



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ:
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ

**ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ
QuEChERS ΚΑΙ ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ**

**ΚΑΡΒΟΥΝΗ ΚΑΡΑΤΖΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΓΕΩΠΟΝΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2022**

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ
ΣΕ ΨΑΡΙΑ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΕ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS ΚΑΙ
ΥΓΡΗΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΑΡΒΟΥΝΗ ΚΑΡΑΤΖΑ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

- 1) ΙΩΑΝΝΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΥ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 2) ΤΡΙΑΝΤΑΦΥΛΛΟΣ ΑΛΜΠΑΝΗΣ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
- 3) ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΤΑΚΙΟΥΤΑΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ, Τμήμα Γεωπονίας,
Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

*Αφιερώνεται στον σύζυγό μου και την
κόρη μου.*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΑΓΡΟΔΙΑΤΡΟΦΗ» με σκοπό την ανάπτυξη και επικύρωση της μεθόδου προσδιορισμού υπολειμμάτων με εκχύλιση QuEChERS και με χρήση υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας σε δείγματα ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας. Η εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής χημείας και Χημείας Τροφίμων του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κωνσταντίνου Ιωάννη, Καθηγητή του εργαστηρίου Βιομηχανικής χημείας Τμήματος Χημείας και επιβλέποντα καθηγητή της ερευνητικής εργασίας, για την ανάθεση αυτής της μελέτης, την καθοδήγηση, την αμέριστη συμπαράσταση και τις πολύτιμες συμβουλές του κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας και ιδιαίτερα την Δρ. Βασιλική Μπότη, όπως και τους συμφοιτητές μου για την βοήθεια και στήριξη.

Τέλος, θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου που καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου ήταν δίπλα μου και με στήριζαν.

Ιωάννινα, 2022

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η τροποποίηση και εφαρμογή της εκχύλισης QuEChERS, μιας γρήγορης, εύκολης, φθηνής, αποτελεσματικής, ανθεκτικής και ασφαλούς διαδικασίας εκχύλισης σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης - φασματομετρία μάζας- υψηλής ακρίβειας και διακριτικής ικανότητας (UHPLCOrbitrap-MS), για τον προσδιορισμό εννιά φυτοπροστατευτικών ενώσεων και είκοσι οχτώ φαρμακευτικών ενώσεων σε δείγματα ιχθύων. Η μελέτη των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης βασίστηκε στον προσδιορισμό της απόδοσης της εκχύλισης εκφρασμένης ως η εκατοστιαία ανάκτηση (%R) των ενώσεων μετά τον εμβολιασμό δείγματος ιχθύων σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις 20 $\mu\text{g/g}$ (0,016 $\mu\text{g/kg}$) και 150 $\mu\text{g/g}$ (0,12 $\mu\text{g/kg}$) και για τις φαρμακευτικές ενώσεις 25 $\mu\text{g/g}$ (0,02 $\mu\text{g/kg}$) και 250 $\mu\text{g/g}$ (0,2 $\mu\text{g/kg}$) αφού προηγουμένως πραγματοποιήθηκε η ανασκόπηση των διαφορετικών τεχνικών QuEChERS που έχουν προταθεί στην βιβλιογραφία όπως και η βελτιστοποίηση των παραγόντων που επιδρούν στην απόδοση της εκχύλισης QuEChERS. Ύστερα από την δοκιμή των τριών διαφορετικών τεχνικών της μεθόδου, η μέθοδος με την προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH (buffered QuEChERS) ήταν αυτή που έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Η μέθοδος αξιολογήθηκε προσδιορίζοντας τα κριτήρια ποιότητας για την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων όπως η γραμμικότητα, η ανάκτηση, η επαναληψιμότητα και αναπαραγωγιμότητα, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικοποίησης (LOQ). Η γραμμικότητα σε όλες τις ενώσεις εμφάνισε συντελεστές προσδιορισμού (R^2) υψηλότερους από 0.99. Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας τη συγκέντρωση που υπολογίστηκε μετά την εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS στα εμβολιασμένα δείγματα, με το επίπεδο του εμβολιασμού.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού στο χαμηλό επίπεδο (20 $\mu\text{g/g}$) κυμάνθηκαν από 68,5% έως 139,5%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) για το χαμηλό επίπεδο ήταν για όλες τις ενώσεις μικρότερη από 11,2% και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ήταν μικρότερη από 13,6%. Οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού στο υψηλό επίπεδο (150 $\mu\text{g/g}$) κυμάνθηκαν από 77,8% έως 113,9%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) για το υψηλό επίπεδο ήταν για όλες τις ενώσεις μικρότερη από 11,8% και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ήταν μικρότερη από 13,8%.

Αντίστοιχα για τις φαρμακευτικές ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού στο χαμηλό επίπεδο (25 $\mu\text{g/g}$) κυμάνθηκαν από 51,8% έως 112,5%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) για το χαμηλό επίπεδο ήταν για όλες τις ενώσεις μικρότερη από 13,9% και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ήταν μικρότερη από 15,7%. Οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού στο υψηλό επίπεδο (250 $\mu\text{g/g}$) κυμάνθηκαν από 69,8% έως 117,3%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) για το υψηλό επίπεδο ήταν για όλες τις ενώσεις μικρότερη από 12,9% και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ήταν μικρότερη από 15,7%.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0,06 ng/g έως 6,25 ng/g και 0,06 ng/g έως 2,5 ng/g και για τις φαρμακευτικές ενώσεις τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0,1 ng/g έως 12,5 ng/g και 0,03 ng/g έως 6,25 ng/g . Τέλος οι επιδράσεις μήτρας κυμάνθηκαν σε χαμηλές ή μέσες τιμές.

ABSTRACT

In this thesis, the modification and application of QuEChERS extraction, a fast, easy, cheap, efficient, durable and safe extraction process, was studied in combination with ultra-high performance liquid chromatography - mass spectrometry - high precision and resolution (UHPLC-Orbitrap-MS), for the determination of nine plant protection compounds and twenty-eight pharmaceutical compounds in fish samples. Optimal extraction parameters were studied based on the extraction yield expressed as the percent recovery (%R) of the compounds after spiking fish sample at two concentration levels 20 µg/g (0.016 µg/kg) and 150 µg/g (0.12 µg/kg) for pesticide compounds and 25 µg/g (0.02 µg/kg) and 250 µg/g (0.2 µg/kg for pharmaceutical compounds) as well as reviewing the studies dealing with the different QuEChERS techniques previously suggested in the literature as well as the optimization of the factors that affect recoveries QuEChERS extraction. After testing the three different core techniques of the method, the buffered QuEChERS method was the one that gave the best results.

The method was evaluated by determining the quality criteria for the validation of analytical methods such as linearity, retrieval, repeatability and reproducibility, limits of detection (LOD) and quantification (LOQ). Linearity across all compounds showed coefficients of determination (R^2) higher than 0.99. Recoveries were determined by comparing the concentration calculated after applying the QuEChERS method to the spiking samples, with the spiking concentration level.

For pesticides, the average values of extraction recoveries at the low level (20 µg/g) ranged from 68.5% to 139.5%. The repeatability of the method (RSD_r) for the low level was for all compounds less than 11.2% and the intra-laboratory reproducibility (RSD_R) was less than 13.6%. The average values of extraction recoveries at the high level (150 µg/g) ranged from 77.8% to 113.9%. The repeatability of the method (RSD_r) for the high level was for all compounds less than 11.8% and the intra-laboratory reproducibility (RSD_R) was less than 13.8%.

Respectively for pharmaceutical compounds, the average recovery values at the low level (25 µg/g) ranged from 51.8% to 112.5%. The repeatability of the method (RSD_r) for the low level was for all compounds less than 13.9% and the intra-laboratory reproducibility (RSD_R) was less than 15.7%. The average values of recoveries at the high level (250 µg/g) ranged from 69.8% to 117.3%. The repeatability of the method (RSD_r) for the high level was for all compounds less than 12.9% and the intra-laboratory reproducibility (RSD_R) was less than 15.7%.

For pesticides, the limits of quantification and detection ranged from 0.06 ng/g to 6.25 ng/g and 0.06 ng/g to 2.5 ng/g and for pharmaceutical compounds the limits of quantification and detection ranged from 0.1 ng/g to 12.5 ng/g and 0.03 ng/g to 6.25 ng/g. Finally matrix effects ranged between low to medium values.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Πίνακας περιεχομένων

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	1
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.....	2
1.1 ΠΕΡΙ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΛΑΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ.....	2
1.2 Τι είναι η υδατοκαλλιέργεια	4
1.3 Απασχόληση στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας	5
1.4 Βασικά χαρακτηριστικά του κλάδου - σημαντικότερες εξελίξεις το 2019	6
1.5 Όγκος και αξία παραγωγής ανά κατηγορία εκτροφής.....	8
1.6 Γεωγραφική κατανομή εκμεταλλεύσεων υδατοκαλλιέργειας	9
1.7 Το νομικό πλαίσιο της ίδρυσης και λειτουργίας των υδατοκαλλιεργειών.....	12
1.8 Εμπορία μεσογειακών ιχθύων	15
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.....	18
2 ΠΕΡΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΕΝ ΓΕΝΕΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΤΑ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ	18
2.1 ΦΥΣΙΚΟ-ΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ	18
2.1.1 Το διαλυμένο οξυγόνο	18
2.1.2 pH.....	20
2.1.3 Θρεπτικά Συστατικά (ενώσεις Αζώτου και Φωσφόρου).....	20
2.1.4 Βαρέα μέταλλα.....	23
2.1.5 Οργανικοί χημικοί ρύποι	25
2.2 Οδηγίες της Ε.Ε. για επικίνδυνες ουσίες.....	27
• Οδηγία 67/548/EEC	27
• Οδηγία 76/464/EEC	27
2.3 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού οργανικών ρύπων	28
2.4 Εκχύλιση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων	28
2.4.1 Υγρή- υγρή Εκχύλιση, LLE (Liquid- liquid Extraction)	30
2.4.2 Εκχύλιση Soxhlet (SOX).....	30
2.4.3 Εκχύλιση στο Υπερκρίσιμο Σημείο, SFE (Supercritical Fluid Extraction)	31
2.4.4 Υγρή- στερεή εκχύλιση, SPE (Solid Phase extraction)	32
2.4.5 Μικροεκχύλιση Δια της Στερεής Φάσης, SPME (Solid Phase MicroExtraction).....	33
2.4.6 Εκχύλιση με χρήση Υπερήχων, USE (Ultrasonic Extraction).....	34
2.4.7 Εκχύλιση QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)	35
2.5 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography)	40

