαίνεται από τα αντίστοιχα ποσοστά εκτόπισης που αναγράφονται πάνω από τις πορτοκαλί στήλες. Σύμφωνα με το Σχήμα 23^η καθώς αυξάνεται η διάρκεια της ανοσοαντίδρασης αυξάνεται το σήμα του μηδενικού προτύπου, λόγω της αύξησης της ποσότητας του ειδικού αντισώματος που διαβιβάζεται πάνω από το ακίνητοποιημένο σύζευγμα. Ταυτόχρονα όμως αυξάνεται και το σήμα που αντιστοιχεί σε πρότυπο διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 5 ng/mL, μειώνοντας έτσι την ευαισθησία της ανίχνευσης.



Σχήμα 24: Σήματα που ελήφθησαν με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός για πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσεως του χρόνου διαβίβασης διαλύματος 2^{ου} αντισώματος συγκέντρωσης 1 μg/mL, υπό σταθερή ροή 30 μL/min. Η συγκέντρωση του συζεύγματος BSA-gly και του ειδικού έναντι του glyphosate αντισώματος ήταν 50 μg/mL και η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης 15 min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Ακολούθως βελτιστοποιήθηκε η συγκέντρωση και η χρονική διάρκεια διαβίβασης του αντισώματος κουνελιού ειδικού έναντι των γ-σφαιρινών όρνιθας,

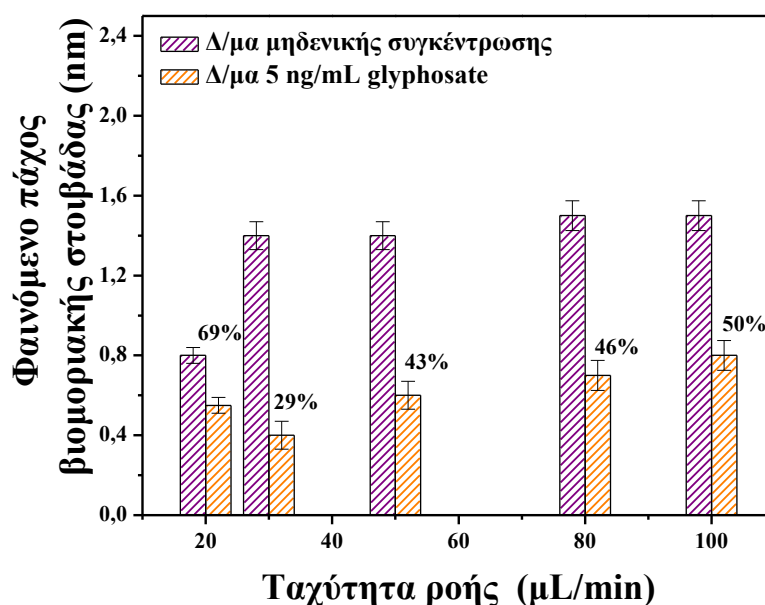
δηλαδή του 2ου αντισώματος. Εξετάστηκαν δύο συγκεντρώσεις αντισώματος το 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και τα 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ και βρέθηκε ότι η συγκέντρωση 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ήταν επαρκής ώστε να λαμβάνουμε σήμα από τον αισθητήρα $\sim 1\text{nm}$. Στη συνέχεια χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συγκεντρώσεις του πρωτεϊνικού συζεύγματος, ειδικού και 2^{ου} αντισώματος και για τον επιλεγμένο χρόνο ανοσοαντίδρασης βελτιστοποιήθηκε η χρονική διάρκεια διαβίβασης 2^{ου} αντισώματος. Από το Σχήμα 24 προκύπτει ότι για χρόνο διαβίβασης 10 min επιτυγχάνεται απόκριση >90% του μέγιστου σήματος οροφής και ως εκ τούτου επιλέχθηκαν τα 10 min για το τελικό πρωτόκολλο του ανοσοπροσδιορισμού.

5.2.6 Βελτιστοποίηση της ταχύτητας ροής

Η ταχύτητα ροής είναι επίσης ένας από τους παράγοντες που παίζουν σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό αναλυτών με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός καθώς επηρεάζει άμεσα την διάχυση των αντιδραστηρίων εντός της μικροροϊκής κυψελίδας και την προσέγγιση των αντισωμάτων στα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια ανοσοσυμπλέγματα. Χαμηλές ταχύτητες ροής μπορεί να επηρεάσουν αρνητικά την διάχυση των αντιδραστηρίων, ενώ σε υψηλές ταχύτητες ροής μπορεί να λάβει χώρα αποκόλληση των ακινητοποιημένων στην αισθητήρια επιφάνεια πρωτεϊνικών συζευγμάτων μειώνοντας τον χρόνο ζωής της αλλά και την σταθερότητα των λαμβανόμενων αποκρίσεων.

Κατά την ανάπτυξη του ανοσοπροσδιορισμού για το glyphosate βελτιστοποιήθηκε η ταχύτητα ροής τόσο κατά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης όσο και κατά το στάδιο διαβίβασης 2^{ου} αντισώματος. Για χρόνο ανοσοαντίδρασης 30 min και χρόνο διαβίβασης 2^{ου} αντισώματος 10 min, εξετάστηκαν ταχύτητες ροής από 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ έως 100 $\mu\text{L}/\text{min}$ αναφορικά με την επίδραση στο σήμα πρότυπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης καθώς και στην ευαισθησία της μέτρησης. Όσον αφορά στην ταχύτητα ροής του 2^{ου} αντισώματος διαπιστώθηκε ότι το σήμα που αντιστοιχούσε στο πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης λάμβανε μέγιστες τιμές οροφής για ταχύτητες ροής ίσες ή μεγαλύτερες από 50 $\mu\text{L}/\text{min}$. Για το τελικό πρωτόκολλο επιλέχθηκε ταχύτητα ροής 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ καθώς με

αυτή την τιμή επιτυγχάνεται πάνω από 80% του μέγιστου σήματος πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης.



Σχήμα 25: Επίδραση της ταχύτητας ροής διέλευσης των αντιδραστηρίων κατά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης στο σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (μωβ στήλες) καθώς και στο σήμα διαλύματος glyphosate συγκέντρωσης 5 ng/mL (πορτοκαλί στήλες). Τα σήματα αυτά προέρχονται από αισθητήρια επιφάνεια στην οποία είχαν ακινητοποιηθεί 25 μg/mL συζεύγματος BSA-gly, η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος ήταν 12.5 μg/mL, η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης 30 min και το διάλυμα του 2^{ου} αντισώματος διαβιβάστηκε για 10 min με ταχύτητα ροής 30 μL/min. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

Όσον αφορά την επίδραση της ταχύτητας ροής κατά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης, από το Σχήμα 25 προκύπτει ότι για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης μέγιστες τιμές οροφής λαμβάνονται για ταχύτητες ροής ίσες με ή μεγαλύτερες από 30 μL/min. Επιπλέον για ταχύτητα ροής 30 μL/min το σήμα που λαμβάνεται για πρότυπο διάλυμα glyphosate συγκέντρωσης 5 ng/mL έχει την ελάχιστη τιμή σε σχέση με τις άλλες ταχύτητες. Επομένως για ροή 30 μL/min η ευαισθησία ανίχνευσης είναι σαφώς βελτιωμένη, αφού το επί τοις εκατό ποσοστό πτώσης του σήματος για το διάλυμα συγκέντρωσης 5 ng/mL είναι

σημαντικά μικρότερο (29%) συγκριτικά με το αντίστοιχο ποσοστό για ταχύτητα ροής 20 $\mu\text{L}/\text{min}$ (69%) και 50 $\mu\text{L}/\text{min}$ (43%).

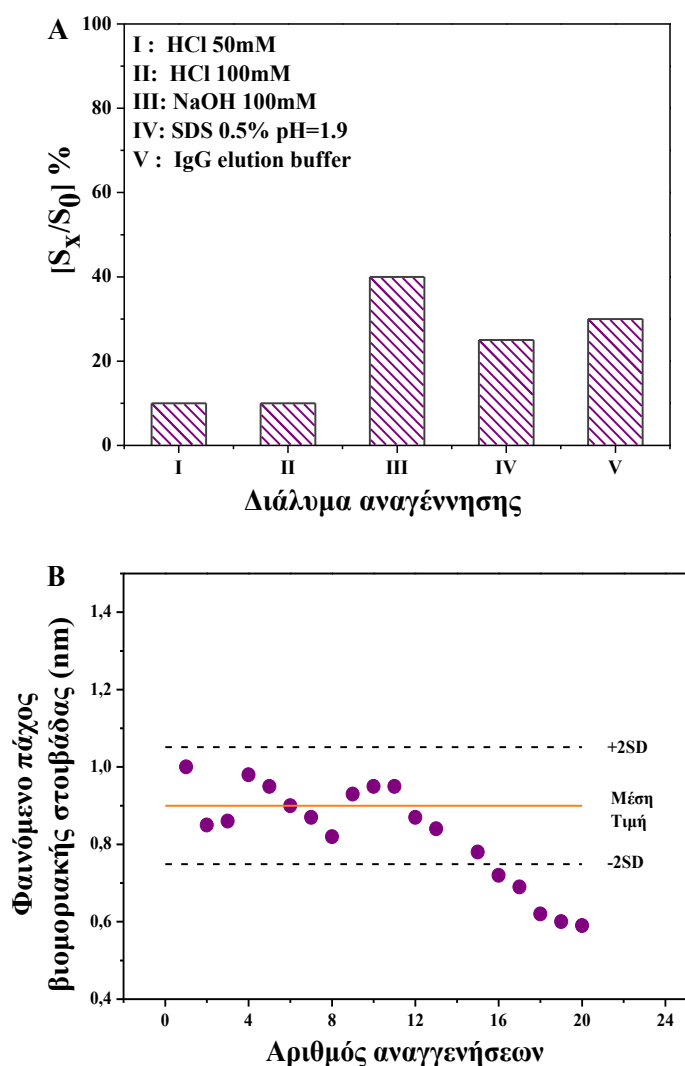
Επομένως λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα αυτά για το τελικό πρωτόκολλο υιοθετήθηκε ως ταχύτητα ροής διέλευσης αντιδραστηρίων, τόσο κατά το στάδιο ανοσοαντίδρασης όσο και κατά το στάδιο ενίσχυσης σήματος, τα 30 $\mu\text{L}/\text{min}$.

5.2.7 Μελέτη της ικανότητας αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας και σταθερότητας κατά την φύλαξη

Δύο ιδιαίτερα επιθυμητά χαρακτηριστικά της επικαλυμμένης με πρωτεϊνικό σύζευγμα αισθητήριας επιφάνειας είναι η ικανότητα της να αναγεννηθεί, ώστε να μπορούν να πραγματοποιηθούν πολλαπλές διαδοχικές μετρήσεις με την ίδια επιφάνεια μειώνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το κόστος της ανάλυσης ανά δείγμα, καθώς επίσης και η σταθερότητά της κατά την φύλαξη. Ως εκ τούτου, στα πλαίσια της ανάπτυξης του ανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα, μελετήθηκε η δυνατότητα αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας για την πραγματοποίηση διαδοχικών μετρήσεων και η σταθερότητά της στην πάροδο του χρόνου.

Η αναγέννηση της επιφάνειας συνίσταται στην αποτελεσματική απομάκρυνση των ανοσοσυμπλεγμάτων τα οποία έχουν δημιουργηθεί κατά το στάδιο της ανοσοαντίδρασης και ενίσχυσης σήματος, αφήνοντας ξανά διαθέσιμο το ακινητοποιημένο πρωτεϊνικό σύζευγμα του glyphosate για έναν νέο κύκλο προσδιορισμού. Ωστόσο, η διαδικασία αναγέννησης δεν θα πρέπει να απομακρύνει ή να καταστρέφει τα ακινητοποιημένα στην επιφάνεια βιομόρια. Τα ανοσοσυμπλέγματα συγκροτούνται στην επιφάνεια υπό την επίδραση μη ομοιοπολικών δυνάμεων οπότε η διαβίβαση ενός διαλύματος με όξινο ή βασικό pH ή ενός διαλύματος αποδιατακτικού παράγοντα για λίγα λεπτά είναι ικανή συνθήκη για να αναγεννήσει την αισθητήρια επιφάνεια. Κατά τη βελτιστοποίηση των συνθηκών αναγέννησης δοκιμάστηκαν αρχικά διαφορετικά διαλύματα αναγέννησης μετά από την διαβίβαση προτύπου διαλύματος glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης, έτσι ώστε να επιλεγεί εκείνο που αφήνει στην

επιφάνεια το μικρότερο επί τοις εκατό ποσοστό δεσμευμένων αντισωμάτων (υπόλειμμα). Τα διαλύματα που δοκιμάστηκαν ήταν διάλυμα HCl 50 mM, HCl 100 mM, NaOH 100 mM, 0,5% (w/v) SDS, pH 1,9 και εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας (IgG elution buffer).



Σχήμα 26: A) Επί τοις εκατό ποσοστιαίο υπόλειμμα δεσμευμένων αντισωμάτων ως προς το σήμα προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης μετά από διαβίβαση για 2 min διαλύματος HCl 50 mM (I), HCl 100 mM (II), NaOH 100 mM (III), 0,5% (w/v) SDS, pH 1,9 (IV) και εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας (V). B) Αποκρίσεις που ελήφθησαν από αισθητήρια επιφάνεια για πρότυπο διάλυμα διαλύματος glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης (●) σε διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης με διάλυμα HCl 50 mM. Η συνεχής πορτοκαλί γραμμή αντιστοιχεί στην μέση τιμή των 17 μετρήσεων και οι διακεκομμένες μαύρες γραμμές στην μέση τιμή $\pm 2SD$.

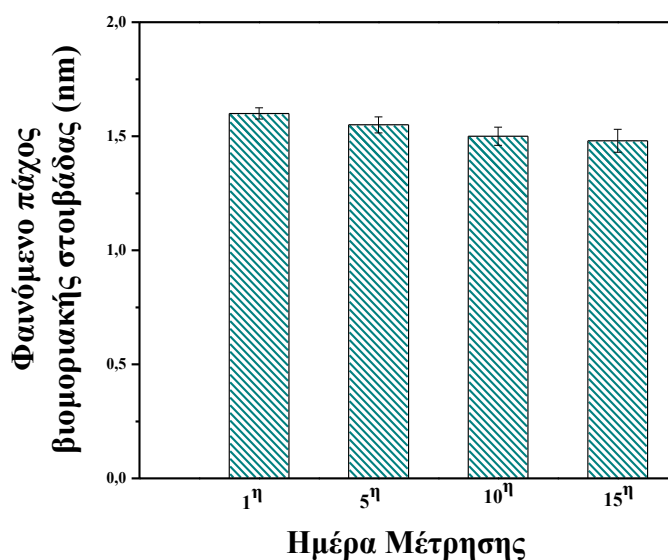
Για τον προσδιορισμό του επί τοις εκατό ποσοστιαίου υπολείμματος δεσμευμένων αντισωμάτων, διαβιβάστηκε ξεχωριστά καθένα από τα εξεταζόμενα διαλύματα αναγέννησης υπό ροή για 2 λεπτά μέσα από την μικρορροϊκή κυψελίδα και ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα ανοσοαντίδρασης και διαβίβαση εκ νέου διαλύματος δευτέρου αντισώματος.

Από το Σχήμα 26A προκύπτει ότι τα χαμηλότερα (10%) επί τοις εκατό ποσοστά δεσμευμένων αντισωμάτων σε σχέση με το σήμα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης επιτυγχανόταν με χρήση διαλύματος HCl 50 ή 100 mM. Εκ των δύο αυτών διαλυμάτων επιλέχτηκε το αραιότερο ως διάλυμα αναγέννησης και βελτιστοποιήθηκε η χρονική διάρκεια του σταδίου της αναγέννησης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν min ως χρόνοι διαβίβασης διαλύματος αναγέννησης μέσα από την μικρορροϊκή κυψελίδα τα 1, 2, 5 & 10. Διαπιστώθηκε ότι το επί τοις εκατό ποσοστιαίο υπόλειμμα δεσμευμένων αντισωμάτων παραμένει σταθερό για διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης για χρόνους διαβίβασης του διαλύματος αναγέννησης ίσους με ή μεγαλύτερους των 2 min, ενώ για χρόνο 1 min η αναγέννηση της αισθητήριας επιφάνειας δεν πραγματοποιείται αποτελεσματικά με αποτέλεσμα το επί τοις εκατό ποσοστιαίο υπόλειμμα δεσμευμένων αντισωμάτων να αυξάνεται συνεχώς για διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης. Επομένως τα 2 min επιλέχτηκαν ως ο βέλτιστος χρόνος διαβίβασης του διαλύματος αναγέννησης, HCl 50 mM, από την αισθητήρια επιφάνεια.

Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο μέγιστος αριθμός κύκλων ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης που μπορούν να πραγματοποιηθούν με μια αισθητήρια επιφάνεια. Στο Σχήμα 26B παρουσιάζονται αποκρίσεις που ελήφθησαν από την ίδια αισθητήρια επιφάνεια για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης και για 20 διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης. Όπως προκύπτει από το Σχήμα 26B, το αναλυτικό σήμα είναι σταθερό για τουλάχιστον 15 διαδοχικές μετρήσεις καθώς οι τιμές που λαμβάνονται είναι μεταξύ των ορίων μέση τιμή \pm 2SD. Έπεται λοιπόν ότι κάθε αισθητήρια επιφάνεια μπορεί να αναγεννηθεί τουλάχιστον 15 φορές εντός της ίδιας ημέρας μειώνοντας πολύ το κόστος της ανάλυσης.

Επιπλέον ελέγχθηκε η σταθερότητα στη φύλαξη των επικαλυμμένων με πρωτεϊνικό σύζευγμα του glyphosate επιφανειών. Για τον σκοπό αυτό σε επιφάνεια στην οποία είχαν ακινητοποιηθεί 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πρωτεϊνικού συζεύγματος glyphosate πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για διάστημα 15 ημερών ανά 5 ημέρες. Σε κάθε ημέρα μέτρησης πραγματοποιούνταν 3 προσδιορισμοί προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης και η βιολογικά ενεργοποιημένη επιφάνεια αποθηκευόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα στους 4 °C μέχρι την επόμενη μέτρηση.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 27 οι τροποποιημένες με πρωτεϊνικό σύζευγμα glyphosate αισθητήριες επιφάνειες ήταν σταθερές για διάστημα 15 ημερών.

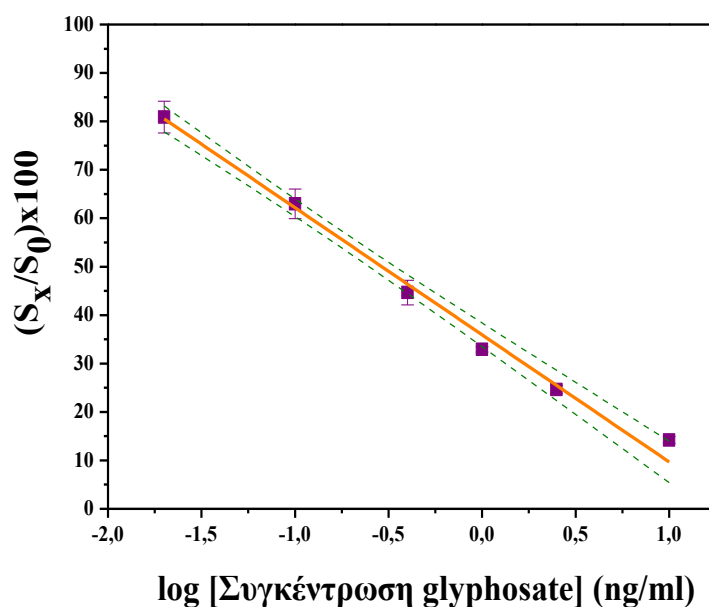


Σχήμα 27: Αποκρίσεις που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα glyphosate μηδενικής συγκέντρωσης από μια επιφάνεια τροποποιημένη με 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA-gly σε διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 15 ημερών. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

5.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά και αξιολόγηση μεθόδου προσδιορισμού του φυτοφαρμάκου glyphosate με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός

5.3.1 Καμπύλη βαθμονόμησης και αναλυτικά χαρακτηριστικά

Μετά την βελτιστοποίηση του ανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός και την κατάρτιση του τελικού πρωτοκόλλου ανοσοπροσδιορισμού ελήφθη η τελική καμπύλη βαθμονόμησης, η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 28, και προσδιορίστηκαν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανοσοπροσδιορισμού.



Σχήμα 28: Καμπύλη βαθμονόμησης (πορτοκαλί γραμμή) για τον προσδιορισμό του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. Οι διάστικτες πράσινες γραμμές αντιστοιχούν σε επίπεδο εμπιστοσύνης 90%. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Για την κατασκευή της καμπύλης βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα glyphosate με εύρος συγκεντρώσεων από 0.02 έως 10 ng/mL. Όπως προκύπτει από το Σχήμα 28, η καμπύλη βαθμονόμησης ευθυγραμμίζεται με μετασχηματισμό linear $y/\log x$ και η εξίσωση της ευθείας παλινδρόμησης που λαμβάνεται είναι η εξής :

$$y = -26.24(\pm 0.38)x + 35.93(\pm 0.42), R^2 = 0.993$$

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του ανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα συνοψίζονται στον Πίνακα 9. Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίστηκαν ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε επί τοις εκατό ποσοστό του σήματος σε σχέση με το σήμα του μηδενικού προτύπου ίση με 100-3SD και 100-6SD αντίστοιχα, 15 επαναληπτικών μετρήσεων προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης. Το κατώτερο όριο της δυναμικής περιοχής προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο όριο ποσοτικοποίησης ενώ το ανώτερο όριο ως η μεγαλύτερη συγκέντρωση για την οποία λαμβάνεται γραμμική απόκριση.

Πίνακας 9: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ανοσοχημικού προσδιορισμού του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.

