

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

Αναγνωστόπουλος Χρήστος<sup>1/2</sup>

<sup>1</sup>Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο, Τμήμα Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων & Φυτ/κης,  
Εργ. Υπολειμμάτων Γεωργικών Φαρμάκων

<sup>2</sup>Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Γενικό Τμήμα, Τομέας Χημικών και Φυσικών  
Επιστημών

e-mail: c.anagnostopoulos@bpi.gr

## Περίληψη

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

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

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

Η υλοποίηση του πρώτου στόχου αναφέρεται στην ανάπτυξη νέων μεθόδων οι οποίες είναι απλές (απλή διαδικασία εκχύλισης χωρίς πολύπλοκο εξοπλισμό), σύντομες (κατάλληλες για ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε μικρό χρονικό διάστημα), οικονομικές (μικρή κατανάλωση αναλωσίμων ανά δείγμα), πολυδύναμες (κατάλληλη για ανάλυση ξενοβιοτικών ουσιών διαφορετικών χημικών κατηγοριών), ευαίσθητες (δυνατότητα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σε επίπεδα συγκέντρωσης λίγων μg/kg) και προπάντων αξιόπιστες, ώστε να πληρούνται οι απαιτήσεις περί διαχείρισης της αβεβαιότητας των μετρήσεων που έχει θεσπίσει η Ε.Ε. Οι αναπτυχθείσες μέθοδοι χρησιμοποιήθηκαν για την υλοποίηση του δεύτερου στόχου μέσω του προσδιορισμού των επιπέδων των ξενοβιοτικών ουσιών σε δείγματα τροφίμων για βρέφη-παιδιά μικρής ηλικίας και ζωοτροφών.

*Λέξεις-Κλειδιά: παιδικές τροφές, επικύρωση, ξενοβιοτικές, χρωματογραφία, φασματομετρία μάζα*

## Abstract

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

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

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

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

*Keywords: baby foods, validation, xenobiotic, chromatography, mass spectrometry*

## 1. Εισαγωγή

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

Τα εργαστήρια ανάλυσης τροφίμων αποτελούν τα «μάτια» του όλου συστήματος παρακολούθησης για την ανίχνευση των επιβλαβών για τον άνθρωπο ξеноβιοτικών ουσιών και τον προσδιορισμό της πιθανής τους παρουσίας, σε όλα τα στάδια της παραγωγικής διαδικασίας από το χωράφι στο πιάτο. Η πρόκληση που έχουν να αντιμετωπίσουν είναι μεγάλη και πολύ ενδιαφέρουσα ερευνητικά, αφού καλούνται να προσδιορίζουν -σε μια μεγάλη γκάμα τροφίμων- αξιόπιστα την ταυτότητα και ποσότητα ενός συνεχώς αυξανόμενου αριθμού ουσιών, σε επίπεδα συγκέντρωσης λίγων mg/kg ή mg/g. Οι σχετικές αναλύσεις πρέπει να διενεργούνται με γνώμονα τις ισχύουσες

νομοθεσίες περί τροφίμων, να είναι οικονομικές, ταχείες και να παρέχουν τη δυνατότητα επεξεργασίας ενός μεγάλου αριθμού δειγμάτων. Παράλληλα θα πρέπει να εφαρμόζουν τις νομοθετικές και επιστημονικές απαιτήσεις περί διαχείρισης της αβεβαιότητας των μετρήσεων, ώστε οι εκτιμήσεις που πραγματοποιούνται με βάση τα αποτελέσματα τους να είναι αξιόπιστες.

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

## **2. Μεθοδολογία**

### **2.1 Ανάπτυξη – Επικύρωση μεθόδων**

Για την απομόνωση των αναλυτών από το τρόφιμο, γρήγορες, αξιόπιστες και οικονομικές μέθοδοι υιοθετήθηκαν με έμφαση στην πολυδύναμη μέθοδο επεξεργασίας δειγμάτων φυτικών προϊόντων QuEChERS και τροποποιήσεις αυτής ανάλογα με τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών-στόχων. Ειδικότερα η εκχύλιση των μυκοτοξινών πραγματοποιήθηκε με δ/τη οξινομένη μεθανόλη (1% HCOOH) και χωρίς κανένα στάδιο καθαρισμού του τελικού εκχυλίσματος.