2.6	Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρίας Μάζας (Gas Chromatography/Mass Spectrometry).....	40
2.6.1	Πλεονεκτήματα	41
2.7	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)	41
2.8	Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)	43
2.8.1	Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα Ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό.....	43
2.9	Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry).....	44
2.10	Υβριδικός αναλυτής μαζών τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap).....	44
2.10.1	Αρχή Λειτουργίας Αναλυτή Orbitrap.....	45
2.10.2	Πλεονεκτήματα χρήσης αναλυτή Orbitrap	47
2.11	Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου	48
2.12	ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ.....	50
B.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	51
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	52
3	ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	52
3.1	Υλικά και μέθοδοι.....	56
3.1.1	Χημικά, υλικά και όργανα	56
3.1.2	Βελτιστοποίηση μεθόδου QuEChERS.....	59
3.2	Εμβολιασμός δειγμάτων	59
3.2.1	Δοκιμές μεθόδου εκχύλισης QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) σε υπόστρωμα ψαριού	
3.3	Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας	67
3.4	Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός.....	69
3.5	Επικύρωση μεθόδου	69
3.6	Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)	70
Γ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	72
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	73
4	Επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε ψάρια....	73
4.1	Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου σε δείγματα ψαριού.....	73
4.2	Επίδραση υποστρώματος.....	80
4.2	Συμπεράσματα	82
	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5	84
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	84

Α. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

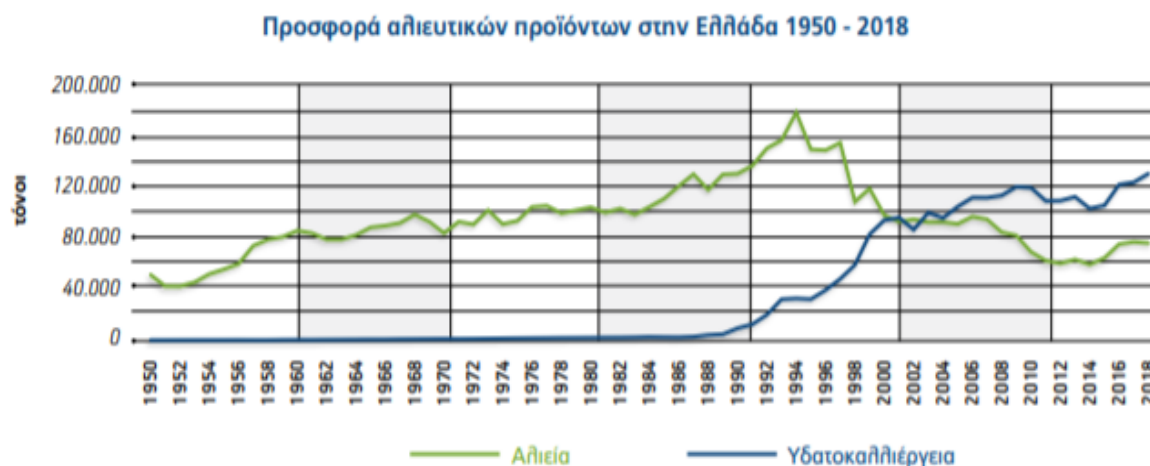
1.1 ΠΕΡΙ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΛΑΔΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΟΙΚΟΝΟΜΙΑ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ

Ως υδατοκαλλιέργειες εννοούνται οι τεχνικές συστηματικής εκτροφής υδρόβιων οργανισμών και αποτελούν υπό-συστήματα διότι δέχονται άμεσες ή έμμεσες εισροές από το περιβάλλον. Οι υδατοκαλλιέργειες χαρακτηρίζονται έτσι διότι βρίσκονται και λειτουργούν στα πλαίσια της ευρύτερης λειτουργίας ενός οικοσυστήματος το οποίο συμπεριλαμβάνει το υδάτινο περιβάλλον και τη λεκάνη απορροής του. Η λεκάνη απορροής ενός υδάτινου οικοσυστήματος αποτελεί όλη εκείνη τη γεωγραφική περιοχή της οποίας τα ατμοσφαιρικά καταιονήματα (βροχή, χιόνι) ή και τα πηγαία νερά, καταλήγουν στο συγκεκριμένο οικοσύστημα (θάλασσα, λίμνη, τεχνητός ταμιευτήρας νερού), το οποίο είναι ο τελικός αποδέκτης. (Καραμανλής, 2018)

Η υδατοκαλλιέργεια και κυρίως η ιχθυοκαλλιέργεια αποτελεί στην Ελλάδα έναν από τους πιο σημαντικούς κλάδους του πρωτογενούς τομέα ζωικής παραγωγής λόγω της συμβολής της στην οικονομική ανάπτυξη της χώρας. Ενδεικτικά αναφέρεται πως το 1980 μόλις το 2% της εγχώριας προσφοράς αλιευτικών προϊόντων προερχόταν από την υδατοκαλλιέργεια (2.000 τόνοι) και το υπόλοιπο 98% από τη συλλεκτική αλιεία (105.651 τόνοι). Η αναλογία αυτή άρχισε να μεταβάλλεται και σύμφωνα με τα τελευταία διαθέσιμα στοιχεία του FAO, το 63% της εγχώριας παραγωγής προήλθε από την υδατοκαλλιέργεια και το υπόλοιπο 37% από τη συλλεκτική αλιεία. Η δραστηριότητα αυτή έχει αναδειχθεί σε μια από τις πλέον ανταγωνιστικές για την Ελλάδα, η οποία διατηρεί μια από τις ηγετικές θέσεις στην παραγωγή μεσογειακών ειδών σε ευρωπαϊκό και διεθνές επίπεδο. Αναλυτικότερα, στις ελληνικές θάλασσες εκτρέφονται μεσογειακά είδη κυρίως τσιπούρα και λαβράκι και σε ένα μικρότερο ποσοστό «νέα είδη» όπως μυτάκι, κρانيός, συναγρίδα κ.α.. Η θαλάσσια ιχθυοκαλλιέργεια γνώρισε ραγδαία ανάπτυξη τη δεκαετία του '80 με τη χρήση πλωτών ιχθυοκλωβών, μιας μεθόδου που χρησιμοποιούταν ευρέως στη Νορβηγία για την εκτροφή σολομού. Ενδεικτικό της κατάστασης είναι ότι ενώ το 1985 υπήρχαν 12 μονάδες με συνολική παραγωγή περίπου 100 τόνους, σήμερα υπάρχουν πάνω από 300 μονάδες με παραγωγή που ξεπερνάει τους 100.000 τόνους. Στο Σχήμα 1.1 απεικονίζεται η προσφορά των αλιευτικών προϊόντων στην χώρα μας.

Η 2η πιο σημαντική κατηγορία εκτροφής είναι η οστρακοκαλλιέργεια. Η δραστηριότητα αυτή πραγματοποιείται κυρίως σε περιοχές της Βόρειας Ελλάδας όπου εκτρέφεται σχεδόν αποκλειστικά το Μεσογειακό μύδι. Η πρώτη παραχώρηση χώρου για εκτροφή μυδιών καταγράφηκε το 1955 και αφορούσε μια πασσαλωτή μονάδα στον ΒΑ κόλπο της Θεσσαλονίκης. Το 1970 ξεκίνησε η συστηματικότερη εκτροφή μυδιών σε τμήματα των ποταμών Λουδία και Αξιού και επεκτάθηκε στην Πιερία, την Ημαθία και την

Καβάλα. Αρχικά γινόταν χρήση του πασσαλωτού συστήματος που είναι κατάλληλο για πιο ρηχά νερά και στη συνέχεια το 1985 χρησιμοποιήθηκε το πλωτό σύστημα σε σχοινιά μακράς γραμμής για βαθύτερα νερά, με αποτέλεσμα τη μεγάλη αύξηση του αριθμού των μονάδων από 70 σε 600. Εκτός από τις θαλάσσιες υδατοκαλλιέργειες, ιδιαίτερη θέση κατέχει η υδατοκαλλιέργεια των εσωτερικών υδάτων καθώς αποτελεί μια παραδοσιακή μορφή πρωτογενούς παραγωγής και πηγή κύριας ή συμπληρωματικής απασχόλησης και εισοδήματος για τους κατοίκους ορεινών και απομακρυσμένων ηπειρωτικών περιοχών. Σήμερα δραστηριοποιούνται 85 μονάδες εντατικής εκτροφής ιχθύων, με κυριότερο είδος την ιριδίζουσα πέστροφα, ενώ σε μικρότερη κλίμακα εκτρέφονται ο κυπρίνος και το ευρωπαϊκό χέλι. Στις ελληνικές λιμνοθάλασσες ασκείται και η παραδοσιακή εκτατική υδατοκαλλιέργεια με ιδιαίτερες οικονομικές και κοινωνικές διαστάσεις σε τοπικό επίπεδο. Σήμερα λειτουργούν 72 οργανωμένες εκμεταλλεύσεις λιμνοθαλασσών κυρίως από αλιευτικούς συλλόγους συνολικής έκτασης 400 χιλ. στρεμμάτων. Τα κυριότερα παραγόμενα είδη είναι τσιπούρες, λαβράκια, κέφαλοι και χέλια. Τα τελευταία χρόνια, ο κλάδος έχει στραφεί σε πολύ μικρό βαθμό και σε υδρόβια φυτά με πολύ έντονο ενδιαφέρον για το κυανοβακτήριο σπιρουλίνα, το μακροφύκος *ulva* κ.α., τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως συμπληρώματα διατροφής, πρώτη ύλη στη βιομηχανία καλλυντικών, βιοκαύσιμα, κλπ. (ΣΕΘ, 2019)