Όριο Ανίχνευσης (LOD) (ng/mL)	Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ) (ng/mL)	IC₅₀ (ng/mL)
0.01	0.04	0.35
Ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα (%CV)	Δια-αναλυτική επαναληψιμότητα (%CV)	Γραμμική Δυναμική Περιοχή (ng/mL)
2.5 - 4.5	3.6 - 6.5	0.04 – 10

Για τον προσδιορισμό της ενδο-αναλυτικής επαναληψιμότητας του ανοσοχημικού προσδιορισμού παρασκευάστηκαν δείγματα ελέγχου για τρία επίπεδα διαφορετικών συγκεντρώσεων glyphosate σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης. Η ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα υπολογίστηκε από 4 επαναληπτικές μετρήσεις εντός της ίδιας ημέρας των τριών δειγμάτων, ενώ η δια-αναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από 4 μετρήσεις των τριών δειγμάτων

ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές μέρες μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων.

5.3.2 Αξιολόγηση ακρίβειας ανοσοπροσδιορισμού

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας του ανοσοπροσδιορισμού του glyphosate με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης κατά τα οποία σε δύο δείγματα εμφιαλωμένου νερού και σε ένα δείγμα νερού δικτύου προστέθηκαν συγκεντρώσεις glyphosate, έτσι ώστε να προκύψουν δείγματα που αντιστοιχούσαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων εντός της γραμμικής περιοχής της καμπύλης βαθμονόμησης τα οποία αναλύθηκαν με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Στα δείγματα νερού, προ του εμβολιασμού τους, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός του glyphosate τόσο με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός όσο και σε φρεάτια μικροτιτλοδότησης. Δεν προσδιορίστηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες glyphosate σε κανένα από τα τρία δείγματα και με τις δύο μεθόδους. Στον Πίνακα 10 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επί τοις εκατό ποσοστών ανάκτησης, η οποία υπολογίστηκε ως ο λόγος της προσδιορισθείσας προς την προστεθείσα συγκέντρωση, για επίπεδα εμβολιασμού 0.10, 0.40 ng/mL και 6.4 ng/mL. Από τον πίνακα προκύπτει ότι τα ποσοστά ανάκτησης του εξωγενώς προστεθέντος αναλύτη κυμαίνονται από 95% έως 120%, υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός είναι ακριβής.

Πίνακας 10: Επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης εμβολιασμένων με glyphosate δειγμάτων νερού δικτύου και εμφιαλωμένου νερού.

Δείγμα	Προσθεθείσα Ποσότητα (ng/mL)	Προσδιορισθείσα Ποσότητα (ng/mL)	Ανάκτηση %
Νερό Δικτύου	0,10	0,11	110
	0,40	0,42	105
	6,4	6,1	95
Εμφιαλωμένο Νερό 1 (Ziria)	0,10	0,12	120
	0,40	0,39	98
	6,4	6,3	98
Εμφιαλωμένο Νερό 2 (Vikos)	0,10	0,09	90
	0,40	0,41	105
	6,4	6,6	107

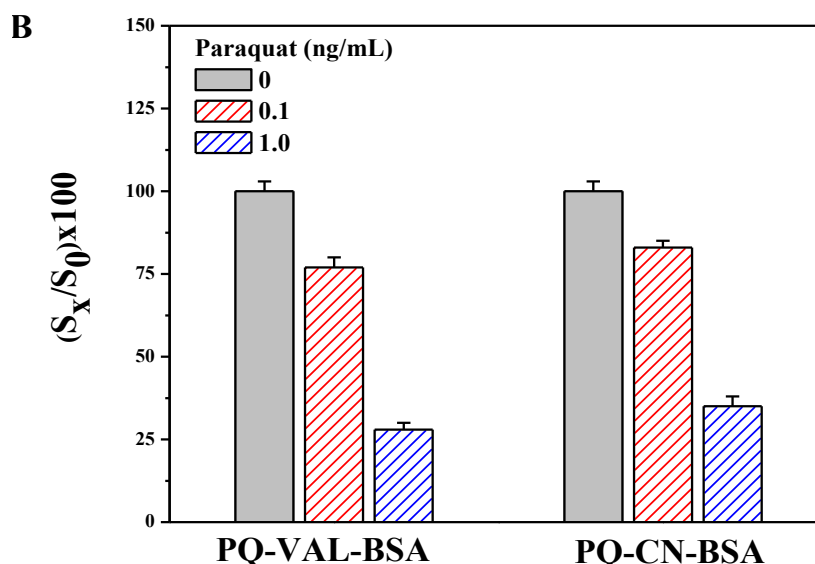
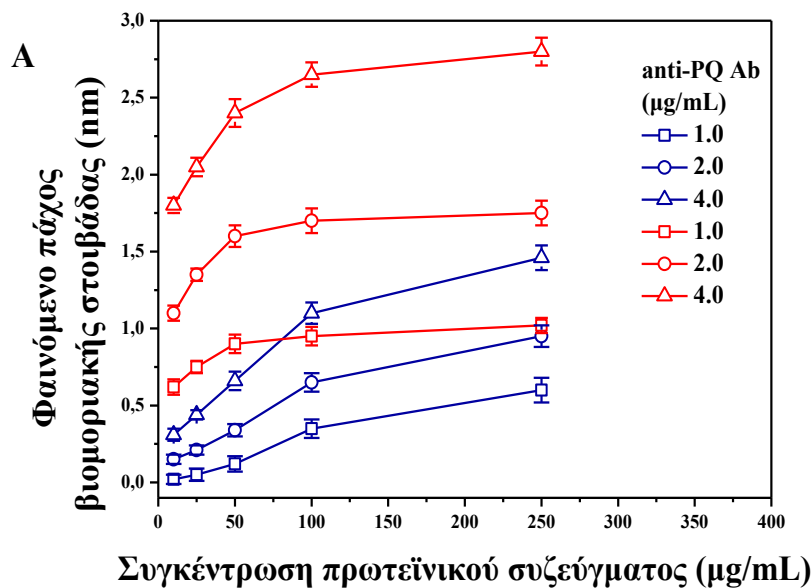
5.4 Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση ταυτόχρονου προσδιορισμού των φυτοπροστατευτικών προϊόντων paraquat, atrazine με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός

Για την ανάπτυξη του ταυτόχρονου ανοσοχημικού προσδιορισμού των ζιζανιοκτόνων paraquat και atrazine με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός αρχικά αναπτύχθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι ανοσοχημικοί προσδιορισμοί για κάθε ένα αναλύτη χωριστά. Στους προσδιορισμούς αυτούς υιοθετήθηκαν κάποιες από τις συνθήκες (Εικόνα 11) που είχαν επιλεγεί κατά την βελτιστοποίηση των αντίστοιχων ανοσοπροσδιορισμών σε φρεάτια μικροπιλοδότησης, όπως το διάλυμα της ανοσοαντίδρασης, το διάλυμα έκπλυσης και η αναλογία όγκων μεταξύ του πρότυπου διαλύματος και διαλύματος ειδικού αντισώματος. Στα επόμενα υποκεφάλαια (5.4.1 – 5.4.6) παρουσιάζονται αναλυτικά οι παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν εκ νέου στον αισθητήρα και για τους δύο αναλύτες και αφορούν την επιλογή του πρωτεϊνικού συζεύγματος για το paraquat, τη συγκέντρωση πρωτεϊνικού συζεύγματος για τους

δύο αναλύτες, τη συγκέντρωση ειδικού αντισώματος και τη χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης. Επιπλέον μελετήθηκαν παράμετροι όπως η ικανότητα αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας, η σταθερότητά της κατά τη φύλαξη αλλά και η ειδικότητα των προσδιορισμών.

5.4.1 Επιλογή και βελτιστοποίηση συγκέντρωσης πρωτεϊνικού συζεύγματος ακινητοποίησης

Για το φυτοφάρμακο paraquat παρασκευάστηκαν δύο πρωτεϊνικά συζεύγματα όπως περιγράφηκε αναλυτικά στα υποκεφάλαια 4.1 και 4.2, τα οποία προκύπτουν από δύο διαφορετικά παράγωγα του μορίου και κατά συνέπεια οπότε συνδέονται με διαφορετικό τρόπο στην φέρουσα πρωτεΐνη. Πιο συγκεκριμένα, το ένα σύζευγμα προκύπτει από παράγωγο του paraquat που φέρει πλευρική ομάδα βαλερικού οξέος (PQ-VAL-BSA) και το δεύτερο προκύπτει από παράγωγο που φέρει πλευρική ομάδα κυανουρικού χλωριδίου (PQ-CN-BSA). Ο διαφορετικός τρόπος σύνδεσης με την φέρουσα πρωτεΐνη οδηγεί σε διαφορετική σταθερά σύνδεσης του ειδικού αντισώματος με τον συνδεδεμένο πάνω στην πρωτεΐνη αναλύτη γεγονός που μπορεί να ευνοήσει ή να δυσχεράνει την σύνδεση του αντισώματος με τα μόρια του ελεύθερου αναλύτη στο δείγμα κατά το στάδιο της ανοσοανάλυσης. Παρόλο που και τα δύο πρωτεϊνικά συζεύγματα αξιολογήθηκαν κατά την ανάπτυξη του αντίστοιχου ανοσοχημικού προσδιορισμού σε φρεάτια μικροπιλοδότησης θεωρήθηκε αναγκαία η εκ νέου αξιολόγησή τους με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός λόγω των διαφορετικών συνθηκών στις οποίες λαμβάνει χώρα η ανοσοαντίδραση. Η σύγκριση μεταξύ των δύο πρωτεϊνικών συζευγμάτων έγινε με κριτήρια το σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης και την ευαισθησία της ανίχνευσης, δηλαδή το ποσοστό εκτόπισης παρουσία συγκεκριμένης ποσότητας αναλύτη. Για το σκοπό αυτό, όπως φαίνεται από το Σχήμα 29A, προσδιορίστηκαν οι αποκρίσεις για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης από επιφάνειες που είχαν επικαλυφθεί με πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνικού συζεύγματος (10, 25, 50, 100 & 250 $\mu\text{g/mL}$) PQ-VAL-BSA ή PQ-CN-BSA μετά από διαβίβαση για 10 min διαλύματος ειδικού



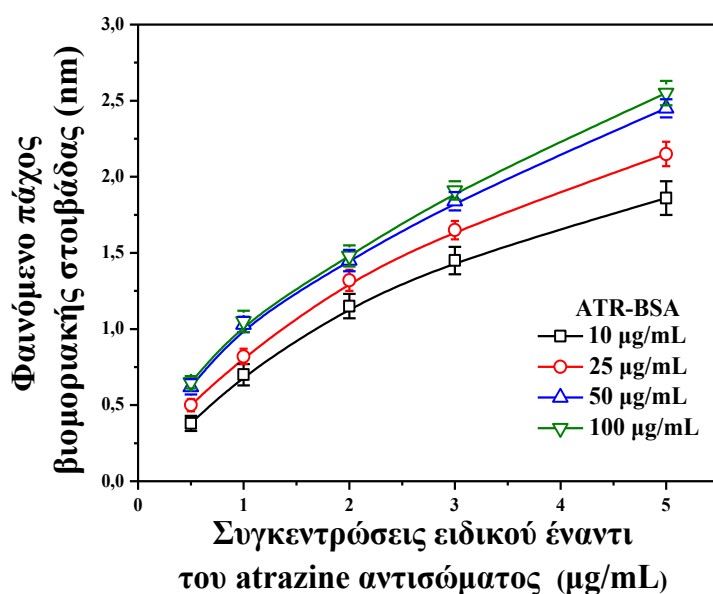
Σχήμα 29: (A) Αποκρίσεις που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του πρωτεϊνικού συζεύγματος PQ-VAL-BSA (κόκκινες γραμμές) και PQ-CN-BSA (μπλε γραμμές) μετά από διαβίβαση για 10 min διαλύματος anti-PQ Ab συγκέντρωσης 1 μg/mL (□), 2 μg/mL (○) και 4 μg/mL (△). (B) Επί τοις εκατό ποσοστά ως προς το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (γκρι στήλες) τα οποία αντιστοιχούν σε διαλύματα paraquat συγκέντρωσης 0.1 (στήλες με κόκκινη διαγράμμιση) και 1 ng/mL (στήλες με μπλε διαγράμμιση) που ελήφθησαν από αισθητήριες επιφάνειες επικαλυμμένες με 25 μg/mL PQ-VAL-BSA ή 250 μg/mL PQ-CN-BSA. Και στις δύο περιπτώσεις διαβιβάστηκε για 10 min διάλυμα ειδικού αντισώματος συγκέντρωσης 2 μg/mL και ακολουθούμενο από διαβίβαση για 5 min διαλύματος 2^{ου} αντισώματος 5 μg/mL. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών μετρήσεων ± SD.

αντισώματος έναντι του paraquat (anti-PQ Ab) συγκέντρωσης 1, 2 & 4 µg/mL ακολουθούμενη από διαβίβαση για 5 min διαλύματος 2^{ου} αντισώματος συγκέντρωσης 5 µg/mL. Παρατηρούμε ότι το πρωτεϊνικό σύζευγμα PQ-CN-BSA παρείχε για όλες τις συγκεντρώσεις ειδικού αντισώματος χαμηλότερο σήμα για το πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης σε σχέση με το σύζευγμα PQ-VAL-BSA γεγονός που μπορεί να οφείλεται ότι το δεύτερο σύζευγμα αντιστοιχεί σε μεγαλύτερη μοριακή αναλογία paraquat:πρωτεΐνη ή το συζευγμένο στην πρωτεΐνη paraquat είναι περισσότερο «διαθέσιμο» για αντίδραση με το αντίσωμα.

Συνεπώς για να επιτευχθεί παρόμοιο σήμα για το πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης απαιτούνται μεγαλύτερες συγκεντρώσεις συζεύγματος PQ-CN-BSA (περίπου 10 φορές) για την ίδια συγκέντρωση ειδικού αντισώματος. Χρησιμοποιώντας αυτές τις συγκεντρώσεις ελέγχθηκε η επίδραση του συζεύγματος στην ευαισθησία της ανοσοαντίδρασης. Τα ποσοστά εκτόπισης για πρότυπα διαλύματα paraquat συγκέντρωσης 0.1 ng/mL και 1 ng/mL, τα οποία προέκυψαν από αισθητήριες επιφάνειες με ακινητοποιημένα πρωτεϊνικά συζεύγματα PQ-VAL-BSA ή PQ-CN-BSA, παρουσιάζονται στο Σχήμα 29B. Από το σχήμα προκύπτει ότι μεγαλύτερα ποσοστά εκτόπισης επιτυγχάνονται όταν χρησιμοποιείται το σύζευγμα με το βαλερικό οξύ ως μόριο-γέφυρα. Ως εκ τούτου το πρωτεϊνικό σύζευγμα PQ-VAL-BSA επιλέχτηκε για την συνέχεια των πειραμάτων βελτιστοποίησης. Όσον αφορά το atrazine χρησιμοποιήθηκε εμπορικά διαθέσιμο σύζευγμα για την ανάπτυξη του ανοσοπροσδιορισμού.

Μετά την επιλογή του καταλληλότερου πρωτεϊνικού συζεύγματος για το paraquat ακολούθησε η βελτιστοποίηση των συνθηκών του προσδιορισμού στον αισθητήρα. Δύο από τις πιο σημαντικές παραμέτρους για έναν ανοσοπροσδιορισμό ανταγωνιστικού τύπου είναι η συγκέντρωση του ακινητοποιημένου πρωτεϊνικού συζεύγματος του αναλύτη και η συγκέντρωση του ειδικού αντισώματος έναντι του αναλύτη, αφού οι δύο αυτές παράμετροι καθορίζουν τόσο το απόλυτο σήμα όσο και την ευαισθησία της ανοσοαντίδρασης. Επομένως τα κριτήρια επιλογής κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης είναι αφενός το μέγιστο σήμα απουσία αναλύτη, δηλαδή μέγιστο σήμα στο πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης, αφετέρου το ποσοστό πτώσης του σήματος παρουσία αναλύτη το οποίο καθορίζει την ευαισθησία της ανίχνευσης. Συνηθέστερα αύξηση της

συγκέντρωσης του ακινητοποιημένου συζεύγματος και του ειδικού αντισώματος οδηγούν σε αύξηση του σήματος του μηδενικού προτύπου αλλά μείωση της ευαισθησίας της ανίχνευσης, οπότε απαιτείται επιλογή κατάλληλου συνδυασμού συγκεντρώσεων για να επιτευχθεί επαρκές σήμα και υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης. Όπως προκύπτει και από το Σχήμα 29A , για ένα εύρος συγκεντρώσεων ειδικού αντισώματος έναντι του paraquat από 1 έως 4 $\mu\text{g/mL}$, μέγιστες τιμές οροφής για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης λαμβάνονται για συγκέντρωση συζεύγματος PQ-VAL-BSA ίση με ή μεγαλύτερη από 100 $\mu\text{g/mL}$. Εν τούτοις για συγκέντρωση PQ-VAL-BSA ίση με 50 $\mu\text{g/mL}$ λαμβάνονται για όλες τις συγκεντρώσεις αντισώματος αποκρίσεις που αντιστοιχούν περίπου στο 90% των μέγιστων τιμών οροφής. Επομένως, με βάση το σκεπτικό ότι η μικρότερη συγκέντρωση συζεύγματος ευνοεί την ευαισθησία της ανίχνευσης, επιλέχθηκε η συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/mL}$ PQ-VAL-BSA για ακινητοποίηση στην αισθητήρια επιφάνεια για τα επόμενα πειράματα αλλά και το τελικό πρωτόκολλο.

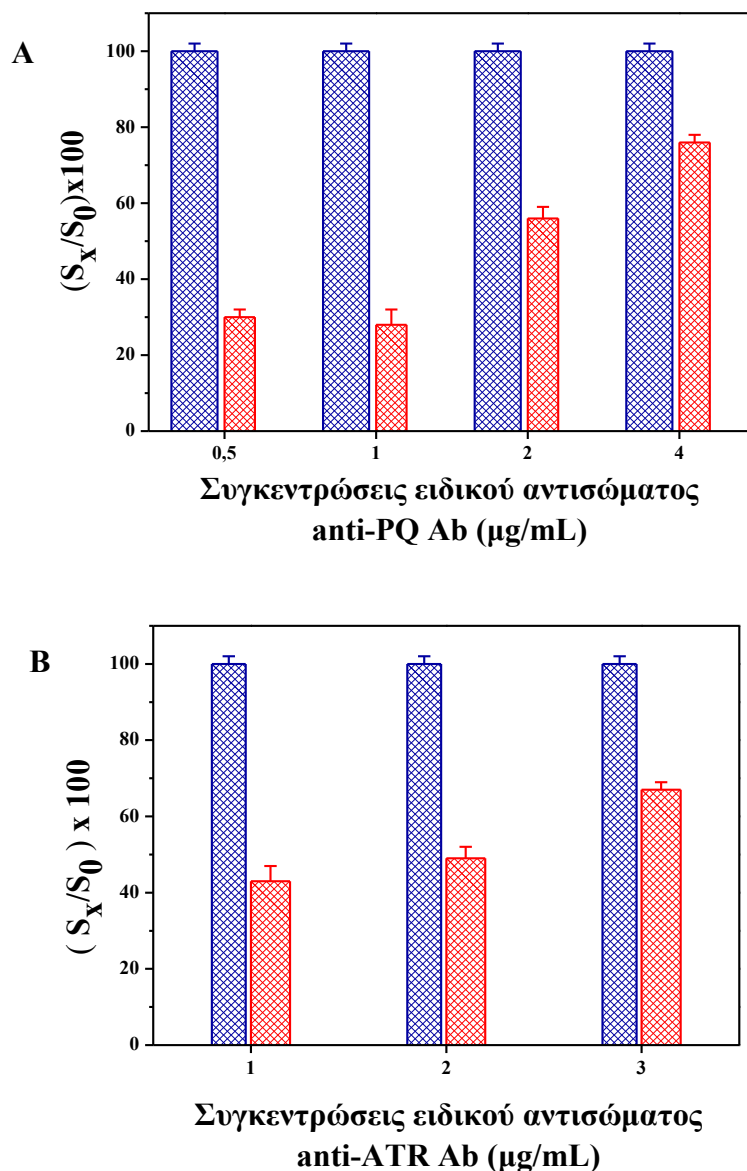


Σχήμα 30: Αποκρίσεις που ελήφθησαν για πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης συναρτήσει της συγκέντρωσης του αντισώματος κατά του atrazine για συγκέντρωση πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA-atrazine 10 (μαύρη γραμμή), 25 (κόκκινη γραμμή), 50 (μπλε γραμμή) και 100 $\mu\text{g/mL}$ (πράσινη γραμμή). Το διάλυμα του αντισώματος διαβιβάστηκε για 10 min διαλύματος και ακολούθησε διαβίβαση για 5 min 2^{ου} αντισώματος συγκέντρωσης 5 $\mu\text{g/mL}$. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών μετρήσεων \pm SD.

Για τον ανοσοπροσδιορισμό του atrazine, οι αποκρίσεις που ελήφθησαν για το πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης, συναρτήσεως της συγκέντρωσης του ειδικού αντισώματος για διαφορετικές συγκεντρώσεις πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA-atrazine, παρατίθενται στο Σχήμα 30. Όπως παρατηρούμε από το σχήμα, επαρκή σήματα λαμβάνονταν για όλες τις συγκεντρώσεις πρωτεϊνικού συζεύγματος BSA-atrazine για συγκέντρωση ειδικού αντισώματος ίση με ή μεγαλύτερη από 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Οπότε, επιλέχθηκε η μικρότερη συγκέντρωση συζεύγματος που παρείχε επαρκές σήμα δηλαδή τα 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ για τα επόμενα πειράματα αλλά και για το τελικό πρωτόκολλο.