Η αξιοπιστία και καταλληλότητα μιας όλων των αναλυτικών μεθόδων που αναπτύχθηκαν εξασφαλίστηκε μέσω της διαδικασίας της επικύρωσης. Η πλήρης επικύρωση μιας μεθόδου πραγματοποιήθηκε αξιολογώντας την ορθότητα, πιστότητα, αβεβαιότητα, ευαισθησία, ανθεκτικότητα και εξειδίκευσή της. Λόγω της χρήσης μεθόδων επεξεργασίας δείγματος με περιορισμένο ή απουσία σταδίου καθαρισμού, η εκτίμηση της μήτρας στην τελική μέτρηση εκτιμήθηκε. Επιπρόσθετα, οι αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού υπολειμμάτων αξιολογήθηκαν μέσω διεργασηριακών δοκιμών ικανότητας οι οποίες διοργανώθηκαν από τα Κοινοτικά Εργαστήρια αναφοράς της E.E.

### **2.2 Οργανολογία**

Για την ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών, χρησιμοποιήθηκε μια σειρά αναλυτικών συστημάτων ως εξής:

Δύο συστήματα αέριας χρωματογραφίας Agilent 6890, με το κάθε ένα να αποτελείται από τα ακόλουθα: *Σύστημα Α:* Δυο εγχυτές σε λειτουργία μη διαμερισμού δείγματος (splitless), μια στήλη τύπου DB-5-MS (30 m. 0.32mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με τον ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) και μια στήλη τύπου DB-17 MS (30 m. 0.3mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με τον ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD). *Σύστημα Β:* Δυο εγχυτές σε λειτουργία μη διαμερισμού δείγματος (splitless), μια στήλη τύπου DB-5-MS (30 m. 0.32mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με τον ανιχνευτή αζώτου-φωσφόρου (NPD) και μια στήλη τύπου DB-17 MS (30 m. 0.3mm i.d. and 0.25 μm film thickness) η οποία συνδέεται με τον ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD).

Αέριος χρωματογράφος Varian CP3800, με εγχυτή μεγάλου όγκου προγραμματιζόμενης θερμοκρασίας εξαέρωσης (large volume, programmed temperature vaporization PTV), συζευγμένος με φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου Varian 1200L. Για την ανάλυση με GC-MS/MS χρησιμοποιήθηκε τριχοειδής στήλη Varian Factor Four VF-5 MS (30m×0.25mm I.D.×0.25μm film thickness) με προσθήκη cyanophenyl-methyl deactivated (5m×0.53mm I.D). Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα του εγχυτή PTV ήταν από 90°C (0,75 min), με 200°C /min στους 280°C. Το θερμοκρασιακό πρόγραμμα έκλουσης ήταν 70°C (2 min), με 30°C /min στους 180°C, με 1,8°C/min στους 230°C και με 30°C /min στους 280°C (30 min). Η τεχνική ιονισμού ήταν πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (EI<sup>+</sup>, electron impact), η θερμοκρασία του διασυνδετή 280°C και της πηγής ιόντων 250°C.

Σύστημα υγρής χρωματογραφίας Varian αποτελούμενο από δύο αντλίες Varian Prostar 210, αυτόματο δειγματολήπτη Prostar 410, απαερωτή κενού και φούρνο στηλών, συζευγμένο επίσης με φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου Varian 1200L. Στο LC-MS/MS η στήλη ήταν Waters Atlantis dC-18, 150 x 2.1 mm, 3μm μέγεθος σωματιδίων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 25 ± 4°C. Για την κινητή φάση, ο διαλύτης A ήταν μίγμα μεθανόλης νερού (10:90) με 1 mM HCOONH<sub>4</sub> και ο διαλύτης B μεθανόλη – νερό (90:10) με 1mM HCOONH<sub>4</sub>. Ο ιονισμός των ουσιών ήταν με πηγή ηλεκτροδιάχυσης (ESI, electrospray ionization).