Σχήμα 1.1 Προσφορά αλιευτικών προϊόντων στην Ελλάδα

[Πηγή: FAO, ΥΠΑΑΤ, ΣΕΘ]

1.2 Τι είναι η υδατοκαλλιέργεια

Η Υδατοκαλλιέργεια αποτελείται από την εκτροφή ή την καλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών (π.χ. φυτών και ζώων) χρησιμοποιώντας τεχνικές σχεδιασμένες για να αυξήσουν την παραγωγή των εν λόγω οργανισμών πέρα από τη φυσική ικανότητα του περιβάλλοντος. Επίσης διαφέρει από την ελεγχόμενη αλιεία, εν δυνάμει του γεγονότος ότι αυτοί οι υδρόβιοι οργανισμοί παραμένουν περιουσία του φυσικού ή νομικού προσώπου σε όλη την εκτροφή και το στάδιο καλλιέργειας, μέχρι και συμπεριλαμβανομένης της συγκομιδής. Η Ευρωπαϊκή υδατοκαλλιέργεια είναι μια πολυποίκιλη βιομηχανία, ενώ η καλλιέργεια υδρόβιων φυτών και μικροφυκών στην Ευρώπη είναι ακόμη οριακή, η αντίστοιχη των υδρόβιων ζώων αποτελείται από 3 σημαντικούς τομείς:

- Θαλάσσια καλλιέργεια οστρακόδερμων (π.χ. στρείδια και μύδια)
- Καλλιέργεια θαλάσσιων ειδών ψαριών (π.χ. σολομός, λαβράκι και τσιπούρα)
- Καλλιέργεια ψαριών του γλυκού νερού (π.χ. χέλι, πέστροφα, κυπρίνος, κλπ.)

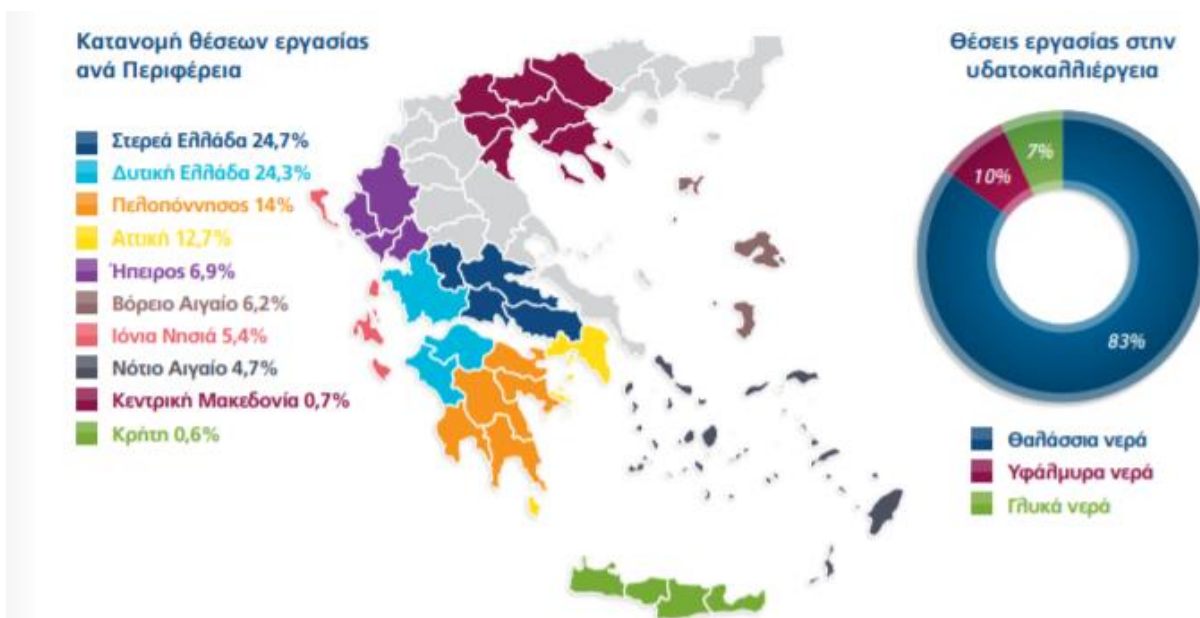
Το μεγαλύτερο ποσοστό της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) προέρχεται από 10 κύρια είδη, ενώ δεδομένα από το FAO δείχνουν ότι υπάρχουν περίπου 100 διαφορετικά καλλιεργούμενα υδρόβια είδη στην Ευρώπη. Επιπλέον, τα υδρόβια είδη μπορούν να καλλιεργηθούν με μια ποικιλία διαφορετικών μεθόδων καθώς και με ένα εύρος τεχνικών: από πλήρως ανοιχτά συστήματα μέχρι εντελώς κλειστά και ελεγχόμενα συστήματα ανακύκλωσης, και από εκτατική ως υψηλά εντατική παραγωγή στο έδαφος, στις λίμνες, στις λίμνες που τροφοδοτούνται από ποταμούς ή ακόμη και από υπόγεια ύδατα, εν πλω στις λιμνοθάλασσες, κοντά στη στεριά, κ.λπ. Υπάρχουν επίσης πληθώρα τύπων επιχειρήσεων που κυμαίνονται από μέρος των δραστηριοτήτων του χρόνου παραμονής μεταξύ των αγροτικών οικογενειών (ιδίως για τα παραδοσιακά είδη ψαριών) για τις εισηγμένες στο χρηματιστήριο διεθνείς εταιρείες (ειδικά για τα θαλάσσια είδη ψαριών όπως ο σολομός, το λαβράκι ή τσιπούρα). Με ελάχιστες εξαιρέσεις (π.χ. σκουλήκια για δόλωμα, διακοσμητικά ψάρια), όλα τα προϊόντα υδατοκαλλιέργειας στην Ε.Ε. είναι τρόφιμα που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση.

Η παραγωγή ιχθύων και θαλασσινών παρουσιάζει μια σταθερά αυξανόμενη τάση τα τελευταία χρόνια και αυτό αναμένεται να συνεχιστεί. Ωστόσο, τα ψάρια αποτελούν ένα εξαιρετικά ευάλωτο προϊόν και για αυτόν τον λόγο απαιτούν επεξεργασία. Πιο συγκεκριμένα, το 2000, περισσότερο από το 60% της συνολικής παγκόσμιας αλιευτικής παραγωγής υπέστη κάποια μορφή επεξεργασίας. (Κανδυλιάρη, 2020)

1.3 Απασχόληση στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας

Σύμφωνα με πρόσφατα διαθέσιμα στοιχεία (έτος 2018), το σύνολο των άμεσα απασχολούμενων στον κλάδο ανήλθε σε 4.260 άτομα μόνιμο και έκτακτο προσωπικό, παρουσιάζοντας μείωση 3% σε σχέση με το προηγούμενο έτος. Η θαλάσσια υδατοκαλλιέργεια (ψάρια και μύδια) δημιουργεί το 83% των άμεσων θέσεων απασχόλησης, η καλλιέργεια σε υφάλμυρα νερά το 10%, ενώ η καλλιέργεια εσωτερικών υδάτων το 7%. Αν υπολογίσουμε και τις έμμεσες θέσεις απασχόλησης που δημιουργούνται από τις συνοδευτικές – υποστηρικτικές υπηρεσίες του κλάδου (παρασκευαστήρια ιχθυοτροφών, εξοπλισμός, ιχθυοκιβώτια, μεταφορές, κλπ.), τότε εκτιμάται πως συνολικά απασχολούνται άμεσα και έμμεσα περίπου 12.000 εργαζόμενοι διαφόρων ειδικοτήτων (επιστημονικό, τεχνικό και εργατικό προσωπικό). Στο Σχήμα 1.2 απεικονίζονται οι θέσεις εργασίας στην υδατοκαλλιέργεια.

Το σημαντικότερο όλων είναι ότι μεγάλος αριθμός αυτών των θέσεων απασχόλησης δημιουργούνται σε απομακρυσμένες περιοχές της Ελληνικής επικράτειας, κυρίως νησιωτικές, γεγονός το οποίο συμβάλει σημαντικά στην οικονομική ανάπτυξη των τοπικών κοινωνιών. Πιο συγκεκριμένα και όσον αφορά στην ιχθυοκαλλιέργεια, δημιουργεί θέσεις εργασίας σε 10 από τις 13 Περιφέρειες της Ελλάδας με τη Δυτική Ελλάδα, τη Στερεά Ελλάδα, την Πελοπόννησο και την Αττική να έχουν τις περισσότερες θέσεις εργασίας. Αξίζει να σημειωθεί πως στην Ελλάδα καταγράφεται ένα από τα υψηλότερα ποσοστά απασχόλησης επί του συνόλου των απασχολούμενων στον κλάδο της υδατοκαλλιέργειας στην Ε.Ε. Στο Σχήμα 1.2 απεικονίζεται η κατανομή θέσεων ανά περιφέρεια. (ΣΕΘ, 2019)



Σχήμα 1.2 Κατανομή θέσεων εργασίας ανά περιφέρεια και θέσεις εργασίας στην υδατοκαλλιέργεια

[Πηγή: ΥΠΑΑΤ, ΣΕΘ]

1.4 Βασικά χαρακτηριστικά του κλάδου - σημαντικότερες εξελίξεις το 2019

Η εκτροφή θαλάσσιων μεσογειακών ιχθύων αποτελεί εδώ και 30 χρόνια τη βασική δραστηριότητα υδατοκαλλιέργειας της χώρας. Το 2019 αντιπροσώπευσε το 83,8% του όγκου και το 97% της αξίας της συνολικής παραγωγής της χώρας. Τα κύρια είδη που εκτρέφονται είναι η τσιπούρα (*Sparus aurata*) και το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) αποτελώντας περίπου το 96% των πωλήσεων, ενώ σε πολύ μικρότερη κλίμακα, περίπου 4%, εκτρέφονται όλα τα υπόλοιπα μεσογειακά είδη, όπως το λυθρίνι (*Pagellus erythrinus*), ο κρανιός (*Argyrosomus Regius*), η συναγρίδα (*Dentex dentex*), κ.α.. Από το 1981 που δημιουργήθηκαν οι πρώτες πειραματικές μονάδες, ο κλάδος έφτασε να κατέχει την πρώτη θέση σε ευρωπαϊκό επίπεδο και τη δεύτερη θέση σε διεθνές στην εκτροφή μεσογειακών ιχθύων. Η παραγωγή κυμαίνεται μεταξύ 110.000 - 120.000 τόνων ετησίως συμβάλλοντας στην κοινωνική και οικονομική ανάπτυξη των τοπικών κοινωνιών και στην προσφορά τροφίμων υψηλής διατροφικής αξίας με χαμηλό περιβαλλοντικό αποτύπωμα.