5.4.2 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ειδικών αντισωμάτων έναντι των paraquat και atrazine και των αντίστοιχων 2^{ωv} αντισωμάτων

Έπειτα από την επιλογή της καταλληλότερης συγκέντρωσης πρωτεϊνικού συζεύγματος για τους δύο αναλύτες ακολούθησε η βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των ειδικών αντισωμάτων η οποία παρέχει την καλύτερη δυνατή ευαισθησία ανίχνευσης. Αισθητήριες επιφάνειες στις οποίες είχαν ακινητοποιηθεί 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of PQ-VAL-BSA παρείχαν μέγιστα σήματα προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης για συγκεντρώσεις ειδικού αντισώματος anti-PQ Ab ίσες ή μεγαλύτερες από 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Σχήμα 29). Παρά ταύτα όπως προκύπτει από το Σχήμα 31A, η ευαισθησία της ανίχνευσης ήταν σαφώς βελτιωμένη όταν χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση anti-PQ Ab 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ εν συγκρίσει με τη συγκέντρωση 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, ενώ οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν παρόλο που είχαν υψηλή ευαισθησία ανίχνευσης δεν παρείχαν επαρκές σήμα για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης. Οπότε, η συγκέντρωση 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ειδικού έναντι του paraquat αντισώματος ήταν αυτή που υιοθετήθηκε στο τελικό πρωτόκολλο.



Σχήμα 31: Επί τοις εκατό ποσοστό εκτόπισης (A) πρότυπου διαλύματος 0.25 ng/mL paraquat (κόκκινες μπάρες) και (B) πρότυπου διαλύματος 0.25 ng/mL atrazine (κόκκινες μπάρες) ως προς πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης (μπλε μπάρες) που ελήφθησαν από αισθητήριες επιφάνειες βιολογικά τροποποιημένες με 50 µg/mL PQ-VAL-BSA ή 10 µg/mL ATR-BSA συναρτήσεως της συγκέντρωσης του εκάστοτε ειδικού αντισώματος. Σε όλες τις περιπτώσεις το ειδικό αντίσωμα διαβιβάστηκε για 10 min και ακολούθησε ενίσχυση σήματος με διαβίβαση για 5 min είτε διαλύματος anti-rabbit IgG είτε anti-mouse IgG και τα δύο συγκέντρωσης 5 µg/mL. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων ± SD.

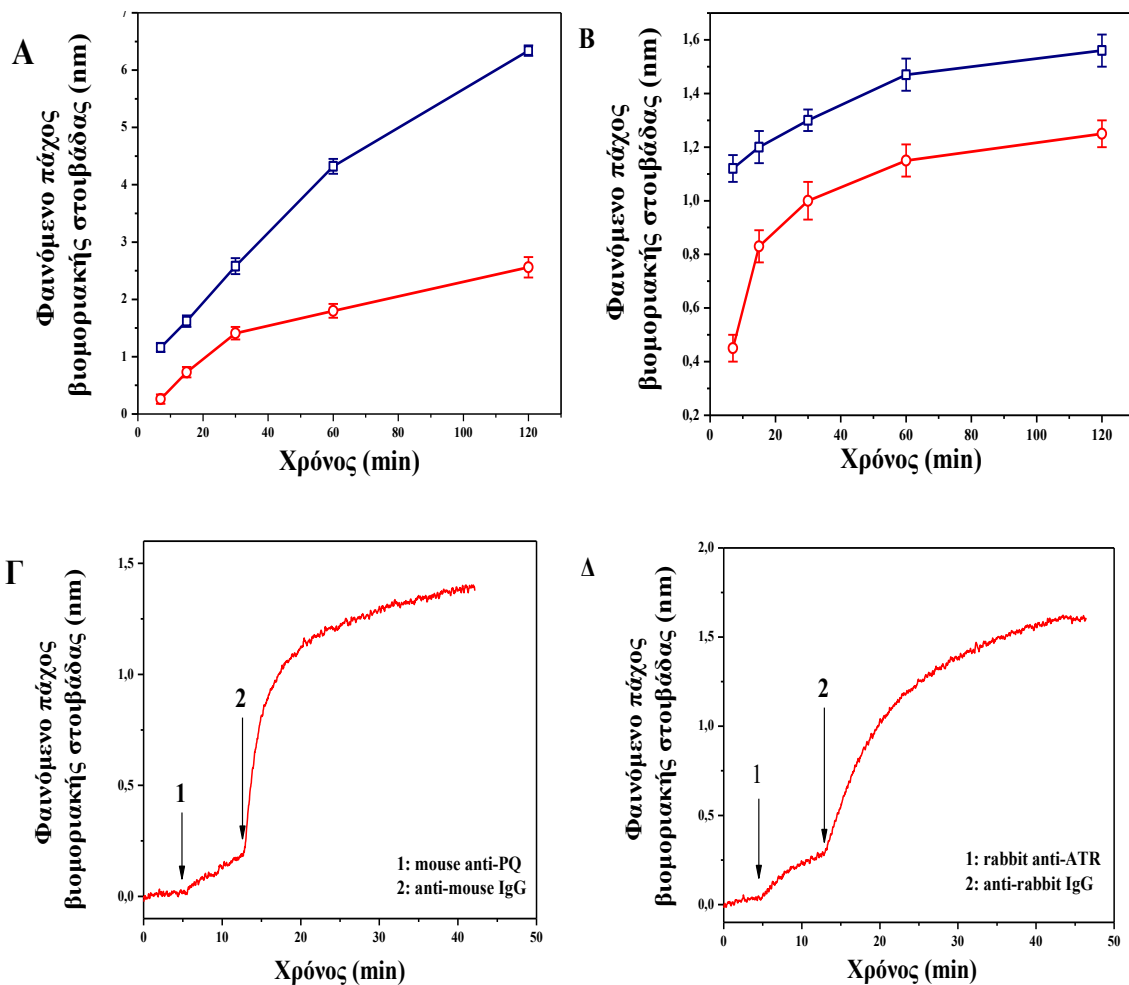
Παρομοίως, η βέλτιστη συγκέντρωση ειδικού αντισώματος για το atrazine επιλέχθηκε με γνώμονα τόσο το σήμα του προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης όσο και την ευαισθησία της ανίχνευσης. Όπως προκύπτει από το Σχήμα 31B, η ευαισθησία της ανίχνευσης βελτιώνεται οριακά όταν η συγκέντρωση του αντισώματος μειώνεται από 2 σε 1 $\mu\text{g/mL}$, ενώ το σήμα για το πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης μειώνεται στο μισό. Συνεπώς, υιοθετήθηκε η συγκέντρωση 2 $\mu\text{g/mL}$ στο τελικό πρωτόκολλο έτσι ώστε να επιτευχθεί και επαρκές σήμα στο πρότυπο μηδενικής συγκέντρωσης αλλά και να διατηρηθεί υψηλή η ευαισθησία του ανοσοπροσδιορισμού.

5.4.3 Μελέτη χρονικής διάρκειας ανοσοχημικού προσδιορισμού

Όπως και στην περίπτωση του glyphosate έτσι και για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των paraquat & atrazine βελτιστοποιήθηκε η χρονική διάρκεια της ανοσοαντίδρασης και του σταδίου αντίδρασης με το 2^ο αντίσωμα. Οι βέλτιστοι χρόνοι επιλέχθηκαν με κριτήριο την επίτευξη επαρκούς σήματος του μηδενικού προτύπου και ευαισθησίας ανίχνευσης και για τους δύο αναλύτες συγχρόνως.

Από το Σχήμα 32A προκύπτει ότι όσον αφορά το paraquat το σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (μπλε γραμμή) αυξανόταν συνεχώς ακόμα και μετά από 2 ώρες αντίδρασης. Παρά ταύτα συγκρίνοντας τα ποσοστά εκτόπισης που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα paraquat 1 ng/mL διαπιστώνουμε ότι όσο αυξάνεται ο χρόνος της ανοσοαντίδρασης μειώνεται το ποσοστό εκτόπισης ή αλλιώς αυξάνεται το απόλυτο σήμα του αντίστοιχου προτύπου διαλύματος (κόκκινη γραμμή στο Σχήμα 32A). Ο ελάχιστος χρόνος ανοσοαντίδρασης για τον οποίο επιτυγχανόταν επαρκές σήμα και ευαισθησία ανίχνευσης ήταν 7 min.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό του atrazine, το σήμα για το πρότυπο διάλυμα μηδενικής συγκέντρωσης αποκτούσε μέγιστες τιμές οροφής μετά από 2 ώρες ανοσοαντίδρασης. Εντούτοις, το 70% του μέγιστου σήματος είχε επιτευχθεί ήδη από τα 7 min (Σχήμα 32, μπλε γραμμή).



Σχήμα 32: Επίδραση του χρόνου αντίδρασης με τα ειδικά αντισώματα mouse anti-PQ (Α) και rabbit anti-atrazine (Β) στο σήμα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης (□) καθώς και του αντίστοιχου προτύπου διαλύματος συγκέντρωσης 1 ng/mL του αντίστοιχου φυτοφαρμάκου (○). Ο χρόνος διαβίβασης του διαλύματος των 2^{uv} αντισωμάτων ήταν 10 min. (Γ, Δ) Επίδραση του χρόνου αντίδρασης με τα 2^a αντισώματα, anti-mouse IgG (Γ) & anti-rabbit IgG (Δ) στο σήμα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης για χρόνο ανοσοαντίδρασης 7 min.

Επιπλέον, αυτός ο χρόνος ανοσοαντίδρασης αντιστοιχούσε και στο μέγιστο ποσοστό πτώσης σήματος παρουσία αναλύτη όπως προκύπτει από την κόκκινη γραμμή του Σχήματος 32B η οποία αντιστοιχεί στα σήματα που ελήφθησαν για πρότυπο διάλυμα atrazine συγκέντρωσης 1 ng/mL συναρτήσει του χρόνου ανοσοαντίδρασης. Συνεπώς ο βέλτιστος χρόνος ανοσοαντίδρασης και για τους δύο αναλύτες ήταν τα 7 min και ως εκ τούτου υιοθετήθηκε στο τελικό πρωτόκολλο του ταυτόχρονου προσδιορισμού.

Στη συνέχεια βελτιστοποιήθηκε η χρονική διάρκεια του σταδίου ενίσχυσης σήματος μέσω διαβίβασης διαλύματος 2^{ου} αντισώματος. Στο Σχήμα 32Γ και 32Δ παρουσιάζεται η επίδραση του χρόνου αντίδρασης με το 2^ο αντίσωμα μετά από ανοσοαντίδραση 7 min, στο σήμα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης του paraquat και του atrazine, αντίστοιχα. Μέγιστες τιμές οροφής ελήφθησαν και για τα δύο 2^α αντισώματα για χρόνο αντίδρασης ίσο με ή μεγαλύτερο από 30 min, όμως περισσότερο από 50% του μέγιστου σήματος είχε ήδη ληφθεί μετά από 5 min και για τους δύο αναλύτες, παρέχοντας απόλυτο σήμα προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης ίσο με ή μεγαλύτερο από 1 nm. Με στόχο ο συνολικός χρόνος του ανοσοπροσδιορισμού να είναι ει δυνατόν μικρότερος, επιλέχθηκε για το τελικό πρωτόκολλο χρόνος αντίδρασης 5 min με το μίγμα των 2^{ων} αντισωμάτων.

Επομένως μετά την βελτιστοποίηση του χρόνου των δύο σταδίων του ανοσοπροσδιορισμού, ο συνολικός χρόνος του ταυτόχρονου προσδιορισμού των paraquat & atrazine ήταν 12 min, 7 min αντίδραση με τα ειδικά αντισώματα και 5 min με τα 2^α αντισώματα.

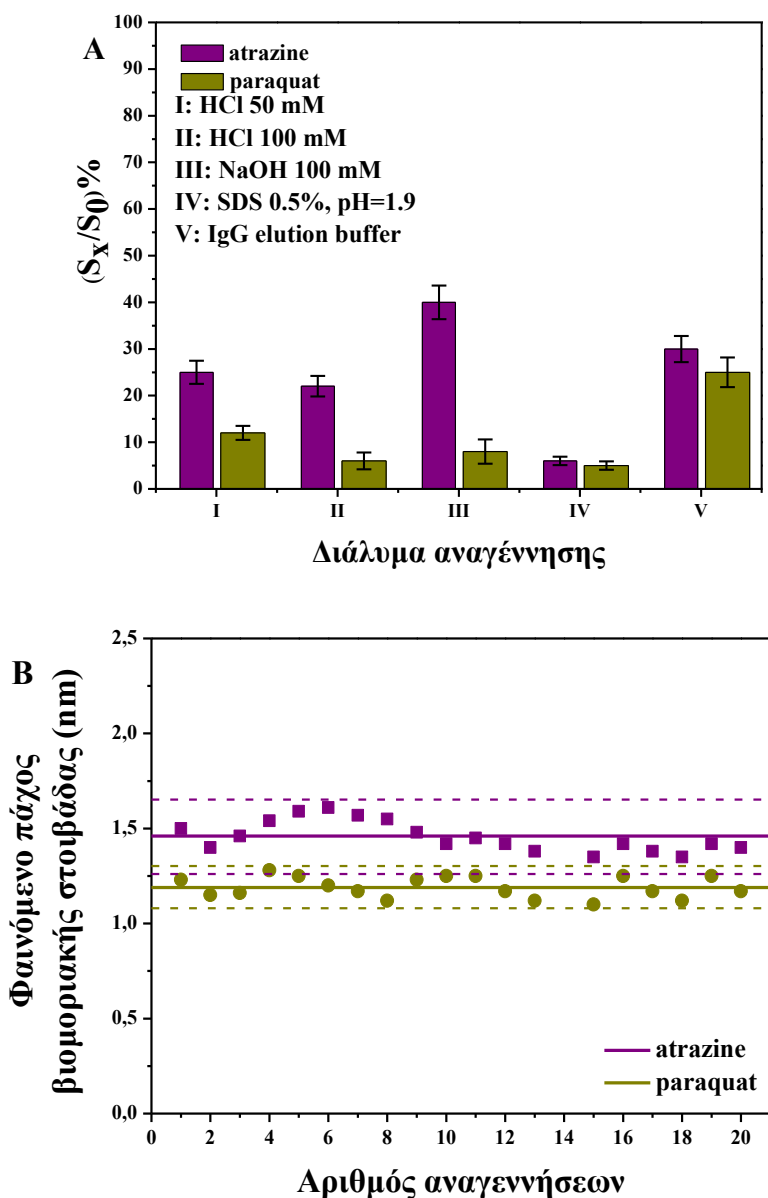
5.4.4 Μελέτη της ικανότητας αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας και σταθερότητας κατά την φύλαξη

Στα πλαίσια της ανάπτυξης του ταυτόχρονου προσδιορισμού των paraquat και atrazine μελετήθηκε επίσης η δυνατότητα αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας για την πραγματοποίηση διαδοχικών μετρήσεων καθώς και η σταθερότητα της επιφάνειας στην πάροδο του χρόνου.

Για την βελτιστοποίηση των συνθηκών αναγέννησης μετά την ολοκλήρωση του ανοσοπροσδιορισμού, διαβιβάστηκαν διάφορα διαλύματα έτσι ώστε να επιλεγθεί εκείνο που αφήνει στην επιφάνεια το μικρότερο επί τοις εκατό ποσοστό δεσμευμένων αντισωμάτων (υπόλειμμα) για κάθε αναλύτη. Τα διαλύματα που δοκιμάστηκαν ήταν διάλυμα HCl 50 mM, HCl 100 mM, NaOH 100 mM, 0.5% (w/v) SDS, pH 1,9, και εμπορικά διαθέσιμο διάλυμα έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας (IgG elution buffer). Κάθε διάλυμα διαβιβάστηκε για 2 λεπτά και ακολούθησε έκπλυση με διάλυμα ανοσοαντίδρασης

και εκ νέου διαβίβαση διαλύματος 2^{ου} αντισώματος. Όσον αφορά το paraquat, μετα περισσότερα διαλύματα εξαιρουμένου του εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας, το επί τοις εκατό ποσοστό των αντισωμάτων που παρέμενε ήταν <10% (Σχήμα 33A). Αντίθετα για το atrazine τα περισσότερα διαλύματα άφηναν υπόλειμμα μεγαλύτερο από 10%, γεγονός που πιθανώς οφείλετε στην υψηλή σταθερά σύνδεσης του ειδικού αντισώματος έναντι του atrazine με τον ακινητοποιημένο αναλύτη. Εξάιρεση αποτέλεσε το διάλυμα 0.5% (w/v) SDS, pH 1,9, με το οποίο επιτυγχάνονταν το ελάχιστο δυνατό υπόλειμμα και για τους δύο αναλύτες, οπότε και υιοθετήθηκε στο τελικό πρωτόκολλο. Επιπλέον μελετήθηκε η χρονική διάρκεια του σταδίου της αναγέννησης. Συγκεκριμένα, εξετάστηκαν χρόνοι 1, 2, 5 & 10 min. Διαπιστώθηκε ότι το επί τοις εκατό ποσοστιαίο υπόλειμμα δεσμευμένων αντισωμάτων που παραμένει στην επιφάνεια μετά το στάδιο της αναγέννησης είναι σταθερό για διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης για χρόνους ίσους ή μεγαλύτερους των 2 min. Μικρότεροι χρόνοι διαβίβασης του διαλύματος αναγέννησης (π.χ., 1 min) είχαν ως αποτέλεσμα την σταδιακή αύξηση του επί τοις εκατό υπολείμματος για διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης. Επομένως επιλέχτηκαν τα 2 min ως ο βέλτιστος χρόνος διαβίβασης διαλύματος αναγέννησης 0,5% (w/v) SDS pH 1,9, από την αισθητήρια επιφάνεια.

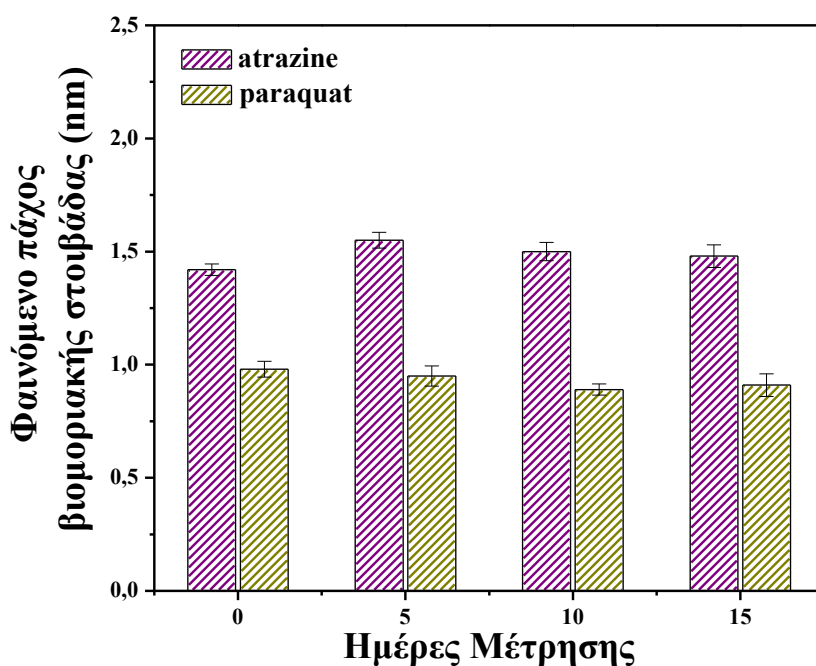
Στη συνέχεια προσδιορίστηκε ο μέγιστος αριθμός κύκλων ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης που μπορούν να πραγματοποιηθούν με μια αισθητήρια επιφάνεια. Στο Σχήμα 33B παρουσιάζονται οι τιμές σήματος προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης για 20 διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης που ελήφθησαν από μια αισθητήρια επιφάνεια η οποία φέρει δύο βιοδραστικές ζώνες, μία για κάθε αναλύτη. Όπως γίνεται φανερό από το Σχήμα 33B, το αναλυτικό σήμα τόσο για το paraquat όσο και για το atrazine είναι σταθερό για τουλάχιστον 20 διαδοχικές μετρήσεις καθώς οι τιμές που λαμβάνονται είναι μεταξύ των ορίων μέση τιμή \pm 2SD. Έπεται λοιπόν ότι κάθε αισθητήρια επιφάνεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί τουλάχιστον 20 φορές εντός της ίδιας ημέρας μειώνοντας πολύ το κόστος της ανάλυσης.



Σχήμα 33: A) Επί τοις εκατό ποσοστιαίο υπόλειμμα δεσμευμένων αντισωμάτων ως προς το σήμα διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης για το atrazine (μωβ στήλες) & το paraquat (πράσινες στήλες), μετά από διαβίβαση για 2 min διαλύματος HCl 50 mM (I), HCl 100 mM (II), NaOH 100 mM (III), 0,5% (w/v) SDS, pH 1,9, (IV) και εμπορικά διαθέσιμου διαλύματος έκλουσης IgG από στήλες χρωματογραφίας συγγενείας (V). B) Αποκρίσεις που ελήφθησαν από αισθητήρια επιφάνεια με δύο βιοδραστικές ζώνες, PQ-VAL-BSA & ATR-BSA, για πρότυπο διάλυμα atrazine & paraquat μηδενικής συγκέντρωσης σε διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης με διάλυμα 0,5% (w/v) SDS, pH 1,9. Η συνεχής γραμμή (μωβ για το atrazine ή πράσινη για το paraquat) αντιστοιχεί στην μέση τιμή των 20 μετρήσεων και οι αντίστοιχου χρώματος διακεκομμένες γραμμές στην μέση τιμή \pm 2SD.

Επιπλέον ελέγχθηκε η σταθερότητα των τροποποιημένων με τα πρωτεϊνικά συζεύγματα αισθητηρίων επιφανειών στο χρόνο. Για τον σκοπό αυτό σε επιφάνεια στην οποία είχαν δημιουργηθεί δύο βιοδραστικές ζώνες με εναπόθεση διαλύματος 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PQ-VAL-BSA και 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ATR-BSA, αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για διάστημα 15 ημερών ανά 5 ημέρες. Κάθε ημέρα μέτρησης πραγματοποιούνταν τρεις μετρήσεις προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης και η βιολογικά ενεργοποιημένη επιφάνεια αποθηκευόταν σε ρυθμιστικό διάλυμα στους 4 °C μέχρι την επόμενη μέτρηση.