Υγρός χρωματογράφος με σύστημα αντλίας δυο καναλιών (Agilent 1200), σύστημα απαέρωσης κινητών φάσεων (G1379B), αυτόματο δειγματολήπτη 100 θέσεων ελεγχόμενης θερμοκρασίας (Hip/ALS G1367A) και θάλαμο στήλης ελεγχόμενης θερμοκρασίας (TCC G1316A) συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας τριπλού τετραπόλου (Agilent Triple Quad 6410). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2 1mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 25 ± 4°C. Ως διαλύτης έκλουσης A χρησιμοποιήθηκε 5mM HCOONH<sub>4</sub>, 0,1%HCOOH και 0.02% ακετονιτρίλιο σε νερό και ως διαλύτης έκλουσης B 5mM HCOONH<sub>4</sub>, 0,1%HCOOH σε μεθανόλη. Για τον έλεγχο του συστήματος και την συλλογή των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Agilent Mass Hunter data acquisition Triple Quad B.01.04 και για την επεξεργασία τους το λογισμικό Agilent MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.01.04.

Υγρός χρωματογράφος με σύστημα αντλίας δυο καναλιών (Agilent 1200), σύστημα απαέρωσης κινητών φάσεων, αυτόματο δειγματολήπτη 100 θέσεων ελεγχόμενης θερμοκρασίας (G1330B) και θάλαμο στήλης ελεγχόμενης θερμοκρασίας συνδεδεμένο με φασματόμετρο μάζας χρόνου πτήσης ιόντων (Agilent 6220). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με στήλη Polaris C-18, μήκους 5cm, εσωτερικής διαμέτρου 2 1mm και μεγέθους σωματιδίων 5μm σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 25 ± 4°C. Ως διαλύτης έκλουσης A χρησιμοποιήθηκε 5mM HCOONH<sub>4</sub>, 0,1%HCOOH και 0.02% ακετονιτρίλιο σε νερό και ως διαλύτης έκλουσης B 5mM HCOONH<sub>4</sub>, 0,1%HCOOH σε μεθανόλη. Για τον έλεγχο του συστήματος, την συλλογή των δεδομένων και την επεξεργασία τους χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό MassHunter Workstation Qualitative Analysis B.02.00.

### **3. Συμπεράσματα – Πρόταση**

#### **3.1. Επικύρωση της μεθόδου QuEChERS τον προσδιορισμό 25 φυτοπροστατευτικών ουσιών και μεταβολιτών τους σε παιδικές τροφές με την τεχνική της αέριας χρωματογραφίας**

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

Ως μειονεκτήματα της μεθόδου θα πρέπει να αναφερθεί η αδυναμία προσδιορισμού των αναλυτών omethoate, fensulfothion-oxon και terdufos sulfoxide στα 3 µg/kg, με αποτέλεσμα την ανάγκη χρήσης εναλλακτικής τεχνικής για τον προσδιορισμό τους. Η χρήση μόνο αέριας χρωματογραφίας με δυο διαφορετικής πολικότητας στήλες και δυο διαφορετικής εκλεκτικότητας ανιχνευτές, σε σχέση με πιο δαπανηρά συστήματα ενόργανης ανάλυσης (π.χ. LC-MSMS), μειώνει το κόστος της ανάλυσης και αποδεικνύει ότι οι χημικές αναλύσεις που αφορούν την ασφάλεια μιας τόσο ευαίσθητης ομάδας τροφίμων –με τα αυστηρότερα όρια στην Ε.Ε. – μπορεί να πραγματοποιηθεί από μια μεγάλη ομάδα εργαστηρίων χωρίς πολυδάπανο εξοπλισμό. Παρότι τα όρια αναφέρονται σε τελικό προϊόν που προορίζεται για κατανάλωση, η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για τον έλεγχο των υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε πρώτες ύλες με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά (π.χ. δημητριακά) οι οποίες προορίζονται για την παρασκευή παιδικών τροφών (Anagnostopoulos et al. 2010).