Σε εμπορικό επίπεδο, ο όγκος εξαγωγών παρουσίασε αύξηση κατά 4% επιβεβαιώνοντας τη στρατηγική των ελληνικών εταιρειών για αύξηση της παραγωγής και διεύρυνση του δικτύου εξαγωγών με άνοιγμα όχι μόνο στις παραδοσιακές, αλλά και σε νέες αγορές. Η τάση αυτή συνοδεύτηκε ωστόσο από οριακή αύξηση της αξίας των εξαγωγών λόγω του διεθνούς ανταγωνισμού. Σε ευρωπαϊκό επίπεδο, παρατηρήθηκε αύξηση της παραγωγής και των δύο ειδών (τσιπούρα, λαβράκι) χωρίς ωστόσο αυτό να επηρεάζει τις ελληνικές πωλήσεις. Η πίεση προήλθε κυρίως από την αυξημένη παραγωγή και τις εισαγωγές στην Ε.Ε. από την

Τουρκία, η οποία διατήρησε και το 2019 ρυθμό ανάπτυξης πολλαπλάσιο από τον αντίστοιχο μέσο ευρωπαϊκό ή τον ελληνικό. Σε κάθε περίπτωση είναι ενθαρρυντικό για την περαιτέρω προοπτική ανάπτυξης του κλάδου πως σε ένα περιβάλλον έντονου ανταγωνισμού, τα ελληνικά προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας μπήκαν το 2019 σε νέες αγορές και προτιμήθηκαν από σημαντικές εταιρείες εισαγωγής και διανομής.

Ως προς την διάρθρωση του κλάδου, το 2019 δραστηριοποιήθηκαν 66 επιχειρήσεις με 302 πλωτές μονάδες σε όλη την Ελλάδα. Στην πλειοψηφία τους πρόκειται για οικογενειακές, μικρές και μικρομεσαίες επιχειρήσεις, ενώ υπάρχουν και μεγαλύτεροι όμιλοι με καθετοποιημένες εταιρείες που εκτός από την εκτροφή ψαριών, παράγουν γόννο, τροφές και πάγιο εξοπλισμό. Σημειώνεται πως το 80% των επιχειρήσεων του κλάδου είναι μικρές εταιρείες με ετήσια δυναμικότητα μικρότερη των 1.000 τόνων. Συνοψίζοντας:

- Το 2019 η συνολική παραγωγή υδατοκαλλιέργειας ανήλθε στους 149.975 τόνους αξίας 564,6 εκ. ευρώ παρουσιάζοντας αύξηση 2% ως προς τον όγκο και σχεδόν 5% ως προς την αξία παραγωγής σε σχέση με το προηγούμενο έτος.
- Το 63% της εγχώριας παραγωγής αλιευτικών προϊόντων προέρχεται από την υδατοκαλλιέργεια και το 37% από την αλιεία.
- Ο κλάδος δημιουργεί 12.000 θέσεις άμεσης και έμμεσης εργασίας κυρίως σε παράκτιες ή απομακρυσμένες περιοχές.
- Τα κύρια είδη εκτροφής είναι τα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας και τα όστρακα που αποτελούν το 85% και το 15% αντίστοιχα του συνολικού όγκου παραγωγής.
- Το 2019 η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού ανήλθε σε 120.500 τόνους παρουσιάζοντας αύξηση 3% σε σχέση με το προηγούμενο έτος.
- Οι εξαγωγές ελληνικής τσιπούρας και λαβρακιού το 2019 ανήλθαν σε 88.651 τόνους εκ των οποίων το 95% διοχετεύτηκε σε αγορές της Ε.Ε..
- Τα ψάρια και τα αλιευτικά προϊόντα αποτελούν τον πρώτο εξαγωγικό κλάδο ζωικής παραγωγής της χώρας.
- Το 2020 η παραγωγή τσιπούρας και λαβρακιού κυμάνθηκε περίπου στους 117.000 τόνους.

1.5 Όγκος και αξία παραγωγής ανά κατηγορία εκτροφής

Στην Ελλάδα εκτρέφονται κυρίως ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας και όστρακα. Όπως αναφέρεται και παραπάνω, για το έτος 2019 ο συνολικός όγκος παραγωγής εκτιμάται ότι ανήλθε σε 149.975 τόνους αξίας 564,6 εκ. ευρώ (συμπεριλαμβάνονται και οι εκτατικές εκμεταλλεύσεις λιμνοθαλασσών). Σε σχέση με το 2018 καταγράφεται αύξηση 2% ως προς τον όγκο (146.627 τόνοι) και 5% ως προς την αξία παραγωγής (534 εκ. ευρώ). Αν συνυπολογίσουμε και την αξία των ιχθυδίων που παρήχθησαν από τους ιχθυογεννητικούς σταθμούς, τότε η συνολική αξία από όλες τις δραστηριότητες υδατοκαλλιέργειας το 2019 ανέρχεται σχεδόν στα 650 εκ. ευρώ. Τα ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας (θαλάσσια και εσωτερικά ύδατα) αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό της συνολικής παραγωγής (85% του όγκου και 98% της αξίας) και ακολουθούν τα μύδια (15% του όγκου και μόλις το 2% της αξίας παραγωγής). Στο Σχήμα 1.3 απεικονίζεται η διάρθρωση παραγωγής για το έτος 2019.

Η εκτροφή ψαριών σε θαλάσσια και εσωτερικά ύδατα, ανήλθε το 2019 συνολικά σε 127.055 τόνους αξίας 553,4 εκ. ευρώ (δεν περιλαμβάνονται οι εκμεταλλεύσεις σε λιμνοθάλασσες). Αξίζει να σημειωθεί πως τα ψάρια που εκτρέφονται σε θαλάσσια ύδατα αντιπροσωπεύουν το 98% του όγκου των ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας ενώ μόλις το 2% προέρχεται από την ιχθυοκαλλιέργεια εσωτερικών υδάτων. Η παραγωγή οστρακοειδών, ανήλθε το 2019 στους 22.020 τόνους αξίας 7,8 εκ. ευρώ. Στην ανωτέρω ανάλυση δεν έχει συμπεριληφθεί η καλλιέργεια υδρόβιων φυτών λόγω του πολύ μικρού ποσοστού συμμετοχής τους στη συνολική παραγωγή της χώρας (0,07%). Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία του FAO, η καλλιέργεια των υδρόβιων φυτών σε θαλάσσια ύδατα (το 2018) ανήλθε σε 93,8 τόνους αξίας 983,7 χιλ. ευρώ. Σε σχέση με το 2018 παρατηρείται μείωση 8,9% ως προς τον όγκο και 20% ως προς την αξία. (ΣΕΘ, 2019)



Σχήμα 1.3 Διάρθρωση της παραγωγής το 2019

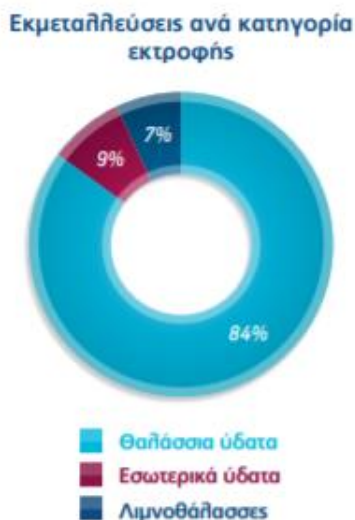
[Πηγή: ΥΠΑΑΤ, ΣΕΘ]

1.6 Γεωγραφική κατανομή εκμεταλλεύσεων υδατοκαλλιέργειας

Σύμφωνα με διαθέσιμα στοιχεία του ΥΠΑΑΤ για το 2019, ο συνολικός αριθμός των εκμεταλλεύσεων υδατοκαλλιέργειας στην Ελλάδα ανέρχεται σε 1.007 εκ των οποίων το 84% βρίσκονται σε θαλάσσια ύδατα (822 μονάδες εκτροφής ψαριών και μυδιών), το 9% είναι μονάδες σε εσωτερικά ύδατα (χερσαίες εγκαταστάσεις) και το υπόλοιπο 7% εκτροφές σε υφάλμυρα νερά (λιμνοθάλασσες) όπως απεικονίζεται και στο Σχήμα 1.4. Στην παραπάνω ανάλυση δεν συμπεριλαμβάνονται οι ιχθυογεννητικοί σταθμοί (συνολικά 26) που υποστηρίζουν τις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας. Αναλυτικότερα και σύμφωνα με την κατηγορία εκτροφής υπάρχουν:

- 302 μονάδες θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας όπου εκτρέφονται κυρίως τσιπούρα και λαβράκι.
- 520 μονάδες οστρακοκαλλιέργειας.
- 87 μονάδες εσωτερικών υδάτων όπου εκτρέφονται πέστροφες, κυπρίνοι, χέλια κλπ.
- 72 εκμεταλλεύσεις σε υφάλμυρα νερά.
- 26 ιχθυογεννητικοί σταθμοί μεσογειακών ιχθύων (τσιπούρας, λαβρακιού και λοιπών μεσογειακών ειδών)

Όσον αφορά στις εκμεταλλεύσεις θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας, σε τρεις Αποκεντρωμένες Διοικήσεις είναι χωροθετημένο σχεδόν το 77% των μονάδων στις οποίες αντιστοιχεί το 81,5% των μισθωμένων εκτάσεων και εκτρέφεται το 82% της ελληνικής παραγωγής. Αυτές είναι οι Αποκεντρωμένες Διοικήσεις Πελοποννήσου – Δυτ. Ελλάδας & Ιονίου, Θεσσαλίας - Στερεάς Ελλάδας και Αιγαίου όπως φαίνεται και στο Σχήμα 1.5.