Όπως προκύπτει από το Σχήμα 34, με βάση το σήμα του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης, οι αισθητήριες επιφάνειες που φέρουν ακινητοποιημένα τα πρωτεϊνικά συζεύγματα PQ-VAL-BSA & ATR-BSA σε δύο διακριτές ζώνες ήταν σταθερές για διάστημα τουλάχιστον 15 ημερών.



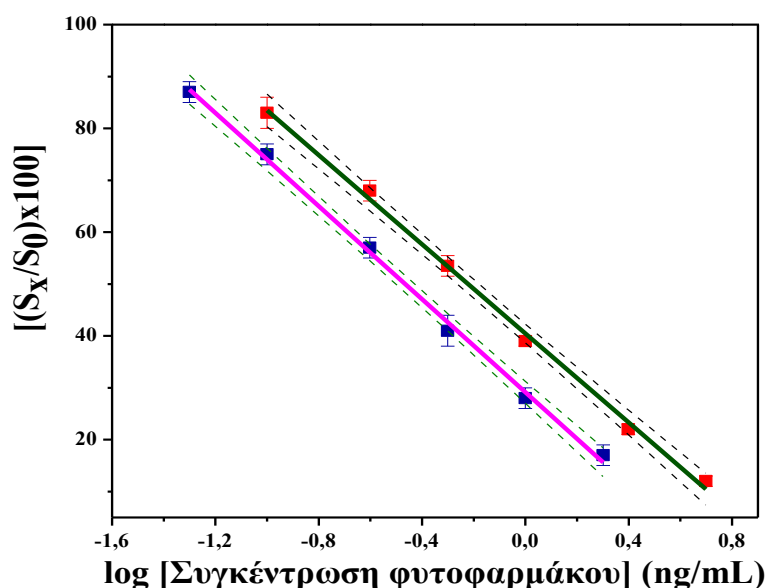
Σχήμα 34: Αποκρίσεις που ελήφθησαν για διάλυμα προτύπου μηδενικής συγκέντρωσης atrazine (μωβ στήλες) και paraquat (πράσινες στήλες) από επιφάνεια τροποποιημένη με 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ATR-BSA και 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PQ-VAL-BSA για διαδοχικούς κύκλους ανοσοαντίδρασης/αναγέννησης που πραγματοποιήθηκαν σε διάστημα 15 ημερών. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στην μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

5.5 Αξιολόγηση μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού paraquat & atrazine με τον οπτικό αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός

5.5.1 Καμπύλες βαθμονόμησης και αναλυτικά χαρακτηριστικά

Μετά την βελτιστοποίηση του ταυτόχρονου προσδιορισμού των ζιζανιοκτόνων paraquat και atrazine με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός και την κατάρτιση των τελικών πρωτοκόλλων του ανοσοπροσδιορισμού ελήφθησαν οι καμπύλες βαθμονόμησης οι οποίες παρουσιάζονται στο Σχήμα 35 και προσδιορίστηκαν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοπροσδιορισμών.

Για την κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα paraquat με εύρος συγκεντρώσεων από 0.05 ng/mL έως 2 ng/mL και atrazine με εύρος από 0.1 ng/mL έως 5 ng/mL.



Σχήμα 35: Καμπύλες βαθμονόμησης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των atrazine (πράσινη γραμμή) και paraquat (ροζ γραμμή) με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. Οι διάσπαστες γραμμές αντιστοιχούν σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%. Κάθε σημείο αντιστοιχεί στη μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

Όπως προκύπτει από το Σχήμα 35, οι καμπύλες βαθμονόμησης ευθυγραμμίζονται με μετασχηματισμό linear $y/\log x$ και οι εξισώσεις των ευθειών παλινδρόμησης είναι οι εξής :

$$\text{atrazine: } y = -42.98(\pm 1.08)x + 40.47(\pm 0.64), R^2 = 0.996$$

$$\text{paraquat: } y = -44.85(\pm 1.03)x + 29.13(\pm 0.64), R^2 = 0.997$$

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των ανοσοπροσδιορισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.

Πίνακας 11: Αναλυτικά χαρακτηριστικά ταυτόχρονου προσδιορισμού atrazine & paraquat με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός.

	paraquat	atrazine
Όριο Ανίχνευσης (LOD) (ng/mL)	0.04	0.05
Όριο Ποσοτικοποίησης (LOQ) (ng/mL)	0.08	0.1
Ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα (%CV)	2.5 – 5.7	2.0 – 4.5
Δια-αναλυτική επαναληψιμότητα (%CV)	3.6 – 5.8	3.3 – 6.2
Γραμμική Δυναμική Περιοχή (ng/mL)	0.1 – 2.5	0.08 – 5.0
IC ₅₀ (ng/mL)	0.25	0.55

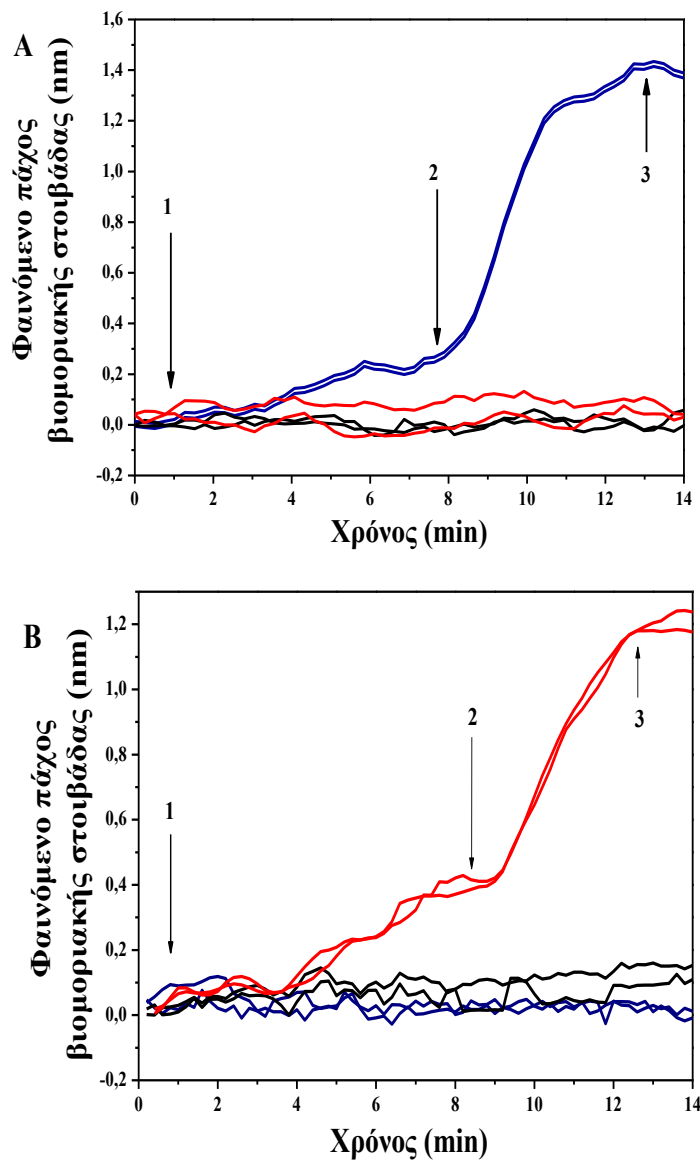
Το όριο ανίχνευσης και το όριο ποσοτικοποίησης ορίστηκαν ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί σε επί τοις εκατό ποσοστό αναλυτικού σήματος ίσο με 100-3SD και 100-6SD, αντίστοιχα, 15 επαναληπτικών μετρήσεων του προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης. Το κατώτατο όριο της

δυναμικής περιοχής προσδιορίστηκε ως η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο όριο ποσοτικοποίησης ενώ το ανώτερο όριο ως η μεγαλύτερη συγκέντρωση για την οποία λαμβάνεται γραμμική απόκριση. Για την εκτίμηση της ενδο-αναλυτικής επαναληψιμότητας του ανοσοχημικού προσδιορισμού παρασκευάστηκαν κοινά δείγματα ελέγχου που αντιστοιχούσαν τρία επίπεδα διαφορετικών συγκεντρώσεων atrazine και paraquat σε ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης.

Η ενδο-αναλυτική επαναληψιμότητα υπολογίστηκε από 4 επαναληπτικές μετρήσεις των τριών δειγμάτων ελέγχου εντός της ίδιας ημέρας, ενώ η δια-αναλυτική επαναληψιμότητα προέκυψε από 4 μετρήσεις των δειγμάτων ελέγχου που πραγματοποιήθηκαν σε τέσσερις διαφορετικές μέρες μέσα σε διάστημα δύο εβδομάδων.

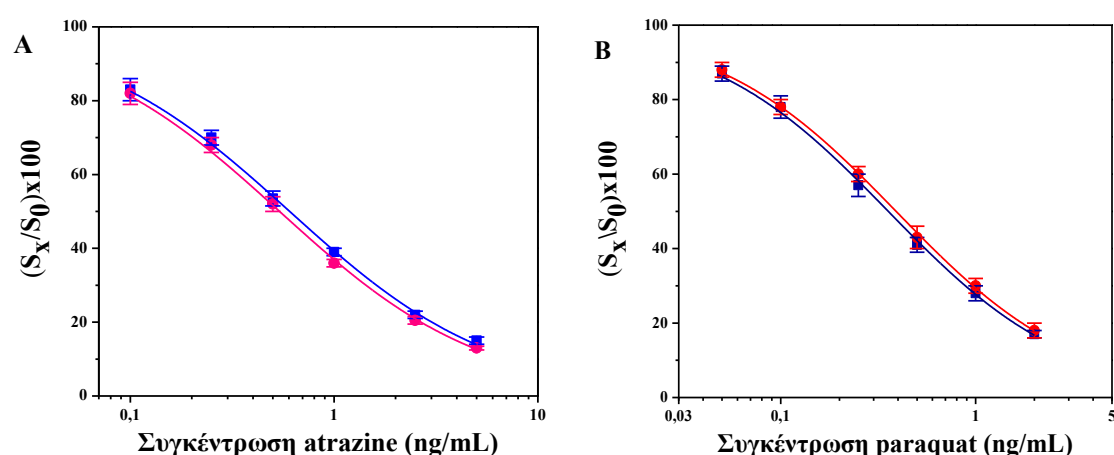
5.5.2 Αξιολόγηση ειδικότητας μεθόδου

Η ειδικότητα των ανοσοπροσδιορισμών των atrazine και paraquat αξιολογήθηκε με πειράματα διασταυρούμενης δραστηριότητας αρχικά σε σχέση με τον αναλύτη που. Για τον σκοπό αυτό, ακολουθώντας τις συνθήκες του τελικού πρωτόκολλου του ταυτόχρονου προσδιορισμού των paraquat και atrazine, διαβιβάστηκαν διαδοχικά πάνω από αισθητήρια επιφάνεια στην οποία είχαν ακινητοποιηθεί σε δύο διακριτές βιοδραστικές ζώνες τα πρωτεϊνικά συζεύγματα PQ-VAL-BSA & ATR-BSA μίγματα προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης με το ειδικό αντίσωμα του atrazine ή του paraquat. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 36, απόκριση ελήφθη από την ζώνη κάθε συζεύγματος μόνο όταν πάνω από την αισθητήρια επιφάνεια διαβιβαζόταν το αντίστοιχο μίγμα που περιείχε το ειδικό για τον ακινητοποιημένο αναλύτη αντίσωμα. Η απόκριση από την ζώνη που αντιστοιχούσε στον έτερο αναλύτη ήταν αμελητέα και δεν μπορούσε να διακριθεί από την απόκριση που ελήφθη από την ενδιάμεση περιοχή των δύο ζωνών η οποία αντιστοιχεί στο σήμα μη ειδικής δέσμευσης.



Σχήμα 36: Αποκρίσεις σε πραγματικό χρόνο που ελήφθησαν με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός από αισθητήρια επιφάνεια η οποία έφερε δύο βιοδραστικές ζώνες, μία για κάθε αναλύτη, κατά την διαβίβαση είτε (A) μίγματος προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης που περιέχει μόνο το anti-ATR Ab (βέλη 1 - 2) και ακολούθως διαλύματος του αντίστοιχου 2^{ου} αντισώματος (βέλη 2 - 3) είτε (B) μίγματος προτύπου διαλύματος μηδενικής συγκέντρωσης που περιέχει μόνο το anti-PQ antibody (βέλη 1 - 2) και ακολούθως διαλύματος του αντίστοιχου 2^{ου} αντισώματος (βέλη 2 - 3). Οι **μπλε γραμμές** αντιστοιχούν στις αποκρίσεις από την βιοδραστική ζώνη όπου είναι ακινητοποιημένο το σύζευγμα **ATR-BSA**, οι **κόκκινες γραμμές** αντιστοιχούν σε αποκρίσεις από την βιοδραστική ζώνη όπου είναι ακινητοποιημένο το σύζευγμα **PQ-VAL-BSA** και οι **μαύρες** στην μεταξύ των δύο ζωνών περιοχή.

Η ειδικότητα της μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των δύο αναλυτών paraquat και atrazine με τον οπτικό αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός ενισχύεται επιπλέον από το γεγονός ότι οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν από αισθητήριες επιφάνειες με δύο βιοδραστικές ζώνες, μία για κάθε αναλύτη, ήταν πανομοιότυπες με αυτές που ελήφθησαν από αισθητήριες επιφάνειες στις οποίες είχε ακινητοποιηθεί το σύζευγμα ενός μόνο αναλύτη (Σχήμα 37).



Σχήμα 37: (Α) Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για προσδιορισμό μόνο του atrazine (μπλε γραμμή) ή ταυτόχρονο προσδιορισμό atrazine/paraquat (ροζ γραμμή) με τον οπτικό αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. (Β) Τυπικές καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για προσδιορισμό μόνο του paraquat (σκούρα μπλε γραμμή) ή ταυτόχρονο προσδιορισμό atrazine/paraquat (κόκκινη γραμμή) με τον οπτικό αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός. Κάθε σημείο είναι η μέση τιμή τριών επαναληπτικών μετρήσεων \pm SD.

5.5.3 Αξιολόγηση ακρίβειας ταυτόχρονου ανοσοπροσδιορισμού atrazine/paraquat

Για την αξιολόγηση της ακρίβειας του ταυτόχρονου προσδιορισμού των atrazine & paraquat με τον αισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός πραγματοποιήθηκαν πειράματα ανάκτησης κατά τα οποία σε δύο δείγματα εμφιαλωμένου νερού και σε ένα δείγμα νερού δικτύου προστέθηκαν

συγκεντρώσεις και των δύο αναλυτών έτσι ώστε να προκύψουν δείγματα που αντιστοιχούσαν σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων εντός της γραμμικής περιοχής των καμπυλών βαθμονόμησης τα οποία αναλύθηκαν με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα

Πίνακας 12: Επί τοις εκατό ποσοστό ανάκτησης εμβολιασμένων με atrazine & paraquat δειγμάτων νερού δικτύου και εμφιαλωμένου νερού.

paraquat			
Δείγμα	Προσθεθείσα Ποσότητα (ng/mL)	Προσδιορισθείσα Ποσότητα (ng/mL)	Ανάκτηση %
Νερό Δικτύου	0.10	0.11	110
	0.25	0.24	96.0
	1.0	0.98	98.0
Εμφιαλωμένο Νερό 1 (Ziria)	0.10	0.09	90.0
	0.25	0.27	108
	1.0	1.05	105
Εμφιαλωμένο Νερό 2 (Dios)	0.10	0.11	110
	0.25	0.25	100
	1.0	0.95	95.0
atrazine			
Δείγμα	Προσθεθείσα Ποσότητα (ng/mL)	Προσδιορισθείσα Ποσότητα (ng/mL)	Ανάκτηση %
Νερό Δικτύου	0.25	0.24	96.0
	1.0	1.0	100
	2.5	2.4	96.0
Εμφιαλωμένο Νερό 1 (Ziria)	0.25	0.25	100
	1.0	1.05	105
	2.5	2.6	104
Εμφιαλωμένο Νερό 2 (Dios)	0.25	0.23	92.0
	1.0	0.95	95.0
	2.5	2.5	100

Στα δείγματα νερού αρχικά, προ του εμβολιασμού τους, πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των δύο αναλυτών τόσο με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός όσο και σε φρεάτια μικροπιλοδότησης. Δεν προσδιορίστηκαν ανιχνεύσιμες ποσότητες paraquat ή atrazine σε κανένα από τα τρία δείγματα και με τις δύο μεθόδους. Στον Πίνακα 12 παρουσιάζονται οι μέσες τιμές των επί τοις εκατό ποσοστών ανάκτησης, η οποία υπολογίστηκε ως ο λόγος της προσδιορισθείσας προς την προστεθείσα συγκέντρωση, για επίπεδα εμβολιασμού 0.1, 0.25 και 1 ng/mL για το paraquat και 0.25, 1 και 2.5 ng/mL για το atrazine. Από τον πίνακα προκύπτει ότι τα ποσοστά ανάκτησης των εξωγενώς προστεθέντων αναλυτών κυμαίνονται από 92% έως 110%, υποδεικνύοντας ότι η μέθοδος που αναπτύχθηκε για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των atrazine και paraquat με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα ανάκλασης λευκού φωτός είναι ακριβής.

6 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Σήμερα παρά την προσπάθεια για εφαρμογή εναλλακτικών καλλιεργητικών πρακτικών με γνώμονα την βιώσιμη γεωργία, τα φυτοφάρμακα συνεχίζουν να είναι η πρώτη λύση στην καταπολέμηση των εχθρών των φυτών. Από τις διάφορες κατηγορίες φυτοφαρμάκων τα ζιζανιοκτόνα χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην γεωργία καθώς είναι ο πιο διαδεδομένος και εύχρηστος τρόπος καταπολέμησης μονοετών ή πολυετών ζιζανίων. Πιο συγκεκριμένα, το glyphosate είναι το πιο διαδεδομένο ζιζανιοκτόνο παγκοσμίως, καθώς η πλειοψηφία των καλλιεργειών σιταριού, καλαμποκιού και σόγιας είναι γεννητικά τροποποιημένες ώστε να έχουν αντίσταση στο glyphosate, ενώ τα ζιζανιοκτόνα paraquat και atrazine, αν και απαγορευμένα εντός Ευρωπαϊκής Ένωσης συνεχίζουν να χρησιμοποιούνται σε άλλες χώρες όπως η Κίνα, η Ινδία, οι Ηνωμένες Πολιτείες και σε χώρες της Λατινικής Αμερικής σε ποικίλες καλλιέργειες όπως τσάι, καφές, σιτηρά, ρύζι, βολβώδη λαχανικά κ.α.. Λόγω της αμετροεπούς χρήσης αυτών των ζιζανιοκτόνων, υπολείμματα τους έχουν βρεθεί σε τρόφιμα αλλά και σε υπόγεια και επιφανειακά γλυκά νερά. Στα πλαίσια της διασφάλισης της ποιότητας του πόσιμου νερού το οποίο προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση με βάση την ισχύουσα οδηγία 98/83/ΕΚ καθημερινά ελέγχετε μια πληθώρα δειγμάτων νερού δικτύου, πηγών, γεωτρήσεων κ.α., από δημόσιους και ιδιωτικούς φορείς για υπολείμματα φυτοφαρμάκων.

Σε αυτά τα πλαίσια στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού των τριών ζιζανιοκτόνων glyphosate, atrazine και paraquat σε πόσιμο νερό με τη χρήση ενός οπτικού ανοσοαισθητήρα χωρίς τη χρήση ιχνηθετών. Ο οπτικός αισθητήρας που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή βασίζεται στην συμβολομετρία ανάκλασης λευκού φωτός (White Light Reflectance Spectrometry). Το αναλυτικό σήμα είναι η μετατόπιση του φάσματος συμβολής προς μεγαλύτερα μήκη κύματος εκφρασμένη σε nm εξαιτίας της αύξησης του πάχους της βιομοριακής στοιβάδας λόγω της βιοαντίδρασης που λαμβάνει χώρα στην τροποποιημένη με κατάλληλο βιομόριο αναγνώρισης επιφάνεια Si η οποία φέρει υμένιο SiO₂ πάχους ~1000 nm. Μέσω

εφαρμογής κατάλληλου αλγορίθμου, το λογισμικό που καταγράφει τα φάσματα συμβολής, μετατρέπει την μετατόπιση σε φαινόμενο πάχος της στοιβάδας του SiO₂, γεγονός που επιτρέπει την παρακολούθηση της βιοαντίδρασης σε πραγματικό χρόνο.