#### **3.2. Επικύρωση Δύο παραλλαγών της μεθόδου QuEChERS για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών φυτοπροστατευτικών προϊόντων και μεταβολιτών τους σε παιδικές τροφές με την χρήση υγρής χρωματογραφίας σε συνδυασμό με συζευγμένη φασματομετρία μαζών**

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

χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων αγοράς στα οποία ανιχνεύτηκε η παρουσία υπολειμμάτων. Από τα 61 αναλυθέντα δείγματα παιδικών τροφών τα 2 βρέθηκαν θετικά στην παρουσία υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων pirimicarb και fenpropomorh, όμως σε συγκεντρώσεις κάτω του LOQ της μεθόδου (Anagnostopoulos et al. 2012).

### **3.3. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων σε δείγματα ζωοτροφών και γάλακτος από διάφορα μέρη της Ελλάδας**

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

Συνολικά, στα πλαίσια της διατριβής αναλύθηκαν σαρανταέξι δείγματα ζωοτροφών και τριαντατέσσερα δείγματα γάλακτος αιγοπροβάτων. Ένα σημαντικό ποσοστό τους βρέθηκε θετικό σε παρουσία υπολειμμάτων των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, με ιδιαίτερα έντονη την παρουσία υψηλών επιπέδων συγκεντρώσεων του endosulfan, ενός αρκετά τοξικού μορίου που είναι απαγορευμένο σε Ευρώπη, Αμερική και άλλες χώρες. Η παρουσία του δεν επιβεβαιώθηκε στα δείγματα γάλακτος των αιγοπροβάτων που είχαν διατραφεί με τις τροφές αυτές (Tsiplakou et al. 2010).

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

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

αναλύθηκαν εικοσιτέσσερα δείγματα αγοράς ζωικών προϊόντων και σε κανένα από αυτά δεν διαπιστώθηκε η παρουσία υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων πάνω από το όριο ανίχνευσης της μεθόδου (Anagnostopoulos et al. 2014).

### **3.5. Ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών ομάδων φυτορμονών σε φυτικά προϊόντα με την χρήση LC-MS/MS**

Ο τομέας της ανάλυσης των φυτορμονών απαιτεί μεθόδους απλές, πολυδύναμες και οικονομικές. Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια νέα μέθοδος η οποία είναι απλή (σύντομη διαδικασία εκχύλισης χωρίς πολύπλοκο εξοπλισμό), οικονομική (μικρή κατανάλωση αναλωσίμων ανά δείγμα), πολυδύναμη (κατάλληλη για ανάλυση φυτορμονών διαφορετικών χημικών κατηγοριών) και ευαίσθητη, πληρώντας παράλληλα τα όρια που έχει θεσπίσει η Ε.Ε για την παρουσία των φυτορμονών στα τρόφιμα. Η ταυτοποίηση των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με την τεχνική LC-MS/MS η οποία εξασφαλίζει χαμηλά όρια ανίχνευσης σε πολύπλοκα υποστρώματα και την αξιόπιστη ποσοτικοποίηση τους. Επιπρόσθετα η χρησιμοποίηση του LC-TOF/MS ως τεχνικής σάρωσης εξασφάλισε την αξιόπιστη ταυτοποίηση των αναλυτών σε άγνωστα δείγματα. Η μέθοδος επικυρώθηκε με επιτυχία και χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση δειγμάτων αγοράς στα οποία ανιχνεύτηκε η παρουσία υπολειμμάτων φυτορμονών. Από τα σαραντατρία δείγματα διαφόρων αγροτικών προϊόντων που αναλύθηκαν, τα επτά βρέθηκαν θετικά στην παρουσία υπολειμμάτων φυτορμονών. Οι φυτορμόνες που ανιχνεύτηκαν ήταν οι 1-naphthylacetic acid, 2,4-D, chlormequat, 4-Chlorophenoxyacetic acid, thiadiazuron, και 2iP σε επίπεδα συγκεντρώσεων που κυμαίνονταν από <0,01 – 4,2 mg/kg (Anagnostopoulos et al. 2013).