Σχήμα 1.4 Εκμεταλλεύσεις υδατοκαλλιέργειας ανά κατηγορία εκτροφής

[Πηγή: ΥΠΑΑΤ, ΣΕΘ]

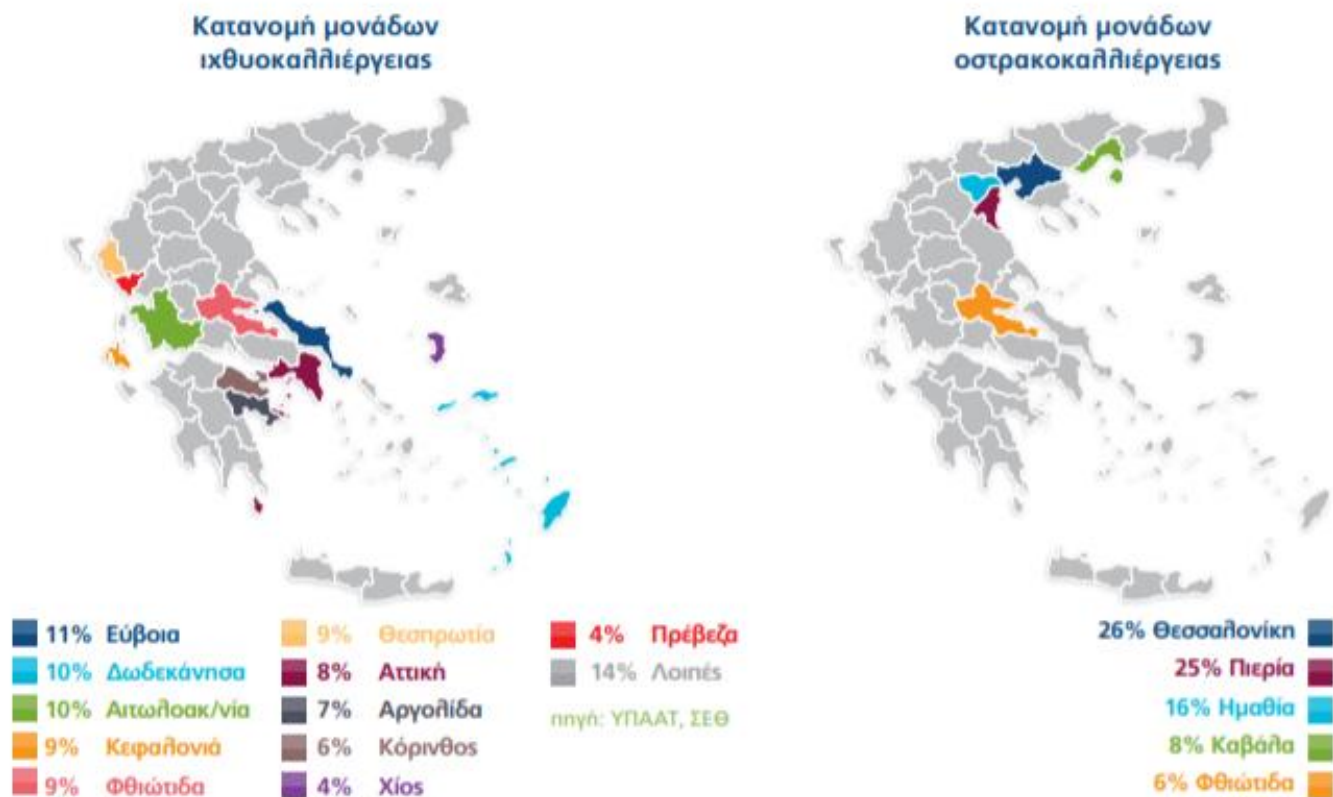
Αποκεντρωμένη Διοίκηση	Αριθμός μονάδων	Θαλάσσια έκταση (στρέμματα)	Εγκεκριμένη Δυναμικότητα
Αιγαίου	51	1.099	16,6 %
Αττικής	24	517	6,18 %
Ηπείρου - Δυτ. Μακεδ.	38	667	8,6 %
Θεσσαλίας - Στερ. Ελλάδ.	72	2.121	32,4 %
Κρήτης	2	50	0,22 %
Μακεδονίας - Θράκης	6	125	3,0 %
Πελοποννήσου - Δυτ. Ελλάδας & Ιονίου	109	2.791	33 %
Γενικό άθροισμα	302	7.370	100,00 %



Σχήμα 1.5 Εκμεταλλεύσεις θαλάσσιας ιχθυοκαλλιέργειας σε αποκεντρωμένες διοικήσεις

[Πηγή: ΥΠΑΑΤ, ΣΕΘ]

Σε τοπικό επίπεδο, ο κλάδος έχει παρουσία στις 11 από τις 13 Περιφέρειες της χώρας δημιουργώντας χιλιάδες θέσεις εργασίας. Πρόκειται για τις Περιφερειακές Ενότητες Εύβοιας, Δωδεκανήσου, Αιτωλοακαρνανίας, Κεφαλονιάς, Φθιώτιδας, Θεσπρωτίας, Αττικής, Αργολίδας, Κορίνθου, Χίου και Πρέβεζας, καθώς λειτουργούν τοπικά πάνω από 10 μονάδες. Σε 14 ακόμη Περιφερειακές ενότητες είναι αδειοδοτημένες λιγότερες από 10 μονάδες. Ωστόσο υπάρχουν Περιφερειακές ενότητες όπου αν και οι αδειοδοτημένες μονάδες είναι λιγότερες από 10, ο όγκος παραγωγής είναι μεγάλος (π.χ. Φωκίδα, Μυτιλήνη, κλπ.) Στο Σχήμα 1.6 απεικονίζεται η κατανομή μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας.



Σχήμα 1.6 Κατανομή μονάδων ιχθυοκαλλιέργειας και οστρακοκαλλιέργειας σε 15 Περιφέρειες

[Πηγή: ΥΠΑΑΤ, ΣΕΘ]

Όσον αφορά στη γεωγραφική κατανομή των εκμεταλλεύσεων οστρακοκαλλιέργειας οι περιοχές με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη είναι η Θεσσαλονίκη (26%), η Πιερία (25%), η Ημαθία (16%), η Καβάλα (8%) και η Φθιώτιδα (6%). Το υπόλοιπο 19% είναι κατανεμημένο σε 10 περιφερειακές ενότητες με λιγότερες από 10 μονάδες εκάστη (Πρέβεζας, Ξάνθης, Θεσπρωτίας, Χαλκιδικής, Ροδόπης, Αττικής, Σερρών, Λέσβου, Ευβοίας, Αιτωλοακαρνανίας). (ΣΕΘ, 2019)

1.7 Το νομικό πλαίσιο της ίδρυσης και λειτουργίας των υδατοκαλλιεργειών

Η χορήγηση άδειας ίδρυσης και λειτουργίας υδατοκαλλιεργειών στην Ελλάδα καθορίζεται από τον Νόμο 4282/2014 (ΦΕΚ 182/29-08-2014), σε συνδυασμό με την απόφαση υπ' αριθμόν 31722/2011 (ΦΕΚ 2505/4-11-2011) και το προεδρικό διάταγμα 28/2009 (ΦΕΚ 46/16-03-2009) και την τροποποίησή του Π.Δ. 164/2014 (ΦΕΚ 248/17-11-2014). Σε ότι αφορά στη μελέτη Περιβαλλοντικών Επιπτώσεων (ΜΠΕ), αυτή υπόκειται στο Νόμο 4014/2014 (ΦΕΚ 209/21-9-2011).

Σύμφωνα με την παραπάνω νομοθεσία, στην Ελλάδα, στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών εφαρμόζεται το Εθνικό Πρόγραμμα Ανάπτυξης Υδατοκαλλιεργειών (ΕΠΑΥ) που στοχεύει, μεταξύ άλλων, στη βιώσιμη ανάπτυξη των υδατοκαλλιεργειών, στη διαμόρφωση αναπτυξιακής πολιτικής στον αντίστοιχο τομέα, στην παραγωγή προϊόντων υψηλής ποιότητας, στη διευθέτηση των σχέσεων μεταξύ αντικρουόμενων συμφερόντων από τη χρήση των παράκτιων περιοχών, τον εκσυγχρονισμό του νομικού πλαισίου για την αδειοδότηση, τη λειτουργία και τέλος τον έλεγχο των υδατοκαλλιεργητικών δραστηριοτήτων. Για τα θέματα που αφορούν στη διαμόρφωση και εφαρμογή του ΕΠΑΥ αρμόδιο είναι το Εθνικό Συμβούλιο Υδατοκαλλιεργειών (ΕΣΥΔ) το οποίο απαρτίζεται από τον Γενικό Γραμματέα, εκπροσώπους της Δ/σης Αλιείας, της Δ/σης Υδατοκαλλιεργειών και της Δ/σης Κτηνιατρικής του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, με την επιπλέον συμμετοχή εκπροσώπων των Α.Ε.Ι., του Υπουργείου Περιβάλλοντος Ενέργειας και Κλιματικής Αλλαγής (ΥΠΕΚΑ), του Γεωτεχνικού Επιμελητηρίου (ΓΕΩΤΕΕ), των επαγγελματικών και των καταναλωτικών οργανώσεων, καθώς και εκπροσώπου από μη κυβερνητικές οργανώσεις.