Αρχικά αναπτύχθηκαν ανοσοενζυμικοί προσδιορισμοί ανταγωνιστικού τύπου σε φρεάτια μικροπιλοδότησης για κάθε ένα από τα εξεταζόμενα ζιζανιοκτόνα προκειμένου να γίνει η επιλογή των αντισωμάτων, των πρωτεϊνικών συζευγμάτων ακινητοποίησης και να επιλεγούν οι συνθήκες του κάθε ανοσοπροσδιορισμού με κριτήριο την επάρκεια του αναλυτικού σήματος και την ευαισθησία της ανίχνευσης. Λόγω της μη ύπαρξης διαθέσιμων πρωτεϊνικών συζευγμάτων για τα paraquat και glyphosate, παρασκευάστηκαν αφενός παράγωγα του paraquat με βαλερικό οξύ και κυανουρικό χλωρίδιο, ικανά για σύζευξη με φέρουσες πρωτεΐνες, αφετέρου δε συζεύγματα διαφόρων μοριακών αναλογιών με αλβουμίνη ορού βοός ή οβαλβουμίνη και για τους δύο αναλύτες. Κατά την ανάπτυξη των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών ελήφθη μέριμνα ώστε να επιλεγούν οι δυνατόν όμοιες συνθήκες και για τα τρία ζιζανιοκτόνα με τελικό σκοπό οι μέθοδοι να μεταφερθούν στον οπτικό ανοσοαισθητήρα για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τους. Συγκεκριμένα, για κάθε αναλύτη επιλέχθηκαν τα πρωτεϊνικά συζεύγματα ακινητοποίησης και τα ειδικά αντισώματα αυτών και προσδιορίστηκε αμφότερα η βέλτιστη συγκέντρωση τους. Προσδιορίστηκαν τα βέλτιστα ρυθμιστικά διαλύματα ακινητοποίησης, αποκλεισμού ελευθέρων θέσεων, έκπλυσης και ανοσοαντίδρασης. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση της προεπάσης των προτύπων διαλυμάτων των ζιζανιοκτόνων με τα αντίστοιχα ειδικά αντισώματα στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Επιπλέον, ειδικά για το glyphosate εξετάστηκε η τροποποίηση του στα πρότυπα διαλύματα και τα δείγματα πριν την ανοσοαντίδραση με ηλεκτρικό ή μηλεϊνικό ανυδρίτη και διαπιστώθηκε ότι η ευαισθησία της ανίχνευσης βελτιώθηκε κατά δύο τάξεις μεγέθους μετά από δεκάλεπτη αντίδραση με ηλεκτρικό ανυδρίτη. Το αποτέλεσμα αυτό σε συνδυασμό με το γεγονός ότι το βέλτιστο ρυθμιστικό διάλυμα ανοσοαντίδρασης για το glyphosate ήταν διαφορετικό σε σχέση με το αντίστοιχο διάλυμα για τα paraquat και atrazine, οδήγησε στην ανάπτυξη μιας μεθόδου ταυτόχρονου προσδιορισμού για τα paraquat και atrazine και μιας μεθόδου για

τον προσδιορισμό του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα. Ακόμη, μέσω των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών σε φρεάτια μικροτιπλοδότησης, αξιολογήθηκε η ειδικότητα των αντισωμάτων μέσω πειραμάτων διασταυρούμενης δραστηριότητας όπου μελετήθηκε κατά πόσον κάθε ειδικό αντίσωμα αναγνώριζε άλλα ζιζανιοκτόνα ή μεταβολίτες αυτών δομικά όμοια με τους προς προσδιορισμό αναλύτες. Συγκεκριμένα, για το ειδικό αντίσωμα έναντι του paraquat εξετάστηκε η διασταυρούμενη δραστηριότητα έναντι των monoquat και diquat, για το ειδικό αντίσωμα έναντι του atrazine εξετάστηκε η διασταυρούμενη δραστηριότητα έναντι των proprazine, simazine και τέλος για το ειδικό αντίσωμα έναντι του glyphosate εξετάστηκε η διασταυρούμενη δραστηριότητα έναντι του κύριου μεταβολίτη του AMPA (αμινομέθυλο φωσφονικό οξύ), του glyphosate και της γλυκίνης. Μετά την ολοκλήρωση της ανάπτυξης των ενζυμοανοσοχημικών προσδιορισμών στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης ακολούθησε μεταφορά των ανοσοχημικών προσδιορισμών στον οπτικό αισθητήρα.

Για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των paraquat & atrazine και τον προσδιορισμό του glyphosate με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα βελτιστοποιήθηκαν εκ νέου κάποιες παράμετροι κυρίως λόγω του γεγονότος ότι η ανοσοαντίδραση λαμβάνει χώρα υπό ροή και η σχέση επιφάνειας προς όγκο αντιδραστηρίων στον αισθητήρα διαφέρει από αυτήν στα φρεάτια μικροτιπλοδότησης. Ως εκ τούτου, επαναξιολογήθηκαν τα πρωτεϊνικά συζεύγματα των paraquat και glyphosate και προσδιορίστηκαν εκ νέου οι βέλτιστες συγκεντρώσεις πρωτεϊνικών συζευγμάτων και ειδικών αντισωμάτων. Για τον προσδιορισμό του glyphosate, με κριτήριο την μείωση του χρόνου ανάλυσης και την αύξηση της ευαισθησίας της ανίχνευσης δοκιμάστηκαν και δύο διαμορφώσεις ανοσοπροσδιορισμού με χρήση βιοτινυλιωμένου ειδικού αντισώματος έναντι του glyphosate ή βιοτινυλιωμένου 2^{ου} αντισώματος και επακόλουθη αντίδραση με στρεπταβιδίνη. Επίσης, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των paraquat & atrazine, ιδιαίτερη βαρύτητα δόθηκε στην αξιολόγηση της ειδικότητας καθενός από τα ειδικά κατά των αναλυτών αυτών αντισώματος ως προς τον άλλο αναλύτη. Η ειδικότητα προσδιορίστηκε διαβιβάζοντας πάνω από αισθητήρια επιφάνεια σε διακριτές θέσεις της οποίας είχαν ακινητοποιηθεί τα πρωτεϊνικά συζεύγματα του paraquat και του atrazine διάλυμα καθενός εκ των δύο ειδικών αντισωμάτων έναντι του paraquat ή του

atrazine προκειμένου να ελεγχθεί η απόκριση της κάθε βιοδραστικής ζώνης. Διαπιστώθηκε ότι απόκριση διακριτή από εκείνη του σήματος μη ειδικής δέσμευσης (ενδιάμεση περιοχή μεταξύ βιοδραστικών ζωνών) ελήφθη από κάθε μία ζώνη μόνο όταν διαβιβαζόταν το αντίστοιχο ειδικό αντίσωμα. Επιπλέον ένδειξη της απουσίας διασταυρούμενης δραστηριότητας αποτελεί το γεγονός ότι οι καμπύλες βαθμονόμησης που ελήφθησαν για καθέναν από τους δύο αναλύτες από επιφάνειες στις οποίες είχε ακινητοποιηθεί μόνο το σύζευγμα του συγκεκριμένου αναλύτη ή τα συζεύγματα και των δύο αναλυτών ήταν πανομοιότυπες.

Συνοπτικά, χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των paraquat & atrazine ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης ήταν 12 λεπτά ο οποίος συνίσταται σε 7-λεπτη διαβίβαση μίγματος των βαθμονομητών των δύο αναλυτών ακολουθούμενη από 5-λεπτη διαβίβαση μίγματος 2^{wv} αντισωμάτων. Τα όρια ανίχνευσης που επετεύχθησαν ήταν 0.05 ng/mL και 0.04 ng/mL για το atrazine και το paraquat, αντίστοιχα. Οι περιοχές εργασίας ήταν από 0.08 έως 5.0 ng/mL για το atrazine και από 0.1 έως 2.5 ng/mL για το paraquat. Οι ανοσοπροσδιορισμοί ήταν επαναλήψιμοι με συντελεστές διακύμανσης εντός του ιδίου και μεταξύ προσδιορισμών μικρότερους από 4.5% και 6.2% για το atrazine και από 5.7% και 5.8 %για το paraquat. Επίσης οι ανοσοπροσδιορισμοί ήταν ακριβείς με ποσοστά ανάκτησης που κυμαίνονταν από 92% έως 100% και από 90% έως 110% για το atrazine και το paraquat, αντίστοιχα. Για τον ανοσοπροσδιορισμό του glyphosate ο συνολικός χρόνος ανάλυσης ήταν 25 λεπτά εκ των οποίων 15 λεπτά ήταν η κυρίως ανοσοαντίδραση και 10 λεπτά η διαβίβαση διαλύματος 2^{ou} αντισώματος για ενίσχυση του σήματος. Το όριο ανίχνευσης που επετεύχθη ήταν 0.01 ng/mL και η περιοχή εργασίας κυμαινόταν από 0.04 έως 10 mg/mL. Ο ανοσοπροσδιορισμός ήταν επαναλήψιμος με συντελεστές διακύμανσης εντός του ιδίου και μεταξύ προσδιορισμών μικρότερους από 4.5% και 6.5%, αντίστοιχα και ακριβής με ποσοστά ανάκτησης που κυμαίνονταν από 90% έως 120%.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφερθεί ότι τα όρια ανίχνευσης των ανοσοπροσδιορισμών με τον οπτικό αισθητήρα για τα atrazine, paraquat και glyphosate είναι χαμηλότερα κατά 2, 2.5 και 10 φορές αντίστοιχα, από το

ανώτατο επιτρεπτό όριο (0.1 ng/mL, Maximum Residue Level, MRL) που έχει θέσει η Ευρωπαϊκή Επιτροπή για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων σε πόσιμο νερό.

Μια σημαντική παράμετρος που μελετήθηκε είναι η δυνατότητα αναγέννησης της αισθητήριας επιφάνειας, δηλαδή η απομάκρυνση των ανοσοσυμπλεγμάτων που έχουν δημιουργηθεί κατά την διάρκεια μιας ανοσοαντίδρασης ώστε οι τροποποιημένες με τα πρωτεϊνικά συζεύγματα επιφάνειες να μπορούν να χρησιμοποιηθούν για πολλαπλές μετρήσεις. Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης είναι βασικό πλεονέκτημα ενός βιοαισθητήρα καθώς μειώνει σημαντικά το κόστος της ανάλυσης και αυξάνει την ανταγωνιστικότητα του συγκριτικά με τις κλασσικές μεθόδους ανάλυσης. Υπό αυτό το πρίσμα εξετάστηκαν διάφορα διαλύματα ως προς την ικανότητά τους να απομακρύνουν επαρκώς τα δεσμευμένα αντισώματα από τα ακινητοποιημένα πρωτεϊνικά συζεύγματα των αναλυτών ύστερα από έναν ανοσοπροσδιορισμό. Διαπιστώθηκε ότι για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των paraquat & atrazine διαβίβαση για 2 λεπτά διαλύματος SDS 0.0.5% pH 1.9 και αντίστοιχα για τον προσδιορισμό του glyphosate διαβίβαση για 2 λεπτά διαλύματος HCl 50 mM ήταν επαρκής για σχεδόν πλήρη απομάκρυνση των ανοσοσυμπλεγμάτων. Χρησιμοποιώντας τα βέλτιστα διαλύματα αναγέννησης προσδιορίστηκε στη συνέχεια ο μέγιστος αριθμός κύκλων αντίδρασης/αναγέννησης που μπορούσαν να πραγματοποιηθούν με την ίδια ψηφίδα πυριτίου χωρίς να επηρεαστεί η σταθερότητα των ακινητοποιημένων πρωτεϊνικών συζευγμάτων. Έτσι, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των paraquat & atrazine βρέθηκε ότι η αισθητήρια επιφάνεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον 20 συνεχόμενες μετρήσεις ενώ για τον προσδιορισμό του glyphosate μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον 15 συνεχόμενες μετρήσεις.

Στην βιβλιογραφία υπάρχουν πλείστες αναφορές σχετικά με την ανίχνευση φυτοφαρμάκων με βιοαισθητήρες, κυρίως σε τρόφιμα, σε περιβαλλοντικά δείγματα και λιγότερο συχνά σε δείγματα ανθρώπινου πλάσματος, αίματος ή ούρων. Στον Πίνακα 13 συνοψίζονται τα όρια ανίχνευσης, οι γραμμικές δυναμικές περιοχές, η διάρκεια της ανάλυσης και το είδος του δείγματος μεθόδων προσδιορισμού των paraquat και atrazine είτε μεμονωμένα ή με άλλες ουσίες με

οπτικούς αισθητήρες που δεν χρησιμοποιούν ιχνηθέτες που έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία.

Όσον αφορά στον προσδιορισμό του atrazine, οι περισσότερες εργασίες αφορούν αισθητήρες οι οποίοι βασίζονται στο συντονισμό επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) [173, 174, 176-178, 211] με πρώτη αναφορά αυτή των M. Minunni & M. Mascini στο περιοδικό Analytical Letters το 1993 [211]. Επίσης έχουν αναφερθεί εργασίες με βιοαισθητήρες που βασίζονται στη φασματοσκοπία συμβολής ανάκλασης (reflectance interference spectroscopy, RIfS) [212], συμβολόμετρα τύπου Mach-Zehnder [213, 214], συντονισμού κατόπτρων [215], κυματοδηγούς ITO (Indium Tin Oxide) [216]

Πίνακας 13: Σύγκριση του προτεινόμενου βιοαισθητήρα με οπτικούς βιοαισθητήρες χωρίς χρήση ιχνηθετών που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των ζιζανιοκτόνων atrazine & paraquat.

	Είδος αισθητήρα	Όριο ανίχνευσης (LOD)	Γραμμική Δυναμική Περιοχή	Χρόνος Ανάλυσης	Είδος δείγματος	Αριθμός Αναφοράς
Atrazine	WLRS	0.05 ng/mL	0.10 - 5.0 ng/mL	12 min	εμφιαλωμένο & νερό δικτύου	[217]
	SRP	0.05 ng/mL	0.1 - 1.0 ng/mL	15 min	απεσταγμένο & νερό δικτύου	[211]
	SPR	50 ng/mL	50 ng/mL- 50 µg/mL	60 min	-	[173]
	SPR	5 ng/mL	-	15 min	-	[174]
	SPR	0.02 ng/mL	0.03 - 0.5 ng/mL	25 min	πόσιμο νερό	[177]
	SPR με MIPS	2 fg/mL	0.2 – 2.0 ng/ml	10 min	-	[176]
	SPR με MIPS	0.7 ng/mL	0.5- 15 ng/mL	32 min	-	[178]
	RiFS	0.25 ng/mL	up to 10 ng/mL	30 min	υπόγειο νερό	[212]
	MZI	0.1 ng/mL	0.3- 10 ng/mL	10 min	χώμα	[213]
	Resonant mirror	1 ng/mL	0.1 ng/mL- 10 µg/mL	5 min	χώμα	[214]
	ITO waveguide	0.1 ng/mL	0.1 -100 ng/mL	30 min	-	[215]
	RAIRS	0.3 ng/mL	up to 10 ng/mL	180 min	-	[218]
Paraquat	WLRS	0.04 ng/mL	0.08-2.5 ng/mL	12 min	εμφιαλωμένο & νερό δικτύου	[217]
	Fluoroimmunosensor (RIANA)	0.01 ng/mL 0.06 ng/mL	0.3 - 5.0 ng/mL	15 min	νερό MilliQ νερό ποταμού	[219]
	Fluoroimmunosensor	0.06 ng/mL	0.12 - 6.0 ng/mL	30 min	πόσιμο νερό	[170]
	SPR	-	51-2829 ng/mL	1 min	ρυθμιστικό διάλυμα	[180]
	SERS	0.51 ng/mL	up to 257 ng/mL	-	απεσταγμένο νερό	[220]
	SERS	0.87 ng/mL	26 ng/mL - 257 µg/mL	-	φλούδα αχλαδιού	[221]
	SERS	2.5 ng/mL	-	-	εμφιαλωμένο & νερό δικτύου	[222]

καθώς και βιοαισθητήρες που βασίζονται στη φασματοσκοπία ανάκλασης-απορρόφησης υπεριώδους ακτινοβολίας (reflection-absorption IR spectroscopy, RAIRS) [218]. Οι αισθητήρες SPR χρησιμοποιούν ως βιομόρια αναγνώρισης αντισώματα [174, 177, 211], την πρωτεΐνη πλαστοκινόνη της οποίας αναστολέας είναι το atrazine [173] ή πολυμερή που παρασκευάζονται με μοριακή αποτύπωση (Molecular Imprinting Polymers, MIPs) [176, 178]. Τα αντισώματα και τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή είναι πολύ πιο ειδικά συγκριτικά με την πλαστοκινόνη ή άλλες πρωτεΐνες όπου ο προσδιοριζόμενος αναλύτης λειτουργεί ως υπόστρωμα, παρέχοντας όρια ανίχνευσης τα οποία είναι συγκρίσιμα με το όριο ανίχνευσης που επιτεύχθηκε για το atrazine με τον οπτικό ανοσοαισθητήρα της παρούσας διατριβής. Την μοναδική εξαίρεση αποτελεί η εργασία των Agrawal H. et al. [176] στην οποία η ανίχνευση του atrazine πραγματοποιείται με αισθητήρα συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων χρησιμοποιώντας ως μόριο αναγνώρισης ένα μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές. Στη συγκεκριμένη εργασία αναφέρεται ότι το όριο ανίχνευσης είναι 2 fg/mL, παρά ταύτα, ο τρόπος υπολογισμού βασίζεται στην διακριτική ικανότητα του αισθητήρα και όχι στην ευαισθησία της καμπύλης βαθμονόμησης. Όσον αφορά στους άλλους τύπους αισθητήρων που έχουν εφαρμοσθεί για την ανίχνευση του atrazine, όλοι βασίζονται σε ανοσοανάλυση ανταγωνιστικού τύπου [212, 213, 215, 216, 218] με όρια ανίχνευσης 2 έως 6 φορές υψηλότερα σε σχέση με όριο ανίχνευσης που επιτεύχθη με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα για χρόνους ανάλυσης που κυμαίνονται από 10 έως 180 λεπτά.

Σχετικά με τους αισθητήρες που αναφέρονται στην βιβλιογραφία για την ανίχνευση του paraquat, αυτοί μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες, τους ανοσοαισθητήρες και τους φασματοσκοπικούς αισθητήρες που βασίζονται σε ενισχυόμενη από την επιφάνεια σκέδαση Raman (Surface Enhanced Raman Scattering, SERS). Από τους ανοσοαισθητήρες δύο αναφορές αφορούν οπτικούς αισθητήρες στους οποίους χρησιμοποιούνται αντισώματα επισημασμένα με φθορίζοντα μόρια για την ανάπτυξη ανοσοπροσδιορισμών μη ανταγωνιστικού τύπου [170, 219]. Με τον πρώτο χρονολογικά αισθητήρα [219] επιτυγχάνεται όριο ανίχνευσης στο νερό 4-φορές μικρότερο εν συγκρίσει με τον προτεινόμενο αισθητήρα για την ίδια διάρκεια ανάλυσης, όταν οι βαθμονομητές

παρασκευάζονται σε υπερκάθαρο νερό, ενώ το όριο ανίχνευσης είναι παρόμοιο με το προτεινόμενο αισθητήρα όταν οι βαθμονομητές παρασκευαστούν σε νερό από ποταμό. Ο δεύτερος χρονολογικά αισθητήρας [170] έχει συγκρίσιμο όριο ανίχνευσης με τον οπτικό αισθητήρα της παρούσας διατριβής, ο χρόνος ανάλυσης είναι 30 λεπτά με τον οποίο και ανιχνεύει ταυτόχρονα τέσσερα φυτοφάρμακα. Για τον προσδιορισμό του paraquat έχει χρησιμοποιεί επίσης ένα εμπορικά διαθέσιμο σύστημα SPR, το BIAcore X, με το οποίο διερευνήθηκε η δυνατότητα ενίσχυσης του σήματος μέσω χρήσης ενός διμερούς του paraquat ως γέφυρα μεταξύ δύο μορίων αντισώματος έτσι ώστε να αυξηθούν τα μόρια των ακινητοποιημένων αντισωμάτων ανά μονάδα επιφάνειας του αισθητήρα. Οι συγγραφείς δεν αναφέρουν ένα όριο ανίχνευσης της μεθόδου, αν και η ελάχιστη συγκέντρωση paraquat που χρησιμοποιούν είναι 51 ng/mL, ενώ ο χρόνος ανάλυσης είναι μόλις 1 λεπτό [180]. Όσον αφορά τις εργασίες για τον προσδιορισμό του paraquat με αισθητήρες που βασίζονται στην σκέδαση Raman (SERS) [220-222], αυτές χαρακτηρίζονται από όρια ανίχνευσης τα οποία είναι από 12 έως 62 φορές υψηλότερα σε σχέση με το όριο ανίχνευσης που επετεύχθη για το paraquat με τον οπτικό αισθητήρα της παρούσας διατριβής και επομένως είναι περισσότερο κατάλληλες μέθοδοι για τον προσδιορισμό του paraquat σε αγροτικά προϊόντα για τα οποία τα μέγιστα επιτρεπτά όρια (0.05 – 500 g/kg) είναι μεγαλύτερα από αυτά για το πόσιμο νερό. Επιπρόσθετα, στις συγκεκριμένες εργασίες δεν αναφέρεται ο απαιτούμενος χρόνος καταγραφής και επεξεργασίας του φάσματος ενώ η ανάγκη off-line επεξεργασίας του φάσματος μειώνει την πιθανότητα, προς το παρόν τουλάχιστον, εφαρμογής του συγκεκριμένου αισθητήρα για μετρήσεις σε πραγματικό χρόνο και κατά για αναλύσεις πεδίου.

Πίνακας 14: Σύγκριση του προτεινόμενου βιοαισθητήρα με οπτικούς βιοαισθητήρες με ή χωρίς τη χρήση ιχνηθετών που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό του glyphosate.