### **3.6. Ταυτόχρονος προσδιορισμός διαφορετικών ομάδων Μυκοτοξινών σε ζωοτροφές και γάλα με την χρήση LC-MS/MS και LC-TOF**

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν μια σημαντική κατηγορία ξеноβιοτικών, η ανίχνευση των οποίων πραγματοποιείται με την υιοθέτηση ποικίλων τεχνικών που περιλαμβάνουν πολλαπλά στάδια επεξεργασίας δείγματος ή/και εξειδικευμένες διαδικασίες που αφορούν την ξεχωριστή απομόνωση ενός μόνο αναλύτη ή μιας κατηγορίας τους. Στη διατριβή αυτή αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια απλή, σύντομη, οικονομική και αξιόπιστη μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό ποικίλων κατηγοριών των μυκοτοξινών. Για το σκοπό αυτό εφαρμόστηκαν δύο σύγχρονες-πρωτοπόρες στον τομέα της ενόργανης ανάλυσης διαφορετικές τεχνικές φασματομετρίας μαζών, η τεχνική του τριπλού τετραπόλου και του χρόνου πτήσης ιόντων. Η πρώτη εφαρμόστηκε αφενός για την ταυτοποίηση αφετέρου για την ποσοτικοποίηση των αναλυτών, ενώ η δεύτερη αποκλειστικά για ταυτοποίηση. Η μέθοδος επικυρώθηκε με επιτυχία -σύμφωνα με τα ευρωπαϊκά πρότυπα- σε 2 διαφορετικά υποστρώματα (ζωοτροφές με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπαρά και γάλα). Από τα συνολικά εξηνταέξι δειγμάτων ζωοτροφών και τριαντατριών δειγμάτων γάλακτος που αναλύθηκαν με τη μέθοδο που αναπτύχθηκε έγινε δυνατή η ανίχνευση της παρουσίας υπολειμμάτων ποικίλων μυκοτοξινών. Οι μυκοτοξίνες που ανιχνεύτηκαν ήταν οι αφλατοξίνες B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> G<sub>2</sub>, η ωχρατοξίνη A και η T-2 τοξίνη. Σε αρκετές περιπτώσεις ανιχνεύτηκε η παρουσία πάνω από μίας ουσίας ανά δείγμα σε συγκεντρώσεις άνω των Ανωτάτων Επιτρεπτών Ορίων όπως αυτά θεσπίζονται από την Ε.Ε.



#### 4. Βιβλιογραφία

Anagnostopoulos C.J., Aplada Sarli P., Miliadis G.E. and Haroutounian S.A., “*Validation of the QuEChERS method for the determination of 25 priority pesticide residues in cereal based baby foods by gas chromatography with electron capture and nitrogen phosphorous*”, Hellenic Plant Protection Journal 3: 71-80, 2010.

Anagnostopoulos C.J., Aplada Sarli P., Liapis K., Haroutounian S.A. and Miliadis G.E., “*Validation of 2 Variations of the QuEChERS Method for the Determination of Multiclass Pesticide Residues in Cereal Based Infant Foods by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry*”, Food Anal. Methods (2012) 5:664–683.

Anagnostopoulos C.J., Liapis K., Haroutounian S. and Paspatis E., “*Simultaneous determination of different classes of plant growth regulator in high water content agricultural products by liquid chromatography tandem mass spectrometry and time of flight mass spectrometry*”, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies (2013) Vol. 36, Iss. 3.

Anagnostopoulos C., Liapis K., Haroutounian S.A. and Miliadis G.E., “*Development of an Easy Mutliresidue Method for Fat Soluble Pesticides in Animal products using Gas Chromatography Tandem Mass Spectrometry*”, Food Anal. Methods (2014) 7: 205-216.

Tsiplakou E., Anagnostopoulos C.J., Liapis K., Haroutounian S.A. and Zervas G., “*Pesticides residues in milks and feedstuff of farm animals drawn from Greece*”, Chemosphere. 2010 Jul;80(5):504-12.