Το Ελληνικό Δημόσιο παραχωρεί τη χρήση τόσο των θαλάσσιων όσο και των λιμναίων νερών για ίδρυση, επέκταση ή και μετεγκατάσταση πλωτών υδατοκαλλιεργητικών μονάδων με μίσθωση (ΦΕΚ 3645/11-11-2016) για χρονικό διάστημα που κυμαίνεται από 15 έως και 20 έτη. Η παραχώρηση της χρήσης γίνεται και χωρίς αντάλλαγμα μέχρι 3 έτη υδατικών εκτάσεων έως 10 στρέμματα για τη δοκιμαστική εκτροφή υδρόβιων οργανισμών ή και την ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων καλλιέργειας.

Σύμφωνα με το Ειδικό πλαίσιο Χωροταξικού Σχεδιασμού και Αειφόρου Ανάπτυξης (ΦΕΚ 2505/4-11-2011) στην Ελληνική επικράτεια καθορίζονται Περιοχές Ανάπτυξης Υδατοκαλλιεργειών (ΠΑΥ). Οι περιοχές αυτές αφορούν θαλάσσιους χώρους που προσφέρονται για υδατοκαλλιέργεια και όπου χωροθετούνται αντίστοιχες μονάδες, είτε:

- με τη μορφή Περιοχών Οργανωμένης Ανάπτυξης Υδατοκαλλιεργειών (ΠΟΑΥ), όπου η συνολική έκταση των οποίων ξεπερνά τα 100 στρέμματα.

- με τη μορφή των Περιοχών Άτυπης Συγκέντρωσης Μονάδων (ΠΑΣΜ), όπου αναπτύσσονται έως 5 υδατοκαλλιεργητικές μονάδες, συνολικής έκτασης μικρότερης από 100 στρέμματα και σε απόσταση μεταξύ τους από 500 έως 2000 μέτρα.
- Μεμονωμένες ή Σημειακές μονάδες, για τις οποίες ισχύουν κατά περίπτωση περιορισμοί ως προς το μέγεθος, το ύψος της παραγωγής κ.α. Οι μεμονωμένες μονάδες δεν δύνανται να υπερβαίνουν σε έκταση τα 40 στρέμματα για ιχθυοκαλλιέργεια και τα 20 στρέμματα για οστρακοκαλλιέργεια ή να βρίσκονται σε απόσταση μικρότερη των 5 χιλιομέτρων μεταξύ τους. Επιπλέον, η συνδυασμένη παρουσία στη περιοχή τουριστικών καταλυμάτων, μονάδων εστίασης ή και καταδυτικών πάρκων, περιορίζει τη δυναμικότητα της υδατοκαλλιέργειας στους 15 τόνους ετησίως και αυτό κατόπιν συμφωνίας μεταξύ των εμπλεκόμενων επιχειρήσεων.

Η έννοια των Περιοχών Ανάπτυξης Υδατοκαλλιεργειών (ΠΑΥ) δεν υφίσταται για την ανάπτυξη υδατοκαλλιεργειών σε εσωτερικά νερά (λίμνες, ποτάμια). Η ίδρυση και λειτουργία ιχθυοκαλλιεργειών στα εσωτερικά νερά καθορίζεται από τους περιορισμούς που αφορούν στη χρήση των αντίστοιχων υδάτινων οικοσυστημάτων και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους.

Οι Περιοχές Ανάπτυξης Υδατοκαλλιεργειών (ΠΑΥ) της Ελληνικής θαλάσσιας επικράτειας ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια.

Οι περιοχές ΠΑΥ της Ελληνικής θαλάσσιας επικράτειας ταξινομήθηκαν σύμφωνα με τα ακόλουθα κριτήρια (ΦΕΚ 2505/4-11-2011):

α) Περιβαλλοντικά χαρακτηριστικά

- η γεωμορφολογία της περιοχής,
- τα φυσικοχημικά και βιολογικά χαρακτηριστικά των νερών,
- ο ρυθμός ανανέωσης των θαλάσσιων μαζών – ρεύματα,
- ο κυματισμός,
- η ποιότητα νερών (τροφική κατάσταση – ρύποι),
- το καθεστώς προστασίας

β) Χαρακτηριστικά χωροταξικού χαρακτήρα

- η παρουσία ανταγωνιστικών με τις υδατοκαλλιέργειες χρήσεων,
- η παρουσία ασύμβατων χρήσεων,
- οι περιοχές ειδικού αρχαιολογικού ενδιαφέροντος,

- η ύπαρξη οικισμών
- η προσβασιμότητα στα εθνικά αστικά κέντρα (πόλοι κατανάλωσης – εμπορικοί λιμένες),
- η προσβασιμότητα σε χερσαίες εκτάσεις,

γ) Χαρακτηριστικά αναπτυξιακού χαρακτήρα (οικονομικά-κοινωνικά κριτήρια)

- Περιορισμός της ανεργίας,
- Συνεργατικές δραστηριότητες,
- Παραδοσιακή ενασχόληση με την αλιεία ή και τις υδατοκαλλιέργειες
- Δυνατότητες Δημόσιας ή Κοινοτικής χρηματοδότησης

Τα παραπάνω κριτήρια χρησιμοποιήθηκαν ώστε να αξιολογηθούν οι θαλάσσιες περιοχές της Ελληνικής επικράτειας και να αναπτυχθεί ανάλογα η υδατοκαλλιεργητική δραστηριότητα. Υπάρχουν όμως και ειδικότεροι όροι, οι οποίοι είτε δεν επιτρέπουν την ίδρυση και λειτουργία υδατοκαλλιεργειών είτε επιβάλλουν περιορισμούς σε αυτές.

Οι απαγορευτικοί όροι της ίδρυσης υδατοκαλλιεργειών αφορούν στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Σε περιοχές που χρησιμοποιούνται ως πεδία βολής από τις ένοπλες δυνάμεις.
- Σε περιοχές που χρησιμοποιούνται ως διάυλοι ναυσιπλοΐας, ως διάυλοι αγωγών ή καλωδίων μεταφοράς ενέργειας ή και τηλεπικοινωνιών.
- Σε περιοχές που προστατεύονται από το Ευρωπαϊκό Οικολογικό Δίκτυο Natura 2000 και αναπτύσσονται λειμώνες του είδους *Posidonia oceanica*
- Σε λίμνες που τα νερά τους προορίζονται για ύδρευση
- Σε περιπτώσεις που θαλάσσιες περιοχές έχουν κριθεί ακατάλληλες για καλλιέργεια οστρακοειδών ή σε περιπτώσεις που τα ποτάμια ή τα λιμναία οικοσυστήματα (καλλιέργεια πέστροφας / κυπρίνου) χρήζουν προστασίας ή βελτίωσης της ποιότητάς τους.

Με περιοριστικούς όρους, που ορίζονται από τις αρμόδιες αντίστοιχα υπηρεσίες, επιτρέπεται να ιδρυθούν και να λειτουργήσουν υδατοκαλλιεργητικές μονάδες σε περιοχές Ενάλιων Αρχαιολογικών Χώρων ή και σε προστατευόμενες περιοχές του Δικτύου Natura 2000.

Επιπλέον των παραπάνω όρων, οι οποίοι συνδέονται με ειδικά θεσμικά καθεστώτα, για κάθε τύπο υδατοκαλλιέργειας ισχύουν και επιπλέον κριτήρια – περιορισμοί ως προς τη χωροθέτησή τους. Οι όροι αυτοί παρατίθενται, στο παρόν σύγγραμμα, στις παραγράφους που αναφέρονται αντίστοιχα σε κάθε σύστημα υδατοκαλλιέργειας. (Καραμανλής, 2018)

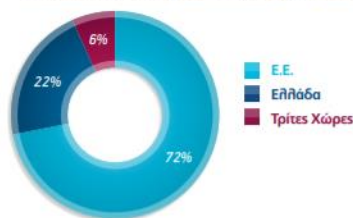
1.8 Εμπορία μεσογειακών ιχθύων

Ο κλάδος της μεσογειακής ιχθυοκαλλιέργειας είναι έντονα εξωστρεφής αφού διαχρονικά σχεδόν το 80% της παραγωγής διατίθεται σε αγορές της Ευρωπαϊκής Ένωσης αλλά και τρίτων χωρών. Σύμφωνα με τα διαθέσιμα στοιχεία και τις εκτιμήσεις, η τάση αυτή διατηρήθηκε και το 2019. Το 72% των πωλήσεων διατέθηκε σε αγορές της Ε.Ε., το 6% σε τρίτες χώρες και το 22% στην εγχώρια αγορά όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 1.7(α). Τα προϊόντα ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας διατέθηκαν σε 42 χώρες παγκοσμίως. Οι κυριότερες αγορές ωστόσο είναι στην Ε.Ε. όπου παραδοσιακά οι Ιταλία, Ισπανία και Γαλλία απορροφούν σχεδόν το μεγαλύτερο μέρος της Ελληνικής παραγωγής (60% το 2019). Στο Σχήμα 1.7(β) απεικονίζεται ποιες είναι οι κυριότερες αγορές της ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας για το έτος 2019.