Είδος Αισθητήρα	Αρχή ανίχνευσης	Όριο ανίχνευσης (LOD)	Γραμμική Δυναμική Περιοχή	Χρόνος ανάλυσης	Είδος δείγματος	Αριθμός αναφοράς
Αναπτυχθείς αισθητήρας	WLRS	0.01 ng/mL	0.04 – 10 ng/mL	25 min	Bottled & tap water	
Οπτικοί αισθητήρες χωρίς χρήση ιχνηθέτη	Oligonucleotide functionalized SPR	98 ng/mL	98– 845 ng/mL	10 min	ρυθμιστικό διάλυμα	[181]
	LPG-AuNPs-Cys fiber sensor	3.38 ng/mL	84.5 – 16900 ng/mL	30 min	νερό	[223]
Οπτικοί αισθητήρες με χρήση ιχνηθέτη	Prism coupling optical waveguide	0.24 ng/mL	0.24 – 0.74 ng/mL	-	ρυθμιστικό διάλυμα	[224]
	Fluorescence sensor	0.021 ng/mL	0.05 - 1 ng/mL	25 min	νερό, χρώμα	[210]
	Fluorescence intensity based on glyphosate-dsDNA-Au NP conjugates	0.01 ng/mL	0.01 – 100 ng/mL	2 h	ρυθμιστικό διάλυμα	[225]
	Fluorescence intensity based on glyphosate-dsDNA-FMPs conjugates	0.045 ng/mL	0.17 ng/mL– 1.7 µg/mL	2 h	ρυθμιστικό διάλυμα	[226]
	Eu ³⁺ MIP optical fiber	0.009 ng/mL	0.009 ng/mL – 100 µg/mL	20 min	ρυθμιστικό διάλυμα	[227]
	Chemiluminescence assay on MIP 96-well plates	46 ng/mL	500 – 35000 ng/mL	-	καρότο, σπανάκι	[228]
Ηλεκτροχημικοί αισθητήρες	DPV with an MIP-ITO electrode	92 ng/mL	400 – 1200 ng/mL	-	καλαμπόκι	[229]
	MIP with polypyrrole Au-electrodes	0.27 ng/mL	5 – 800 ng/mL	≥18 min	νερό δικτύου, αγγούρι	[230]
	PAS voltammetry with MIP modified GNPs-PGE	0.19 ng/mL	0.5 – 32 ng/mL	-	νερό, ανθρώπινος ορός αίματος, χρώμα	[231]
	CAM &SWV on MIP Au electrodes	0.2 pg/mL	0.2 – 17 ng/mL	30 min	απιονισμένο νερό	[232]
	Linear sweep voltammetry with MIP(PATP-GNPs)-MOF Au electrodes	0.8 fg/mL	1 fg/mL - 1 ng/mL	≥20 min	νερό δικτύου	[233]

Όσον αφορά το glyphosate η μεγάλη πλειοψηφία των βιοαισθητήρων που έχουν αναφερθεί στη διεθνή βιβλιογραφία είναι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες ή οπτικοί αισθητήρες που χρησιμοποιούν ιχνηθέτες ενώ υπάρχουν δύο μόνο αναφορές για προσδιορισμό του glyphosate με αισθητήρες που δεν χρησιμοποιούν ιχνηθέτες. Στον Πίνακα 14 συνοψίζονται η αρχή ανίχνευσης, ο χρόνος ανάλυσης, το όριο ανίχνευσης και η γραμμική δυναμική περιοχή οπτικών και ηλεκτροχημικών αισθητήρων που έχουν αναφερθεί στην διεθνή βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό του glyphosate.

Όσον αφορά τον προσδιορισμό του glyphosate με οπτικούς αισθητήρες χωρίς τη χρήση ιχνηθετών έχει αναφερθεί η χρήση ενός αισθητήρα SPR στον οποίο χρησιμοποιείται ως βιομόριο αναγνώρισης ένα ολιγοπεπτίδιο που έχει καθοριστεί από βιβλιοθήκη βακτηριοφάγων ότι δεσμεύει ειδικά το glyphosate [181]. Ο αισθητήρας είχε όριο ανίχνευσης σε ρυθμιστικό διάλυμα 98 ng/mL και χαμηλές τιμές διασταυρούμενης αντίδρασης με γλυκίνη, thiacloprid και imidacloprid. Ένας άλλος οπτικός αισθητήρας που δεν χρησιμοποιούσε ιχνηθέτες βασιζόταν σε οπτική ίνα με φράγμα σύζευξης μεγάλης περιόδου (Long Period Grating) ο οποίος είχε επικαλυφθεί με νανοσωματίδια χρυσού τροποποιημένα με κυστεαμίνη [223]. Η αλληλεπίδραση των μορίων του glyphosate με τις θετικά φορτισμένες αμινομάδες της κυστεαμίνης είχαν ως αποτέλεσμα ανιχνεύσιμες μετατοπίσεις του μήκους κύματος των ζωνών του φράγματος σύζευξης μεγάλης περιόδου οδηγώντας σε όριο ανίχνευσης LOD of 3.38 ng/mL. Στους οπτικούς αισθητήρες με χρήση ιχνηθετών που έχουν αναπτυχθεί για το glyphosate περιλαμβάνεται ένας συζευγμένος με πρίσμα κυματοδηγός με μεταλλική επικάλυψη και κενή εσωτερική κοιλότητα στον οποίον ήταν δυνατόν να κυματοδογηθούν κύματα υψηλής ενέργειας με αποτέλεσμα την διέγερση κυματομορφών υπερυψηλής τάξης για πολύ μικρές γωνίες σύζευξης του εισερχόμενου φωτός [224]. Ο αισθητήρας είχε όριο ανίχνευσης 0.24 ng/mL και η μέτρηση διαρκούσε μερικά λεπτά. Ένας άλλος αισθητήρας βασιζόταν σε ένα σύστημα εισαγωγής σε ροή για την on-line παραγωγή και ανοσοχημική ανίχνευση του glyphosate χρησιμοποιώντας ένα σύζευγμα glyphosate-υπεροξειδάσης της ραπανίδος σε συνδυασμό με ένα φθορίζον ενζυμικό υπόστρωμα [210]. Η μέθοδος είχε όριο ανίχνευσης 0.021 ng/mL και

χρόνο ανάλυσης 25 min. Άλλες δύο αναφορές αφορούν την χρήση συζευγμάτων του glyphosate με νανοσωματίδια χρυσού τροποποιημένα με DNA [225] ή φθορίζοντα σωματίδια με μαγνητικό πυρήνα [226] σε ανταγωνιστικού τύπου ανοσοπροσδιορισμούς του glyphosate μέσω της μέτρησης του σήματος φθορισμού των δεσμευμένων στο αντίσωμα σωματιδίων ή τον προσδιορισμό των ελευθέρων μορίων DNA με μετρήσεις απορρόφησης UV. Η πρώτη μέθοδος απαιτούσε την χρήση συνεστιακού μικροσκοπίου φθορισμού. Τα όρια ανίχνευσης που επετεύχθησαν ήταν 0.1 και 0.45 ng/mL, αντίστοιχα, και η διάρκεια της ανάλυσης ήταν 2 ώρες. Επίσης έχει αναφερθεί για τον προσδιορισμό του glyphosate αισθητήρας οπτικής ίνας επικαλυμμένος με μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές (MIP) στο οποίο έχουν ενσωματωθεί ιόντα φθορίζουσας λανθανίδας (Eu^{+3}) παρέχοντας όριο ανίχνευσης 0.009 ng/mL για χρόνο ανάλυσης 20 min [227]. Τέλος έχει αναφερθεί ένας αισθητήρας χημειοφωταύγειας με μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές προσαρμοσμένος σε πλακίδιο ELISA 96 θέσεων που οποίου ο πυθμένας έχει αντικατασταθεί με τροποποιημένο με το μοριακά αποτυπωμένο πολυμερές γυάλινο υπόστρωμα για ανάγνωση του σήματος με συσκευές ανάγνωσης πλακιδίων ELISA [228]. Η μέθοδος παρείχε όριο ανίχνευσης 46 mg/mL το οποίο είναι κατά πολύ υψηλότερο από το όριο που έχει θέσει η ΕΕ για το πόσιμο νερό. Σχετικά με τους άλλους οπτικούς αισθητήρες που δεν χρησιμοποιούν ιχνηθέτες ο αναπτυσσόμενος αισθητήρας είναι τουλάχιστον 300 φορές πιο ευαίσθητος σε σχέση με τον αισθητήρα της βιβλιογραφίας με την μεγαλύτερη ευαισθησία ανίχνευσης και τουλάχιστον 2 φορές πιο ευαίσθητος από τον πιο ευαίσθητο αισθητήρα της βιβλιογραφίας που χρησιμοποιεί ιχνηθέτες. Αναφορικά με τους ηλεκτροχημικούς αισθητήρες που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό του glyphosate, όλοι χρησιμοποιούν ηλεκτρόδια τροποποιημένα με μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή ως μόριο αναγνώρισης. Έτσι, οι Minh Huy Do et al. [233] αναφέρουν την χρήση ενός ηλεκτροδίου χρυσού στο οποίο αναπτύχθηκε μια αυτό-οργανωμένη στοιβάδα (self-assembly monolayer, SAM) p-αμινοθειοφαινόλης πάνω στην οποία εναποτέθηκε με ηλεκτροπολυμερισμό μια 2^η στοιβάδα μοριακά αποτυπωμένης p-αμινοθειοφαινόλης μαζί με νανοσωματίδια χρυσού. Ο αισθητήρας επιτύγχανε όριο ανίχνευσης 8 fg/mL με χρόνο ανάλυσης 20 λεπτά. Σε τρεις άλλες αναφορές

από διαφορετικές ερευνητικές ομάδες [229, 230, 232] εξετάστηκε η δυνατότητα χρήσης του πολύ-πυρρόλιου ως πολυμερές «εκμαγείο» για μοριακή αποτύπωση είτε σε ηλεκτρόδιο γυαλιού-ITO [229] ή σε ηλεκτρόδιο χρυσού [230, 232] ή σε ένα πιεζοηλεκτρικό υπόστρωμα Cr/Au LiTaO₃ [232]. Τα όρια ανίχνευσης ήταν 0.27 ng/mL, 92 ng/mL και 0.2 ng/mL, αντίστοιχα, γεγονός που καθιστά και αισθητήρες λιγότερο ευαίσθητους σε σχέση με τον αναπτυχθέντα αισθητήρα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής και μη κατάλληλους για ανίχνευση του glyphosate σε δείγματα πόσιμου νερού.

Συνοψίζοντας, στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε οπτικός ανοσοαισθητήρας που βασίζεται στην φασματοσκοπία ανάκλασης λευκού φωτός α) για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των ζιζανιοκτόνων paraquat & atrazine και β) για τον προσδιορισμό του ζιζανιοκτόνου glyphosate. Όλοι οι προσδιορισμοί χαρακτηρίζονταν από υψηλή αναλυτική ευαισθησία, η οποία είναι συγκρίσιμη ή και υψηλότερη από αισθητήρες που αναφέρονται την διεθνή βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των στοχευόμενων ζιζανιοκτόνων, είναι κατάλληλος προσδιορισμού αυτών των αναλυτών σε πόσιμο νερό και παρέχει τη δυνατότητα για αναλύσεις πεδίου μέσω της ενσωμάτωσης του σε φορητή συσκευή.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Pesticide/ Plant Protection Product	Φυτοφάρμακο/Φυτοπροστατευτικό Προϊόν
White Light Reflectance Spectrometry	Φασματοσκοπία Ανακλαστικής Συμβουλής Λευκού Φωτός
Surface Plasmon Resonance	Συντονισμός Επιφανειακών πλάσμονίων
Interferometry/ Intereferometer	Συμβολομετρία / Συμβολόμετρο
Refractive Index	Δείκτης Διάθλασης
Reflectance	Διάθλαση
Intereference Spectrum	Φάσμα Συμβολής
Antibody	Αντίσωμα
Antigen	Αντιγόνο
Immunogen	Ανοσογόνο
Immunoglobulin	Ανοσοσφαιρίνη
Protein Conjugate	Πρωτεϊνικό Σύζευγμα
Immunoassay	Ανοσοπροσδιορισμός
Inhibition curve	Καμπύλη αναστολής
Cross Reaction	Διασταυρούμενη αντίδραση
Biosensor	Βιοαισθητήρας
Immunosensor	Ανοσοαισθητήρας
Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
Limit of Quantification	Όριο Ποσοτικοποίησης

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ - ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

BSA	Bovine Serum Albumin	SERS	Surface Enhanced Raman Spectroscopy
OVA	Ovalbumin	GNPs	Gold Nanoparticles
PQ	Paraquat	MIP	Molecular Imprinting Polymers
PQ-VAL	Paraquat-valeric acid	SIA	Sequential Injection Analysis
PQ-CN	Paraquat-cyanuric chloride	AFM	Atomic Force Spectroscopy
ATR	Atrazine	PON/POC	Point-of-Need/Point-of-Care
GLY	Glyphosate	LOD	Limit of Detection
AMPA	Aminomethyl phosphonic acid	LOQ	Limit Of Quantification
Ab	Antibody	IC	Inhibition Concentration
IgY, IgG	Immunoglobulin Y, Immunoglobulin G	CR	Cross Reactivity
APTES	(3-Aminopropyl)triethoxysilane	SD	Standard Deviation
ELISA	Enzyme Liquid Immunosorbent Assay	CV	Coefficient of Variation
PBS	Phosphate Buffer Saline	MRL	Maximum Residue Level
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid.	POPs	Persistent Organic Pollutants
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	IUPAC	International Union of Applied Chemistry
TRIS	tris(hydroxymethyl)aminomethane	ISO	International Organization for Standardization
SDS	Sodium dodecyl sulfate	EPA	Environmental Protection Agency
PMMA	Poly (methyl methacrylate)	FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide	PS I or II	Photosystem I/II
S-NHS	Sulfo N-hydroxysulfosuccinimide		

NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	NMR	Nuclear Magnetic Resonance
ATP	Adenosine triphosphate	WLRS	White Light Reflectance Spectrometry
HRP	Horseradish peroxidase	Rifs	Reflectance Interference Spectroscopy
EPSP	5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase	SPR	Surface Plasmon Resonance
DMF	Dimethylformamide	MZI	Mach-Zender Interferometry
DMSO	Dimethyl sulfoxide	RAIRS	Reflection-Absorption IR Spectroscopy
TMS	Tetramethylsilane		

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Weir, R., *James S. Donnelly, Jr, The Great Irish Potato Famine*, Stroud, Sutton Publishing Limited, 2001. Xii+292. £20.00. 0 7509 2632 5. Rural History, 2002. **13**(2): p. 253-259.
2. Steiman, S. *Hemileia vastatrix*. 2001; Available from: <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/hemileiavastatrix.htm>.
3. A. D. McNaught, A.W., *IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. , 1997, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
4. György Matolcsy, M.N., Viktor Andriská, *Pesticide Chemistry*. Studies in Environmental Science. Vol. 32. 1988: Elsevier.
5. *The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1948*. NobelPrize.org. Nobel Media AB 2019. Sun. 10 Mar 2019. <<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1948/summary/>>, 1948.
6. Troyer, J.R., *In the beginning: the multiple discovery of the first hormone herbicides*. Weed Science, 2001. **49**(2): p. 290-297.
7. Cooper, J. and H. Dobson, *The benefits of pesticides to mankind and the environment*. Crop Protection, 2007. **26**(9): p. 1337-1348.
8. Convention, S.o.t.S. *Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants*. 2001 20/03/2019]; Available from: <http://www.pops.int/>.
9. Matthews, G.A., *Pesticides Health, Safety and the Environment 2nd Edition*2016.
10. Eurostat. *Sales of pesticides in the EU*. 2018; Available from: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Agri-environmental_indicator_-_consumption_of_pesticides.
11. *Compendium of Pesticide Common Names*. 13/03/2019]; Available from: <http://www.alanwood.net/pesticides/>.
12. Tsipi Despoina, B.H., Economou Anastasios, *Mass Spectrometry for the Detection of Pesticide Residues and their Metabolites*. WILEY series on Mass Spectrometry2014.
13. Λόλας, Π.Χ., *Ζιζάνια Αναγνώριση, Μορφολογία, Βιολογία, Κατάταξη, Ζημιές, Ωφέλειες, Διαχείριση*2014: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας.
14. Εμμανουήλ Ι. Ναβροζίδης, Σ.Ε.Κ., *Γεωργικά Φάρμακα και Φυτοπροστασία*2015: Copy City Publish.
15. Βασίλειος Ζιώγας, Α.Μ., *Γεωργική Φαρμακολογία: Βιοχημεία, Φυσιολογία, Μηχανισμοί Δράσης και Χρήσεις Φυτοπροστατευτικών Προϊόντων*2010: Εκτυπωτική Αττικής.
16. Ευθυμία, Μ.-Π., *Γεωργικά Φάρμακα Χημεία, Φαρμακολογία, Τοξικολογία, Οικοτοξικολογία και Στμπεριφορά και Τύχη στο Περιβάλλον*2008: Εκδόσεις Μέθεξις.

17. Edmunds, A.J.F., *Triazine Herbicides*, in *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Agrochemicals*, J.u.D. Clemens Lamberth Editor 2012, Wiley-VCH Verlag & Co.
18. Syngenta. *Atrazine Herbicide*. 2019 [23/03/2019]; Available from: <http://www.atrazine.com/atramain.aspx>.
19. Haley, T.J., *Review of the toxicology of paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium chloride)*. Clin Toxicol, 1979. **14**(1): p. 1-46.
20. *Paraquat Information Center on behalf of Syngenta Crop Protection AG*. 2019 [24/03/2019]; Available from: <https://paraquat.com/en/benefits/benefits-farm>.
21. Gerald M. Dill , R.D.S., Paul C. C. Feng , Frank Kohn , Keith Kretzmer , Akbar Mehrsheikh , Marion Bleeke , Joy L. Honegger , Donna Farmer , Dan Wright , and a.E.A. Hauptfear, *GLYPHOSATE: DISCOVERY, DEVELOPMENT, APPLICATIONS, AND PROPERTIES in Glyphosate Resistance in Crops and Weeds: History, Development, and Management*, V.K. Nandula, Editor 2010.
22. Funke, T., et al., *Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(35): p. 13010-5.
23. Tomlin, C., *The Pesticide Manual*. 9th ed1997: BCPC.
24. Lewis, K.A., et al., *An international database for pesticide risk assessments and management*. Human and Ecological Risk Assessment, 2016. **22**(4): p. 1050-1064.
25. Casida, J.E., *Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action*. Chemical Research in Toxicology, 2009. **22**(4): p. 609-19.
26. Rea, G., et al., *Computational Biology, Protein Engineering, and Biosensor Technology: a Close Cooperation for Herbicides Monitoring*, 2011.
27. Lancaster, C.R. and H. Michel, *Refined crystal structures of reaction centres from Rhodospseudomonas viridis in complexes with the herbicide atrazine and two chiral atrazine derivatives also lead to a new model of the bound carotenoid*. J Mol Biol, 1999. **286**(3): p. 883-98.
28. Dayan, F.E., S.O. Duke, and K. Grossmann, *Herbicides as Probes in Plant Biology*. Weed Science, 2010. **58**(3): p. 340-350.
29. Fuerst, E.P. and M.A. Norman, *Interactions of Herbicides with Photosynthetic Electron-Transport*. Weed Science, 1991. **39**(3): p. 458-464.
30. Nelson L.D., C.M.M., *LEHNINGER PRONCIPLES OF BIOCHEMISTRY*2008.
31. Van Eerd, L.L., et al., *Pesticide metabolism in plants and microorganisms*. Weed Science, 2003. **51**(4): p. 472-495.
32. Gavrilescu, M., *Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation*. Engineering in Life Sciences, 2005. **5**(6): p. 497-526.

33. Kearney, P.C. and T. Roberts, *Pesticide remediation in soils and water*1998, Chichester: John Wiley & Sons Ltd. ix + 381 pp.
34. Farha, W., et al., *An overview on common aspects influencing the dissipation pattern of pesticides: a review*. Environmental Monitoring and Assessment, 2016. **188**(12): p. 693.
35. Sabarwal, A., K. Kumar, and R.P. Singh, *Hazardous effects of chemical pesticides on human health—Cancer and other associated disorders*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2018. **63**: p. 103-114.
36. Kim, K.-H., E. Kabir, and S.A. Jahan, *Exposure to pesticides and the associated human health effects*. Science of The Total Environment, 2017. **575**: p. 525-535.
37. Organization, W.H., *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification*2009
38. Gangemi, S., et al., *Occupational exposure to pesticides as a possible risk factor for the development of chronic diseases in humans (Review)*. Molecular medicine reports, 2016. **14**(5): p. 4475-4488.
39. Ye, M., et al., *Pesticide exposures and respiratory health in general populations*. Journal of Environmental Sciences, 2017. **51**: p. 361-370.
40. Valcke, M., et al., *Human health risk assessment on the consumption of fruits and vegetables containing residual pesticides: A cancer and non-cancer risk/benefit perspective*. Environment International, 2017. **108**: p. 63-74.
41. Needleman, H.L., *The Neurotoxic Properties of Pesticides*, in *International Review of Research in Mental Retardation*2005, Academic Press. p. 225-236.
42. Yuan, X., et al., *Gut microbiota: An underestimated and unintended recipient for pesticide-induced toxicity*. Chemosphere, 2019. **227**: p. 425-434.
43. Sponsler, D.B., et al., *Pesticides and pollinators: A socioecological synthesis*. Science of The Total Environment, 2019. **662**: p. 1012-1027.
44. Cragin, L.A., et al., *Menstrual cycle characteristics and reproductive hormone levels in women exposed to atrazine in drinking water*. Environmental Research, 2011. **111**(8): p. 1293-1301.
45. Hayes, T.B., et al., *Demasculinization and feminization of male gonads by atrazine: Consistent effects across vertebrate classes*. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 2011. **127**(1): p. 64-73.
46. Franco, R., et al., *Molecular mechanisms of pesticide-induced neurotoxicity: Relevance to Parkinson's disease*. Chemico-Biological Interactions, 2010. **188**(2): p. 289-300.