Αναλυτικότερα, το 2019 πωλήθηκαν εκτός Ελλάδας 88.651 τόνοι αξίας 420,1 εκ. ευρώ παρουσιάζοντας αύξηση 4% ως προς τον όγκο. Η αξία εξαγωγών παρέμεινε σταθερή λόγω των πιεσμένων τιμών καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Από το σύνολο των εξαγωγών, το 93% (81.973 τόνοι) διατέθηκε σε 25 αγορές της Ε.Ε. και το 7% (6.678 τόνοι) σε 17 τρίτες χώρες. Η εγχώρια αγορά εκτιμάται σε 25.000 – 26.000 τόνους. Σχεδόν το σύνολο των εξαγωγών ήταν νωπά ψάρια και μόλις το 0,5% (395 τόνοι) κατεψυγμένα ψάρια που πουλήθηκαν κυρίως σε τρίτες χώρες. Το 52% του όγκου εξαγωγών (46.200 τόνοι αξίας 219,2 εκ. ευρώ) ήταν τσιπούρα και το 48% λαβράκι (42.450 τόνοι αξίας 200,8 εκ. ευρώ). Το 2019 καταγράφηκε μικρή εξαγωγική δραστηριότητα και σε 11 νέες τρίτες χώρες. Στο Σχήμα 1.7(γ) παριστάνονται οι εξαγωγές της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει ωστόσο και το γεγονός πως η Ελλάδα αποκτά ολοένα και μεγαλύτερο ρόλο στη διακίνηση ανταγωνιστικών προϊόντων στην Ε.Ε., και συγκεκριμένα τουρκικών ψαριών. Σύμφωνα με τα στοιχεία της ΑΑΔΕ, το 2019 οι εισαγωγές τουρκικών ψαριών στην Ελλάδα αυξήθηκαν κατά 25%. Συγκεκριμένα εισήχθησαν 13.781 τόνοι νωπών ψαριών από Τουρκία (5.476 τόνοι τσιπούρας και 7.894 τόνοι λαβρακιού) τα οποία αφού εκτελωνίστηκαν, τέθηκαν σε ελεύθερη κυκλοφορία και στη συνέχεια επαναπροωθήθηκαν (ως τούρκικο ψάρι) σε άλλες χώρες της Ε.Ε.. Σύμφωνα με τα στοιχεία της Turkstat, η Ελλάδα έχει καταστεί η 2η μεγαλύτερη αγορά της Τουρκίας στην Ε.Ε. (ΣΕΘ, 2019).

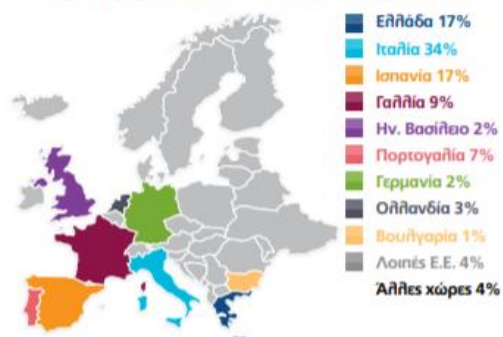
Πωλήσεις Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας 2019



Σχήμα 1.7(α) Πωλήσεις Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας 2019

[Πηγή: ΣΕΘ, ΕΛΣΤΑΤ]

Κύριες αγορές Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας 2019



Σχήμα 1.7(β) Οι κυριότερες αγορές της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας για το 2019

[Πηγή: ΣΕΘ, Kontali]

Εξαγωγές Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας 2019



Σχήμα 1.7(γ) Εξαγωγές της Ελληνικής ιχθυοκαλλιέργειας 2019

[Πηγή: ΣΕΘ, Kontali]

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2 ΠΕΡΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ ΝΕΡΟΥ ΚΑΙ ΕΝ ΓΕΝΕΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΤΙΣ ΙΧΘΥΟΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΕΣ ΜΟΝΑΔΕΣ

Η φυσική παρουσία και η φυσιολογική ανάπτυξη όλων των υδρόβιων οργανισμών, όπως η υδρόβια βλάστηση, η ιχθυοπανίδα, οι πλαγκτονικοί και διάφοροι άλλοι οργανισμοί, εξαρτώνται από τα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νερού στο οποίο διαβιούν. Ωστόσο, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά δεν είναι οι μόνοι παράμετροι που επηρεάζουν την βιωσιμότητα και την εκτροφή των οργανισμών μιας υδατοκαλλιέργειας, αλλά σημαντικό παράγοντα αποτελούν οι παράμετροι που θα επιτρέψουν την αποδοτικότερη ανάπτυξη αυτών. Το υδάτινο περιβάλλον αποτελεί τον τελικό αποδέκτη μιας λεκάνης απορροής, το οποίο δέχεται τις εκροές ρύπανσης αυτής. Παράλληλα, δέχεται και τις εκροές από την δραστηριότητα των υδατοκαλλιεργειών, της ευρύτερης περιοχής, όπως υπολείμματα τροφών, φυσικές απεκκρίσεις των υδρόβιων οργανισμών, φαρμακευτικές αγωγές κ.ά. Λόγω των παραπάνω παραγόντων που αναφέρθηκαν, φαίνεται τελικά ότι οι ευνοϊκές συνθήκες που υπάρχουν στο υδάτινο περιβάλλον μιας υδατοκαλλιέργειας, μπορούν πολύ εύκολα να μεταβληθούν και να οδηγήσουν στην μείωση της παραγωγής, στην εμφάνιση ασθενειών, ή ακόμα και στην καταστροφή τους. (Καραμανλής, 2018)

2.1 ΦΥΣΙΚΟ-ΧΗΜΙΚΕΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ

2.1.1 Το διαλυμένο οξυγόνο

Το οξυγόνο αποτελεί πηγή ζωής για όλους τους υδρόβιους οργανισμούς, και για τους μικροοργανισμούς αλλά και για μεγαλύτερου μεγέθους οργανισμούς όπως είναι τα ψάρια, τα μαλάκια ή τα καρκινοειδή πολλά από τα οποία αποτελούν είδη εντατικών υδατοκαλλιεργειών.

Η διαλυτότητα του οξυγόνου στο νερό εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την αλατότητα του νερού και την ατμοσφαιρική πίεση (το υψόμετρο που βρίσκεται η υδατοσυλλογή και το βάθος της). Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία και η αλατότητα τόσο μικραίνει η διαλυτότητα του οξυγόνου στο νερό, ενώ όσο αυξάνεται η πίεση τόσο αυξάνει και η διαλυτότητα. Όταν η ποσότητα του διαλυμένου οξυγόνου αντιστοιχεί στο 100% της ποσότητας που μπορεί να διαλυτοποιηθεί από την διεπιφάνεια της ατμόσφαιρας υπό τις ισχύουσες συνθήκες θερμοκρασίας, αλατότητας και ατμοσφαιρικής πίεσης, τότε το νερό θεωρείται κορεσμένο σε οξυγόνο και με τη χρήση οξυγονόμετρου προσδιορίζεται συγκέντρωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου. Τα σύγχρονα οξυγονόμετρα διαθέτουν θερμόμετρο, λειτουργία ρύθμισης υψομέτρου και αλατότητας προκειμένου το τελικό αποτέλεσμα να προσαρμόζεται στις αντίστοιχες συνθήκες θερμοκρασίας, αλατότητας και ατμοσφαιρικής πίεσης. Οι συγκεντρώσεις εκφράζονται σε mg O₂/L νερού.

Το θαλασσινό νερό έχει κατά 18% μικρότερη ικανότητα διάλυσης οξυγόνου απ' ό,τι το γλυκό. Ο κορεσμός του οξυγόνου στις υδατοκαλλιέργειες πρέπει να είναι μεγαλύτερος από 70%. Η έννοια της διαλυτότητας του οξυγόνου στο νερό διαφέρει από την έννοια της συγκέντρωσής του σε αυτό. Η διαλυτότητα εκφράζει την ικανότητα διάλυσης ώστε να υπάρξει κορεσμός, ενώ η συγκέντρωση αναφέρεται στην ποσότητα του οξυγόνου που είναι ήδη διαλυμένο ανά λίτρο νερού κατά τη δεδομένη στιγμή της μέτρησης. Στην επιφάνεια των υδάτινων οικοσυστημάτων, λόγω του ότι οι θερμοκρασίες είναι υψηλότερες απ' ότι στα βαθύτερα στρώματα, η ικανότητα διάλυσης του οξυγόνου είναι μικρότερη. Αντίθετα, στα βαθύτερα στρώματα των νερών λόγω της χαμηλότερης θερμοκρασίας και της αυξημένης πίεσης (1ατμόσφαιρα/10 μέτρα) η ικανότητα διάλυσης είναι μεγαλύτερη. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως οι συγκεντρώσεις του διαλυμένου οξυγόνου στα επιφανειακά στρώματα των νερών είναι μεγαλύτερη σε σχέση με αυτές των βαθύτερων στρωμάτων, εξαιτίας της παραγωγής περισσότερου οξυγόνου λόγω της φωτοσύνθεσης και της διάλυσης ατμοσφαιρικού οξυγόνου ιδιαίτερα σε περιπτώσεις που επικρατούν ισχυροί κυματισμοί. Παρ' όλα αυτά, στα βαθύτερα στρώματα και ανάλογα με την τροφική κατάσταση των νερών, η διέλευση του φωτός άρα και η φωτοσύνθεση είναι πιο περιορισμένη και επίσης καταναλώνεται περισσότερο οξυγόνο λόγω της αποσύνθεσης των οργανικών ουσιών που καθιζάνουν στον πυθμένα.