47. Moretto, A. and C. Colosio, *Biochemical and toxicological evidence of neurological effects of pesticides: The example of Parkinson's disease*. *Neurotoxicology*, 2011. **32**(4): p. 383-391.
48. Mesnage, R., B. Bernay, and G.E. Séralini, *Ethoxylated adjuvants of glyphosate-based herbicides are active principles of human cell toxicity*. *Toxicology*, 2013. **313**(2): p. 122-128.
49. Woźniak, E., et al., *The mechanism of DNA damage induced by Roundup 360 PLUS, glyphosate and AMPA in human peripheral blood mononuclear cells - genotoxic risk assesement*. *Food and Chemical Toxicology*, 2018. **120**: p. 510-522.
50. Gasnier, C., et al., *Glyphosate-based herbicides are toxic and endocrine disruptors in human cell lines*. *Toxicology*, 2009. **262**(3): p. 184-91.
51. Thongprakaisang, S., et al., *Glyphosate induces human breast cancer cells growth via estrogen receptors*. *Food Chem Toxicol*, 2013. **59**: p. 129-36.
52. *Monsanto: Τεράστια αποζημίωση σε ζευγάρι με καρκίνο - Η τέταρτη καταδίκη για τη γλυφοσάτη* Πηγή: www.lifo.gr. 2019; Available from: <https://www.lifo.gr/now/world/237247/monsanto-terastia-apozimiosi-se-zeygari-me-karkino-i-tetarti-katadiki-gia-ti-glyfosati?fbclid=IwAR32bogyc7rnp7VAm77FuINlmeEp2erCqDAM58WmGeTzh1--RVnDUPjaBYI>.
53. Myers, J., et al., *Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: A consensus statement*. Vol. 15. 2016.
54. R. Stephenson, G., et al., *Glossary of terms relating to pesticides (IUPAC Recommendations 2006)*. Vol. 78. 2006. 2075-2154.
55. FAO, *Submission and evaluation of pesticide residues data for the estimation of maximum residue levels in food and feed*. FAO Plant Production and Protection Paper 225, 2016.
56. ΟΔΗΓΙΑ 2009/128/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 21ης Οκτωβρίου 2009 σχετικά με την κοινή θέση του Συμβουλίου που αφορά τον καθορισμό πλαισίου κοινοτικής δράσης με σκοπό την επίτευξη ορθολογικής χρήσης των γεωργικών φαρμάκων, 2009.
57. ΟΔΗΓΙΑ 2000/60/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 23ης Οκτωβρίου 2000 για τη θέσπιση πλαισίου κοινοτικής δράσης στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, 2000.
58. ΟΔΗΓΙΑ 2006/118/ΕΚ ΤΟΥ ΕΥΡΩΠΑΪΚΟΥ ΚΟΙΝΟΒΟΥΛΙΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 12ης Δεκεμβρίου 2006 σχετικά με την προστασία των υπόγειων υδάτων από τη ρύπανση και την υποβάθμιση. 2006.
59. ΟΔΗΓΙΑ 98/83/ΕΚ ΤΟΥ ΣΥΜΒΟΥΛΙΟΥ της 3ης Νοεμβρίου 1998 σχετικά με την ποιότητα του νερού ανρώπινης κατανάλωσης, 1998.
60. 2004/248/ΕΚ: Απόφαση της επιτροπής της 10ης Μαρτίου 2004 σχετικά με τη μη καταχώριση της ουσίας atrazine στο παράρτημα I της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου και με την απόσυρση των εγκρίσεων για τα

- φυτοπροστατευτικά προϊόντα που περιέχουν αυτή τη δραστική ουσία, 2004.
61. ΟΔΗΓΙΑ 2003/112/ΕΚ ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 1ης Δεκεμβρίου 2003 για την τροποποίηση της οδηγίας 91/414/ΕΟΚ του Συμβουλίου ώστε να καταχωρισθεί το *paraquat* ως δραστική ουσία, 2003.
 62. COMMISSION, E. *EU Pesticides database*. 2016; Available from: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1669>.
 63. Guyton, K.Z., et al., *Carcinogenicity of tetrachlorvinphos, parathion, malathion, diazinon, and glyphosate*. *Lancet Oncology*, 2015. **16**(5): p. 490-491.
 64. EFSA. *Glyphosate*. Available from: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/glyphosate>.
 65. ΕΚΤΕΛΕΣΤΙΚΟΣ ΚΑΝΟΝΙΣΜΟΣ (ΕΕ) 2017/2324 ΤΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ της 12ης Δεκεμβρίου 2017 για την ανανέωση της έγκρισης της δραστικής ουσίας *glyphosate*, σύμφωνα με τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1107/2009 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου σχετικά με τη διάθεση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά, και την τροποποίηση του παραρτήματος του εκτελεστικού κανονισμού (ΕΕ) αριθ. 540/2011 της Επιτροπής, 2017.
 66. Lopez, B., et al., *Screening of French groundwater for regulated and emerging contaminants*. *Science of The Total Environment*, 2015. **518-519**: p. 562-573.
 67. Montiel-León, J.M., et al., *Quality survey and spatiotemporal variations of atrazine and desethylatrazine in drinking water in Quebec, Canada*. *Science of The Total Environment*, 2019. **671**: p. 578-585.
 68. Montiel-León, J.M., et al., *Widespread occurrence and spatial distribution of glyphosate, atrazine, and neonicotinoids pesticides in the St. Lawrence and tributary rivers*. *Environmental Pollution*, 2019. **250**: p. 29-39.
 69. Geng, Y., et al., *Impact of Long-Term Atrazine Use on Groundwater Safety in Jilin Province, China*. *Journal of Integrative Agriculture*, 2013. **12**(2): p. 305-313.
 70. Glinski, D.A., et al., *Analysis of pesticides in surface water, stem flow, and throughfall in an agricultural area in South Georgia, USA*. *Chemosphere*, 2018. **209**: p. 496-507.
 71. Vryzas, Z., et al., *Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece*. *Water Research*, 2009. **43**(1): p. 1-10.
 72. *Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, SANTE/11813/2017.
 73. *Pesticide Analytical Manual Volume I (PAM) 3rd Edition and Volume II*.

74. He, Z., et al., *Multiresidue analysis of over 200 pesticides in cereals using a QuEChERS and gas chromatography–tandem mass spectrometry-based method*. Food Chemistry, 2015. **169**: p. 372-380.
75. Lee, J., et al., *Simultaneous analysis of 310 pesticide multiresidues using UHPLC-MS/MS in brown rice, orange, and spinach*. Chemosphere, 2018. **207**: p. 519-526.
76. Edmond de Hoffmann, V.S., *Mass Spectrometry: Principles and Applications, 3rd Edition* 2007.
77. Picó, Y., *Advanced Sample Preparation Techniques for MS Analysis*, in *Mass Spectrometry for the Analysis of Pesticide Residues and Their Metabolites*, H.B. Despina Tsipi, Anastasios Economou, Editor 2015.
78. Greulich, K. and L. Alder, *Fast multiresidue screening of 300 pesticides in water for human consumption by LC-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. **391**(1): p. 183-197.
79. T. Arkan, I.M.-P., *The role of derivatization techniques in the analysis of glyphosate and aminomethyl-phosphonic acid by chromatography*. Microchemical Journal, 2015. **121**: p. 99-106.
80. Sun, L., et al., *Determination of glyphosate in soil/sludge by high performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 2017. **1502**: p. 8-13.
81. Valle, A.L., et al., *Glyphosate detection: methods, needs and challenges*. Environmental Chemistry Letters, 2018.
82. Freuze, I., et al., *Influence of complexation phenomena with multivalent cations on the analysis of glyphosate and aminomethyl phosphonic acid in water*. Journal of Chromatography A, 2007. **1175**(2): p. 197-206.
83. Demonte, L.D., et al., *Determination of glyphosate, AMPA and glufosinate in dairy farm water from Argentina using a simplified UHPLC-MS/MS method*. Science of The Total Environment, 2018. **645**: p. 34-43.
84. Mallat, E. and D. Barceló, *Analysis and degradation study of glyphosate and of aminomethylphosphonic acid in natural waters by means of polymeric and ion-exchange solid-phase extraction columns followed by ion chromatography–post-column derivatization with fluorescence detection*. Journal of Chromatography A, 1998. **823**(1): p. 129-136.
85. Dimitrakopoulos, I.K., et al., *Effect of suppressor current intensity on the determination of glyphosate and aminomethylphosphonic acid by suppressed conductivity ion chromatography*. Journal of Chromatography A, 2010. **1217**(22): p. 3619-3627.
86. Qiu, H.-M., et al., *Determination of Phosphite, Phosphate, Glyphosate and Aminomethylphosphonic Acid by Two-Dimensional Ion Chromatography System Coupled with Capillary Ion Chromatography*. Chinese Journal of Analytical Chemistry, 2013. **41**(12): p. 1910-1914.
87. Melton, L.M., M.J. Taylor, and E.E. Flynn, *The utilisation of ion chromatography and tandem mass spectrometry (IC-MS/MS) for the multi-*

- residue simultaneous determination of highly polar anionic pesticides in fruit and vegetables.* Food Chemistry, 2019. **298**: p. 125028.
88. Yoshioka, N., et al., *Rapid determination of glyphosate, glufosinate, bialaphos, and their major metabolites in serum by liquid chromatography–tandem mass spectrometry using hydrophilic interaction chromatography.* Journal of Chromatography A, 2011. **1218**(23): p. 3675-3680.
 89. Chen, M.-X., et al., *Direct determination of glyphosate and its major metabolite, aminomethylphosphonic acid, in fruits and vegetables by mixed-mode hydrophilic interaction/weak anion-exchange liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry.* Journal of Chromatography A, 2013. **1272**: p. 90-99.
 90. Botero-Coy, A.M., et al., *Direct liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination of underivatized glyphosate in rice, maize and soybean.* Journal of Chromatography A, 2013. **1313**: p. 157-165.
 91. Lu, H., et al., *Optimized ultra-performance liquid chromatography tandem high resolution mass spectrometry method for the quantification of paraquat in plasma and urine.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2016. **1027**: p. 96-102.
 92. Gao, L., et al., *Fast determination of paraquat in plasma and urine samples by solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry.* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2014. **944**: p. 136-40.
 93. Posecion, N.C., E.M. Ostrea, and D.M. Bielawski, *Quantitative determination of paraquat in meconium by sodium borohydride-nickel chloride chemical reduction and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS).* J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2008. **862**(1-2): p. 93-9.
 94. Pizzutti, I.R., et al., *Determination of paraquat and diquat: LC-MS method optimization and validation.* Food Chemistry, 2016. **209**: p. 248-55.
 95. Zou, T.T., et al., *Determination of Paraquat in Vegetables Using HPLC-MS-MS.* Journal of Chromatographic Science, 2015. **53**(2): p. 204-209.
 96. Kolberg, D.I., et al., *Development and independent laboratory validation of a simple method for the determination of paraquat and diquat in potato, cereals and pulses.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **404**(8): p. 2465-74.
 97. Muhammad, M., et al., *Spectrofluorimetric Method for Quantification of Triazine Herbicides in Agricultural Matrices.* Analytical Sciences, 2016. **32**(3): p. 313-316.
 98. Yao, F., et al., *Determination of paraquat in water samples using a sensitive fluorescent probe titration method.* Journal of Environmental Sciences, 2013. **25**(6): p. 1245-1251.

99. Jan, M.R., et al., *Glyphosate herbicide residue determination in samples of environmental importance using spectrophotometric method*. Journal of Hazardous Materials, 2009. **169**(1): p. 742-745.
100. Durán, G.M., A.M. Contento, and Á. Ríos, *Use of CdSe/ZnS quantum dots for sensitive detection and quantification of paraquat in water samples*. Analytica Chimica Acta, 2013. **801**: p. 84-90.
101. Guo, J., et al., *Efficient fluorescence resonance energy transfer between oppositely charged CdTe quantum dots and gold nanoparticles for turn-on fluorescence detection of glyphosate*. Talanta, 2014. **125**: p. 385-392.
102. Li, H., J. Liu, and X. Yang, *Facile Synthesis of Glutathione-capped CdS Quantum Dots as a Fluorescence Sensor for Rapid Detection and Quantification of Paraquat*. Analytical Sciences, 2015. **31**(10): p. 1011-1017.
103. Wang, L., et al., *Facile, green and clean one-step synthesis of carbon dots from wool: Application as a sensor for glyphosate detection based on the inner filter effect*. Talanta, 2016. **160**: p. 268-275.
104. Yuan, Y., et al., *Fluorescent carbon dots for glyphosate determination based on fluorescence resonance energy transfer and logic gate operation*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2017. **242**: p. 545-553.
105. Goldsby A. Richard, K.J.T., Osborne A. Barbara, *Immunology - Kuby* 2013: Broken Hill Publishers Ltd.
106. Christopoulos, T.K. and E.P. Diamandis, 3 - *THEORY OF IMMUNOASSAYS*, in *Immunoassay*, E.P. Diamandis and T.K. Christopoulos, Editors. 1996, Academic Press: San Diego. p. 25-50.
107. Abuknesha, R.A. and C. Luk, *Paraquat enzyme-immunoassays in biological samples: assessment of the effects of hapten-protein bridge structures on assay sensitivity*. Analyst, 2005. **130**(6): p. 956-963.
108. Singh, K.V., et al., *Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules*. Bioconjugate Chemistry, 2004. **15**(1): p. 168-173.
109. Goodrow, M.H., R.O. Harrison, and B.D. Hammock, *Hapten synthesis, antibody development, and competitive inhibition enzyme immunoassay for s-triazine herbicides*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1990. **38**(4): p. 990-996.
110. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Plasma insulin concentrations in nondiabetic and early diabetic subjects. Determinations by a new sensitive immunoassay technic*. Diabetes, 1960. **9**: p. 254-60.
111. Yalow, R.S. and S.A. Berson, *Immunoassay of endogenous plasma insulin in man*. J Clin Invest, 1960. **39**: p. 1157-75.
112. Ekins, R.P., *The estimation of thyroxine in human plasma by an electrophoretic technique*. Clinica Chimica Acta, 1960. **5**: p. 453-9.

113. Catt, K. and G.W. Tregear, *Solid-phase radioimmunoassay in antibody-coated tubes*. Science, 1967. **158**(3808): p. 1570-2.
114. Engvall, E. and P. Perlmann, *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G*. Immunochemistry, 1971. **8**(9): p. 871-4.
115. Bowles, M.R., et al., *Quantitation of paraquat in biological samples by radioimmunoassay using a monoclonal antibody*. Fundamental and Applied Toxicology, 1992. **19**(3): p. 375-379.
116. Wang, D., et al., *A Highly Selective and Sensitive Fluorescence Detection Method of Glyphosate Based on an Immune Reaction Strategy of Carbon Dot Labeled Antibody and Antigen Magnetic Beads*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016. **64**(30): p. 6042-6050.
117. Garcia-Febrero, R., et al., *Rapid method based on immunoassay for determination of paraquat residues in wheat, barley and potato*. Food Control, 2014. **41**: p. 193-201.
118. Bruun, L., et al., *New monoclonal antibody for the sensitive detection of hydroxy-s-triazines in water by enzyme-linked immunosorbent assay*. Vol. 423. 2000. 205-213.
119. Clegg, B.S., G.R. Stephenson, and J.C. Hall, *Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Glyphosate*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. **47**(12): p. 5031-5037.
120. Barchanska, H., et al., *Monitoring of atrazine in milk using a rapid tube-based ELISA and validation with HPLC*. Chemosphere, 2012. **87**(11): p. 1330-1334.
121. Selisker, M.Y., et al., *Determination of Paraquat in Fruits and Vegetables By a Magnetic Particle Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995. **43**(2): p. 544-547.
122. Bjarnason, B., et al., *Flow injection enzyme immunoassay of atrazine herbicide in water*. Analytica Chimica Acta, 1997. **347**(1): p. 111-120.
123. Kaur, J., et al., *Immunochemical Dipstick Assay Format Using Gold Nanoparticles Labeled Protein-Hapten Conjugate for the Detection of Atrazine*. Environmental Science & Technology, 2007. **41**(14): p. 5028-5036.
124. ; Available from: <https://www.abraxiskits.com/products/pesticides/>.
125. Algar, E.P.a.W.R., *Toward point-of-care diagnostics with consumer electronic devices: the expanding role of nanoparticles*. RSC Advances, 2015. **5**(28): p. 22256-22282.
126. Ríos, Á., M. Zougagh, and M. Avila, *Miniaturization through lab-on-a-chip: Utopia or reality for routine laboratories? A review*. Analytica Chimica Acta, 2012. **740**: p. 1-11.
127. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book")*. Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific

Publications, Oxford (1997). XML on-line corrected version: <http://goldbook.iupac.org> (2006-) created by M. Nic, J. Jirat, B. Kosata; updates compiled by A. Jenkins.; Available from: <https://goldbook.iupac.org/B00663.html>.

128. Turner, A.P., *Biosensors: sense and sensibility*. Chem Soc Rev, 2013. **42**(8): p. 3184-96.
129. Luong, J.H., K.B. Male, and J.D. Glennon, *Biosensor technology: technology push versus market pull*. Biotechnology Advances, 2008. **26**(5): p. 492-500.
130. Bruijns, B., et al., *Microfluidic Devices for Forensic DNA Analysis: A Review*. Biosensors (Basel), 2016. **6**(3).
131. Hassani, S., et al., *Biosensors and their applications in detection of organophosphorus pesticides in the environment*. Archives of Toxicology, 2017. **91**(1): p. 109-130.
132. Justino, C.I.L., et al., *Recent developments in recognition elements for chemical sensors and biosensors*. Trac-Trends in Analytical Chemistry, 2015. **68**: p. 2-17.
133. Monosik, R., M. Streansky, and E. Surdik, *Biosensors-classification, characterization and new trends*. Vol. 5. 2012. 109-120.
134. Mohanty, S.P. and E. Kougiyanos, *Biosensors: a tutorial review*. IEEE Potentials, 2006. **25**(2): p. 35-40.
135. Thévenot, D.R., et al., *ELECTROCHEMICAL BIOSENSORS: RECOMMENDED DEFINITIONS AND CLASSIFICATION**. Analytical Letters, 2001. **34**(5): p. 635-659.
136. Grieshaber, D., et al., *Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures*. Sensors (Basel), 2008. **8**(3): p. 1400-1458.
137. Prodromidis, M.I., *Impedimetric immunosensors—A review*. Electrochimica Acta, 2010. **55**(14): p. 4227-4233.
138. Ronkainen, N.J., H.B. Halsall, and W.R. Heineman, *Electrochemical biosensors*. Chem Soc Rev, 2010. **39**(5): p. 1747-63.
139. Rhouati, A., M. Majdinasab, and A. Hayat, *A perspective on non-enzymatic electrochemical nanosensors for direct detection of pesticides*. Current Opinion in Electrochemistry, 2018. **11**: p. 12-18.
140. Kokkinos, C., A. Economou, and M.I. Prodromidis, *Electrochemical immunosensors: Critical survey of different architectures and transduction strategies*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **79**: p. 88-105.
141. Mostafa, G., *Electrochemical Biosensors for the Detection of Pesticides*2019.
142. González-Techera, A., et al., *Development of a highly sensitive noncompetitive electrochemical immunosensor for the detection of atrazine by phage anti-immunocomplex assay*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **64**: p. 650-656.

143. Chuc, N.V., et al., *Electrochemical Immunosensor for Detection of Atrazine Based on Polyaniline/Graphene*. Journal of Materials Science & Technology, 2016. **32**(6): p. 539-544.
144. Díaz-González, M., et al., *A microfluidic device for the automated electrical readout of low-density glass-slide microarrays*. Biosensors and Bioelectronics, 2015. **74**: p. 698-704.
145. Deep, A., et al., *Styrene Sulphonic Acid Doped Polyaniline Based Immunosensor for Highly Sensitive Impedimetric Sensing of Atrazine*. Electrochimica Acta, 2014. **146**: p. 301-306.
146. Valera, E., et al., *Coulombimetric immunosensor for paraquat based on electrochemical nanopores*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014. **194**: p. 353-360.
147. Garcia-Febrero, R., et al., *An electrochemical magneto immunosensor (EMIS) for the determination of paraquat residues in potato samples*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(24): p. 7841-7849.
148. Songa, E.A., et al., *Electrochemical detection of glyphosate herbicide using horseradish peroxidase immobilized on sulfonated polymer matrix*. Bioelectrochemistry, 2009. **75**(2): p. 117-123.
149. Oliveira, G.C., et al., *Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring*. Talanta, 2012. **98**: p. 130-136.
150. Vaghela, C., et al., *A novel inhibition based biosensor using urease nanoconjugate entrapped biocomposite membrane for potentiometric glyphosate detection*. International Journal of Biological Macromolecules, 2018. **108**: p. 32-40.
151. Perrot, H., *Piezoelectric Transduction in Chemical Sensors and Biosensors*, R. Lalauze, Editor 2012, Wiley.
152. Bunde, R.L., E.J. Jarvi, and J.J. Rosentreter, *Piezoelectric quartz crystal biosensors*. Talanta, 1998. **46**(6): p. 1223-1236.
153. Lippa, P.B., L.J. Sokoll, and D.W. Chan, *Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry*. Clinica Chimica Acta, 2001. **314**(1): p. 1-26.
154. Pohanka, M., *Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications*. Materials (Basel, Switzerland), 2018. **11**(3): p. 448.
155. Skládal, P., *Piezoelectric biosensors*. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 2016. **79**: p. 127-133.
156. Guilbault, G.G., B. Hock, and R. Schmid, *A piezoelectric immunobiosensor for atrazine in drinking water*. Biosensors and Bioelectronics, 1992. **7**(6): p. 411-419.

157. Gupta, V.K., et al., *Selective QCM sensor based on atrazine imprinted polymer: Its application to wastewater sample*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **218**: p. 215-221.
158. Přebyl, J., et al., *Development of piezoelectric immunosensors for competitive and direct determination of atrazine*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2003. **91**(1): p. 333-341.
159. Yang, J.C., et al., *Lithographically patterned molecularly imprinted polymer for gravimetric detection of trace atrazine*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2015. **216**: p. 476-481.
160. Jia, K., P.-M. Adam, and R.E. Ionescu, *Sequential acoustic detection of atrazine herbicide and carbofuran insecticide using a single microstructured gold quartz crystal microbalance*. Sensors and Actuators B: Chemical, 2013. **188**: p. 400-404.
161. Chen, Q., et al., *Fast determination of antibiotics in whole blood*. Clin Microbiol Infect, 2013. **19**(9): p. 869-74.
162. Ramanathan, K. and B. Danielsson, *Principles and applications of thermal biosensors*. Biosensors & Bioelectronics, 2001. **16**(6): p. 417-23.
163. Yakovleva, M., S. Bhand, and B. Danielsson, *The enzyme thermistor--a realistic biosensor concept. A critical review*. Analytica Chimica Acta, 2013. **766**: p. 1-12.
164. Wang, P. and M.S. Lu, *CMOS Thermal Sensor Arrays for Enzymatic Glucose Detection*. IEEE Sensors Journal, 2011. **11**(12): p. 3469-3475.
165. Fan, X.D., et al., *Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review*. Analytica Chimica Acta, 2008. **620**(1-2): p. 8-26.
166. Gauglitz, G., *Direct optical detection in bioanalysis: an update*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **398**(6): p. 2363-2372.
167. Prasad, P.N., *INTRODUCTION TO BIOPHOTONICS* 2003: A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION.
168. George P. Anderson, C.R.T., *EVANESCENT WAVE FIBER OPTIC BIOSENSORS*, in *Optical Biosensors: Today and Tomorrow 2nd Edition*, C.R.T. Frances S. Ligler, Editor 2008, Elsevier B.V.
169. Μαστιχιάδης, Χ., *Development and evaluation of an optical capillary fluoroimmunosensor for the simultaneous determination of analytes in the same sample*, in *Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Χημείας* 2003, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (ΕΚΠΑ).
170. Mastichiadis, C., et al., *Simultaneous determination of pesticides using a four-band disposable optical capillary immunosensor*. Analytical Chemistry, 2002. **74**(23): p. 6064-6072.
171. Biran, I., X. Yu, and D.R. Walt, *Chapter 1 - OPTRODE-BASED FIBER OPTIC BIOSENSORS (BIO-OPTRODE)*, in *Optical Biosensors (Second Edition)*, F.S. Ligler and C.R. Taitt, Editors. 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 3-82.

172. Sabban, S., *Development of an in vitro model system for studying the interaction of Equus caballus IgE with its high-affinity Fc receptor*, in *Department of Molecular Biology and Biotechnology 2011*, The University of Sheffield.
173. Chegel, V.I., et al., *Surface plasmon resonance sensor for pesticide detection*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 1998. **48**(1-3): p. 456-460.
174. Shimomura, M., et al., *Simple and rapid detection method using surface plasmon resonance for dioxins, polychlorinated biphenylx and atrazine*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **434**(2): p. 223-230.
175. Dostálek, J. and J. Homola, *Surface plasmon resonance sensor based on an array of diffraction gratings for highly parallelized observation of biomolecular interactions*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2008. **129**(1): p. 303-310.
176. Agrawal, H., A.M. Shrivastav, and B.D. Gupta, *Surface plasmon resonance based optical fiber sensor for atrazine detection using molecular imprinting technique*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2016. **227**: p. 204-211.
177. Farre, M., et al., *Part per trillion determination of atrazine in natural water samples by a surface plasmon resonance immunosensor*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007. **388**(1): p. 207-214.
178. Yilmaz, E., et al., *Plastic antibody based surface plasmon resonance nanosensors for selective atrazine detection*. *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, 2017. **73**: p. 603-610.
179. Saylan, Y., et al., *Development of surface plasmon resonance sensors based on molecularly imprinted nanofilms for sensitive and selective detection of pesticides*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017. **241**: p. 446-454.
180. Yamaguchi, H. and A. Harada, *Supramolecular formation of antibodies with viologen dimers: utilization for amplification of methyl viologen detection signals in surface plasmon resonance sensor*. *Biomacromolecules*, 2002. **3**(6): p. 1163-9.
181. Ding, X.K. and K.L. Yang, *Development of an Oligopeptide Functionalized Surface Plasmon Resonance Biosensor for Online Detection of Glyphosate*. *Analytical Chemistry*, 2013. **85**(12): p. 5727-5733.
182. Petrou, P., et al., *Chapter 10 - Interferometry-Based Immunoassays*, in *Handbook of Immunoassay Technologies*, S.K. Vashist and J.H.T. Luong, Editors. 2018, Academic Press. p. 241-271.
183. Makarona, E., et al., *Point-of-Need bioanalytics based on planar optical interferometry*. *Biotechnology Advances*, 2016. **34**(3): p. 209-33.
184. Misiakos, K., et al., *All-silicon monolithic Mach-Zehnder interferometer as a refractive index and biochemical sensor*. *Optics Express*, 2014. **22**(22): p. 26803-26813.

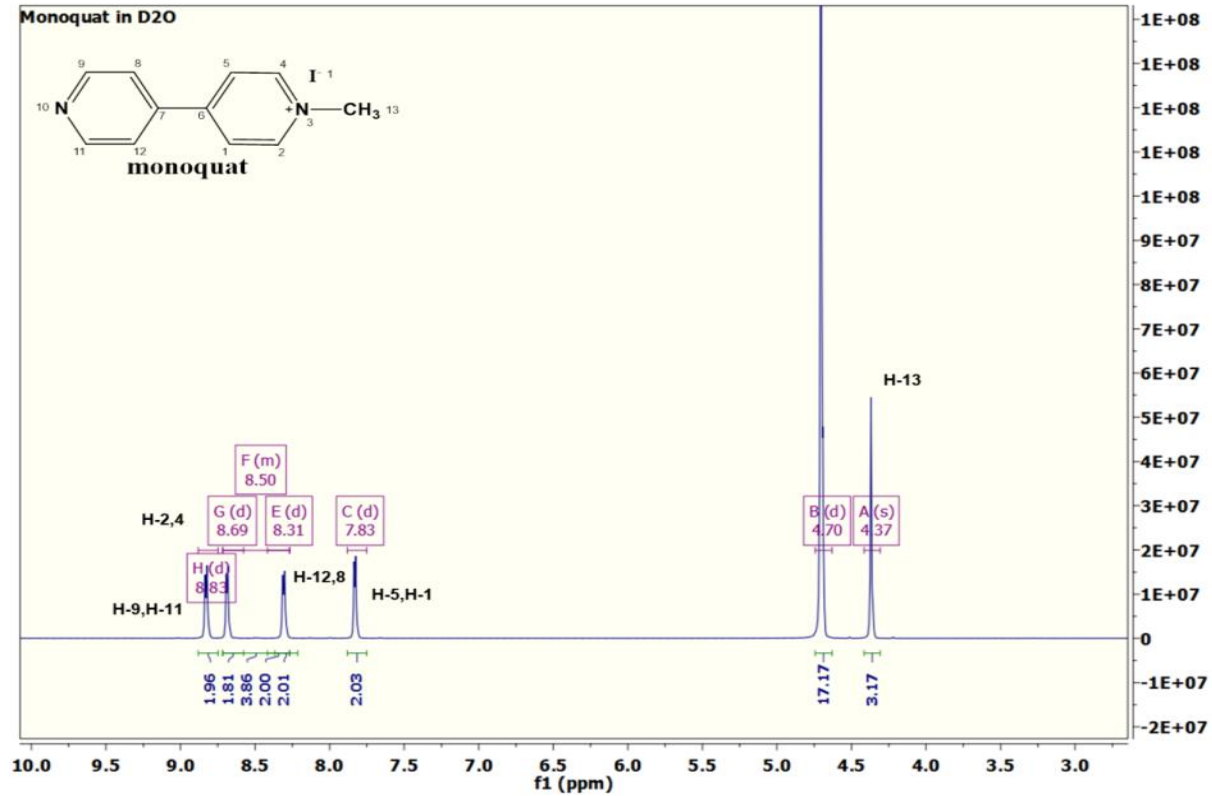
185. Misiakos, K., et al., *Broad-band Mach-Zehnder interferometers as high performance refractive index sensors: Theory and monolithic implementation*. Optics Express, 2014. **22**(8): p. 8856-8870.
186. Makarona, E., et al., *Broadband Young interferometry for simultaneous dual polarization bioanalytics*. Journal of the Optical Society of America B: Optical Physics, 2017. **34**(8): p. 1691-1698.
187. Pagkali, V., et al., *Simultaneous determination of aflatoxin B 1 , fumonisin B 1 and deoxynivalenol in beer samples with a label-free monolithically integrated optoelectronic biosensor*. Journal of Hazardous Materials, 2018. **359**: p. 445-453.
188. Angelopoulou, M., et al., *Ultrafast Multiplexed-Allergen Detection through Advanced Fluidic Design and Monolithic Interferometric Silicon Chips*. Analytical Chemistry, 2018. **90**(15): p. 9559-9567.
189. Psarouli, A., et al., *Fast label-free detection of C-reactive protein using broad-band Mach-Zehnder interferometers integrated on silicon chips*. Talanta, 2017. **165**: p. 458-465.
190. Ewald, M., et al., *A robust sensor platform for label-free detection of anti-Salmonella antibodies using undiluted animal sera*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2013. **405**(20): p. 6461-6469.
191. Gauglitz, G. and W. Nahm, *Observation of spectral interferences for the determination of volume and surface effects of thin films*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1991. **341**(3): p. 279-283.
192. Lang, G., A. Brecht, and G. Gauglitz, *Low molecular weight analytes in water by spectral interferometry using a competitive immunoassay*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1994. **348**(8): p. 602-605.
193. Brecht, A., G. Lang, and G. Gauglitz, *Wavelength dependencies in interferometric measurements of thin protein films*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1993. **346**(6): p. 615-617.
194. Rothmund, M., et al., *Label free binding assay with spectroscopic detection for pharmaceutical screening*. Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 1997. **359**(1): p. 15-22.
195. Gauglitz, G., *Multiple reflectance interference spectroscopy measurements made in parallel for binding studies*. Review of Scientific Instruments, 2005. **76**(6): p. 062224.
196. Schwartz, M.P., S.D. Alvarez, and M.J. Sailor, *Porous SiO₂ Interferometric Biosensor for Quantitative Determination of Protein Interactions: Binding of Protein A to Immunoglobulins Derived from Different Species*. Analytical Chemistry, 2007. **79**(1): p. 327-334.
197. Tsang, C.K., et al., *Highly Stable Porous Silicon–Carbon Composites as Label-Free Optical Biosensors*. Acs Nano, 2012. **6**(12): p. 10546-10554.
198. Mun, K.-S., et al., *A Stable, Label-free Optical Interferometric Biosensor Based on TiO₂ Nanotube Arrays*. Acs Nano, 2010. **4**(4): p. 2070-2076.

199. Raptis, I.G., D.; Kakabakos, S.; Petrou, P.; Misiakos, K., *OPTICAL SENSOR BASED ON THREE-DIMENSIONAL MICROPATTERNED LAYER OF A TRANSPARENT MATERIAL FOR THE SIMULTANEOUS LABEL-FREE MONITORING OF MULTIPLE (BIO)REACTIONS WITH WHITE LIGHT REFLECTANCE SPECTROSCOPY*.
200. Koukouvinos, G., et al., *Development and Bioanalytical Applications of a White Light Reflectance Spectroscopy Label-Free Sensing Platform*. *Biosensors*, 2017. **7**(4): p. 46.
201. Kitsara, M., et al., *Biomolecular layer thickness evaluation using White Light Reflectance Spectroscopy*. *Microelectronic Engineering*, 2010. **87**(5): p. 802-805.
202. Koukouvinos, G., et al., *A label-free flow-through immunosensor for determination of total- and free-PSA in human serum samples based on white-light reflectance spectroscopy*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2015. **209**: p. 1041-1048.
203. Voros, J., *The density and refractive index of adsorbing protein layers*. *Biophysical Journal*, 2004. **87**(1): p. 553-61.
204. ThetaMetrisis. *Technology White Light Reflectance Spectroscopy*. 2018; Available from: <https://www.thetametrisis.com/technology/wlrs>.
205. Petrou, P.S., et al., *Real-time label-free detection of complement activation products in human serum by white light reflectance spectroscopy*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2009. **24**(11): p. 3359-3364.
206. Koukouvinos, G., et al., *White light reflectance spectroscopy biosensing system for fast quantitative prostate specific antigen determination in forensic samples*. *Talanta*, 2017. **175**: p. 443-450.
207. Tsounidi, D., et al., *Rapid and sensitive label-free determination of aflatoxin M1 levels in milk through a White Light Reflectance Spectroscopy immunosensor*. Vol. 282. 2018.
208. Koukouvinos, G., et al., *Simultaneous determination of CRP and D-dimer in human blood plasma samples with White Light Reflectance Spectroscopy*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016. **84**: p. 89-96.
209. Lee, E.A., et al., *Linker-assisted immunoassay and liquid chromatography/mass spectrometry for the analysis of glyphosate*. *Analytical Chemistry*, 2002. **74**(19): p. 4937-43.
210. Gonzalez-Martinez, M.A., et al., *Glyphosate immunosensor. Application for water and soil analysis*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(13): p. 4219-27.
211. Minunni, M. and M. Mascini, *Detection of Pesticide in Drinking-Water Using Real-Time Biospecific Interaction Analysis (Bia)*. *Analytical Letters*, 1993. **26**(7): p. 1441-1460.
212. Brecht, A., et al., *A Direct Optical Immunosensor for Atrazine Detection*. *Analytica Chimica Acta*, 1995. **311**(3): p. 289-299.

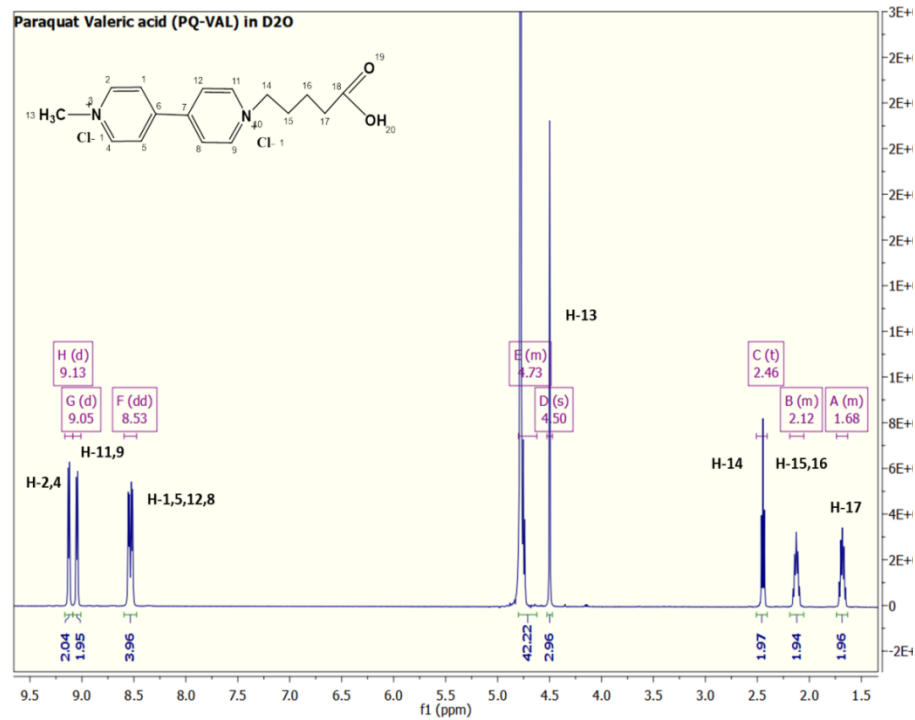
213. Schipper, E.F., et al., *New detection method for atrazine pesticides with the optical waveguide Mach-Zehnder immunosensor*. *Analytica Chimica Acta*, 1997. **341**(2-3): p. 171-176.
214. Schipper, E.F., et al., *The waveguide Mach-Zehnder interferometer as atrazine sensor*. *Analytical Chemistry*, 1998. **70**(6): p. 1192-1197.
215. Skladal, P., A.P. Deng, and V. Kolar, *Resonant mirror-based optical immunosensor: application for the measurement of atrazine in soil*. *Analytica Chimica Acta*, 1999. **399**(1-2): p. 29-36.
216. Cummins, C.M., et al., *Application of europium(III) chelate-dyed nanoparticle labels in a competitive atrazine fluoroimmunoassay on an ITO waveguide*. *Biosens Bioelectron*, 2006. **21**(7): p. 1077-85.
217. Stavra, E., et al., *Simultaneous determination of paraquat and atrazine in water samples with a white light reflectance spectroscopy biosensor*. *Journal of Hazardous Materials*, 2018. **359**: p. 67-75.
218. Salmain, M., N. Fischer-Durand, and C.M. Pradier, *Infrared optical immunosensor: application to the measurement of the herbicide atrazine*. *Anal Biochem*, 2008. **373**(1): p. 61-70.
219. Mallat, E., et al., *Fast determination of paraquat residues in water by an optical immunosensor and validation using capillary electrophoresis-ultraviolet detection*. *Analytica Chimica Acta*, 2001. **427**(2): p. 165-171.
220. Gao, R., et al., *Highly sensitive trace analysis of paraquat using a surface-enhanced Raman scattering microdroplet sensor*. *Anal Chim Acta*, 2010. **681**(1-2): p. 87-91.
221. Fang, H., et al., *Ultrasensitive and quantitative detection of paraquat on fruits skins via surface-enhanced Raman spectroscopy*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2015. **213**: p. 452-456.
222. Wang, C.G., et al., *Hotspots engineering by grafting Au@Ag core-shell nanoparticles on the Au film over slightly etched nanoparticles substrate for on-site paraquat sensing*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016. **86**: p. 944-950.
223. Heidemann, B.R., et al., *Functionalized Long Period Grating—Plasmonic Fiber Sensor Applied to the Detection of Glyphosate in Water*. *Journal of Lightwave Technology*, 2018. **36**(4): p. 863-870.
224. Dai, H.L., et al., *Determination of trace glyphosate in water with a prism coupling optical waveguide configuration*. *Sensors and Actuators a-Physical*, 2014. **218**: p. 88-93.
225. Lee, H.U., et al., *Quantitative detection of glyphosate by simultaneous analysis of UV spectroscopy and fluorescence using DNA-labeled gold nanoparticles*. *J Agric Food Chem*, 2010. **58**(23): p. 12096-100.
226. Lee, H.U., et al., *Detection of glyphosate by quantitative analysis of fluorescence and single DNA using DNA-labeled fluorescent magnetic core-shell nanoparticles*. *Sensors and Actuators B-Chemical*, 2013. **177**: p. 879-886.

227. Jenkins, A.L., R. Yin, and J.L. Jensen, *Molecularly imprinted polymer sensors for pesticide and insecticide detection in water*. *Analyst*, 2001. **126**(6): p. 798-802.
228. Zhao, P., et al., *Determination of glyphosate in foodstuff by one novel chemiluminescence-molecular imprinting sensor*. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, 2011. **78**(5): p. 1482-6.
229. Xu, J., et al., *A molecularly imprinted polypyrrole for ultrasensitive voltammetric determination of glyphosate*. *Microchimica Acta*, 2017. **184**(7): p. 1959-1967.
230. Zhang, C., et al., *A highly selective electrochemical sensor based on molecularly imprinted polypyrrole-modified gold electrode for the determination of glyphosate in cucumber and tap water*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2017. **409**(30): p. 7133-7144.
231. Prasad, B.B., D. Jauhari, and M.P. Tiwari, *Doubly imprinted polymer nanofilm-modified electrochemical sensor for ultra-trace simultaneous analysis of glyphosate and glufosinate*. *Biosensors & Bioelectronics*, 2014. **59**: p. 81-8.
232. Mazouz, Z., et al., *Highly Selective Polypyrrole MIP-Based Gravimetric and Electrochemical Sensors for Picomolar Detection of Glyphosate*. *Sensors (Basel)*, 2017. **17**(11).
233. Do, M.H., et al., *Molecularly imprinted polymer-based electrochemical sensor for the sensitive detection of glyphosate herbicide*. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2015. **95**(15): p. 1489-1501.

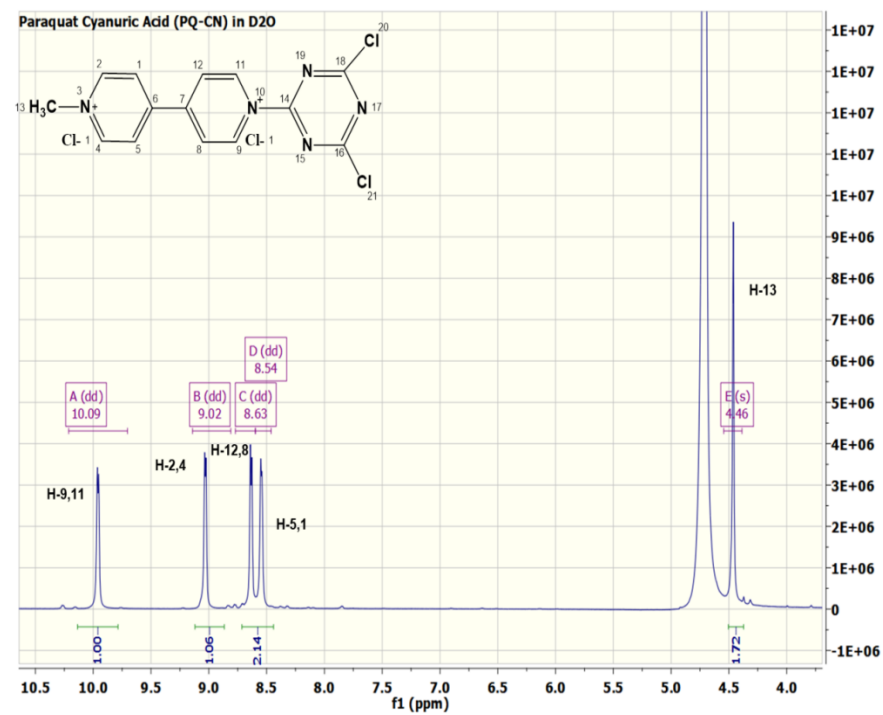
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



Σχήμα Ι 1: Φάσμα ¹H NMR (500 MHz, D₂O) της πρόδρομης ένωσης monoquat δ 8.83 (d, J = 6.5 Hz, 2H), 8.69 (d, J = 6.1 Hz, 2H), 8.31 (d, J = 6.4 Hz, 2H), 7.83 (d, J = 4.8 Hz, 2H), 4.37 (s, 3H).



Σχήμα Ι 2: Φάσμα 1H-NMR (500 MHz, D₂O) του παραγώγου του paraquat με βαλερικό οξύ, δ 9.13 (d, J = 6.7 Hz), 9.05 (d, J = 6.6 Hz), 8.53 (dd, J = 14.9, 6.5 Hz), 4.50 (s), 2.46 (t), 2.19 – 2.05 (m), 1.74 – 1.63 (m, J = 15.1, 7.4 Hz).



Σχήμα Ι 3: Φάσμα 1H NMR (500 MHz, D₂O) του παραγώγου του paraquat με κυανουρικό χλωρίδιο, δ 9.95 (d, J=7.5 H₂), 9.02 (d, J=7.1 H₂), 8.63 (d, J= 7.5 H₂), 8.54 (d, J=7.1 H₂), 4.46 (s, H₃).