Το νερό εμπλουτίζεται με οξυγόνο εξαιτίας της φωτοσύνθεσης των υδρόβιων φυτικών οργανισμών, όπως φυτοπλαγκτόν, φύκη, κλπ. και της διάλυσης του ατμοσφαιρικού οξυγόνου. Αντιθέτως, παρατηρείται απώλεια του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό λόγω της αναπνοής των υδρόβιων φυτικών και ζωικών οργανισμών και της αερόβιας αποσύνθεσης της νεκρής οργανικής ύλης από τους αποσυνθέτες οργανισμούς που βρίσκονται κυρίως στον πυθμένα των υδατοσυλλογών. Η οργανική ύλη είναι αποτέλεσμα της βιομάζας των νεκρών υδρόβιων φυτικών ή ζωικών οργανισμών και των αποβλήτων και λυμάτων των ανθρωπογενών δραστηριοτήτων (αστικά, γεωργικά, κτηνοτροφικά απόβλητα ή λύματα) στη λεκάνη απορροής του υδάτινου οικοσυστήματος. Η οργανική αυτή ρύπανση καταναλώνει το διαλυμένο στο νερό οξυγόνο εξαιτίας της αποσύνθεσης της οργανικής ύλης από τους μικροοργανισμούς της σαπροφυτικής αλυσίδας. Το μέγεθος της οργανικής ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων εκτιμάται επίσης από τον ρυθμό κατανάλωσης για την αποικοδόμηση της οργανικής ύλης, του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου.

Η κατανάλωση αυτή προσδιορίζεται από τις παραμέτρους του βιοχημικά απαιτούμενου οξυγόνου (BOD) και του χημικά απαιτούμενου οξυγόνου, (COD). Ως BOD ορίζεται η ποσότητα του οξυγόνου, η οποία απαιτείται από τους μικροοργανισμούς για να οξειδώσουν την οργανική ύλη των αποβλήτων, σε θερμοκρασία 20°C σε απόλυτο σκότος και σε χρονικό διάστημα 5 ημερών. Εκφράζεται σε mg O₂/L αποβλήτου. Ως COD χαρακτηρίζεται η ποσότητα του οξυγόνου που καταναλώνεται για την οξείδωση των οργανικών ουσιών κάτω από την επίδραση ενός ισχυρού οξειδωτικού και εκφράζεται επίσης σε mg O₂/L

αποβλήτου. Οι τιμές του COD είναι κατά πολύ υψηλότερες αυτών του BOD, εξαιτίας του ότι το ισχυρό οξειδωτικό μπορεί να οξειδώσει ουσίες τις οποίες δεν μπορούν να οξειδώσουν οι μικροοργανισμοί.

Σύμφωνα με τους *Alabaster and Lloyd (1980)*, όταν οι συγκεντρώσεις διαλυμένου οξυγόνου στο νερό είναι μικρότερες από 5 mg O₂/L μπορούν να προκαλέσουν προβλήματα στη λειτουργία και την επιβίωση των υδρόβιων οργανισμών, ενώ σε συγκεντρώσεις μικρότερες από 2 mg O₂/L μπορούν να προκαλέσουν ακόμα και τον θάνατο στα περισσότερα είδη ψαριών. Ωστόσο, η επίδραση των χαμηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου ή ακόμη και η πλήρης έλλειψη του διαφέρει ανάμεσα στα διάφορα είδη ψαριών, στα στάδια ανάπτυξής τους, όπως και κατά τη διάρκεια των δραστηριοτήτων τους (λήψη τροφής, ανάπτυξη, αναπαραγωγή, κολύμβηση). Σε περιπτώσεις υψηλής οργανικής ρύπανσης, η αποδόμηση των οργανικών ουσιών, μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση συνθηκών πολύ χαμηλού οξυγόνου στο νερό και στην εγκαθίδρυση αναερόβιας αποικοδόμησης τους. Στην περίπτωση αυτή, η μείωση του διαλυτού οξυγόνου στο νερό γίνεται δραματική ενώ παράλληλα παράγονται τα τοξικά αέρια H₂S, CH₄, NH₃. (*Καραμανλής, 2018*)

2.1.2 pH

Το pH του νερού, υπό φυσιολογικές συνθήκες (μη ρύπανσης), ρυθμίζεται κυρίως από τη σχετική αναλογία του ελεύθερου διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και των όξινων (HCO₃⁻) και ανθρακικών ριζών (CO₃⁼) και καθορίζεται από την συγκέντρωση ιόντων H⁺. (*Chapman, 1992*)

Το pH του θαλασσινού νερού κυμαίνεται μεταξύ 7,5 – 8,5 και οι τιμές του διατηρούνται σταθερότερες σε σύγκριση με αυτές των γλυκών νερών τα οποία επηρεάζονται από την παρουσία όξινων βροχών καθώς και από τη σύσταση των εδαφών μιας περιοχής.

Η παρουσία του φαινομένου του ευτροφισμού επηρεάζει το pH των υδάτινων οικοσυστημάτων, με αποτέλεσμα αυτό να μεταβάλλεται προς το αλκαλικό, οπότε η έντονη φωτοσυνθετική δραστηριότητα των φυτικών οργανισμών δεσμεύει το διοξείδιο του άνθρακα από το νερό. Ως επακόλουθο της αύξησης του pH του νερού είναι η τοξίκωση των ψαριών από την αμμωνία που αδυνατούν να αποβάλλουν από τα βράγχιά τους, εξαιτίας του αλκαλικού περιβάλλοντος. Το κατάλληλο pH για τα περισσότερα ψάρια κυμαίνεται μεταξύ 6,5 -8,5. (*Καραμανλής, 2018*)

2.1.3 Θρεπτικά Συστατικά (ενώσεις Αζώτου και Φωσφόρου)

Τα άζωτο (N) και ο φώσφορος (P) αποτελούν τα κύρια θρεπτικά συστατικά για τους υδρόβιους φυτικούς οργανισμούς προκειμένου να συνθέσουν τις πρωτεΐνες. Οι κυριότερες πηγές θρεπτικών ουσιών στα υδάτινα οικοσυστήματα είναι οι εισροές ποταμών που μεταφέρουν εκπλύσεις των γεωργικών καλλιεργειών

(λιπάσματα N,P,K), ή κτηνοτροφικών και αστικών λυμάτων (απορρυπαντικά), ακόμη και μετά την επεξεργασία των τελευταίων.

Το άζωτο προσλαμβάνεται από τους χερσαίους αλλά και από τους υδρόβιους φυτικούς οργανισμούς με τη μορφή αλάτων. Οι κυριότερες ανόργανες μορφές του αζώτου που χρησιμοποιούνται από τους υδρόβιους φωτοσυνθετικούς οργανισμούς είναι σε μορφή αλάτων, όπως νιτρικών (NO_3^-), νιτρώδων (NO_2^-) και αμμωνιακών (NH_4^+). Τα κυανοφύκη (κυανοβακτήρια) μπορούν να χρησιμοποιήσουν και ατμοσφαιρικό άζωτο (N_2). Ιδιαίτερη σημασία για την επιβίωση των υδρόβιων ζωικών οργανισμών έχει το ποσοστό του αζώτου με τη μορφή της ελεύθερης (μη ιονισμένης) αμμωνίας (NH_3) που συνυπάρχει με τις άλλες μορφές αζώτου στα υδάτινα οικοσυστήματα. Η αμμωνία αποτελεί προϊόν απέκκρισης του μεταβολισμού των ιχθύων και έχει τοξικές ιδιότητες. Η συγκέντρωση της αμμωνίας που μπορεί να την καταστήσει θανατηφόρο κυμαίνεται ανά είδος ιχθύος μεταξύ 0,2 - 2,0 mg NH_3/L , (Alabaster and Lloyd, 1980). Η παρουσία της σε σχέση με την παρουσία αμμωνίου (NH_4^+) εξαρτάται από το pH των νερών.

Αντίστοιχα, οι υδρόβιοι φυτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν ως πηγή φωσφόρου τα ορθοφωσφορικά (P-PO_4) άλατα. Ο φώσφορος αποτελεί συνήθως τον περιοριστικό παράγοντα της ανάπτυξης των φυτικών υδρόβιων οργανισμών και λόγω του ότι είναι στοιχείο αδιάλυτο στο νερό, τα ιόντα του σε συνδυασμό με την παρουσία σιδήρου (Fe), αργιλίου (Al) και ασβεστίου (Ca) σχηματίζουν δυσδιάλυτα άλατα που καθιζάνουν στον πυθμένα των υδάτινων οικοσυστημάτων (ιζηματοποίηση). Από εκεί έχει τη δυνατότητα κάτω από φυσικές ή και χημικές διεργασίες να επανέλθει στη στήλη του νερού δημιουργώντας κατ' αυτόν τον τρόπο «ενδογενή ρύπανση». Μόνο κάτω από αναερόβιες συνθήκες, στον πυθμένα των υδατοσυλλογών ο φώσφορος απελευθερώνεται και εισέρχεται στην υδάτινη μάζα. (Ricklefs, 1996)

Η ανάπτυξη των φυτικών οργανισμών εξαρτάται από την αναλογία με την οποία είναι διαθέσιμα τα θρεπτικά συστατικά άζωτο (N)/φώσφορο (P), η αναλογία αυτή είναι $\text{N/P}=16/1$. Όταν η αναλογία αυτή διαταράσσεται, η ανάπτυξη των φυτών περιορίζεται και η έλλειψη του στοιχείου που την προκαλεί καθορίζει την έννοια του «περιοριστικού παράγοντα». Η εκτίμηση του περιοριστικού παράγοντα γίνεται είτε με τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων και τη σύγκριση του Ολικού Αζώτου/Ολικού Φωσφόρου, είτε με τον προσδιορισμό των συγκεντρώσεων και τη σύγκριση του αθροίσματος των ανόργανων μορφών αζώτου ($\text{N-NO}_2 + \text{N-NO}_3 + \text{N-NH}_4$) προς τον ανόργανο φώσφορο (P-PO_4). Εξαιτίας τόσο των εισροών όσο και των βιοχημικών δραστηριοτήτων στα υδάτινα οικοσυστήματα η αναλογία N/P διαταράσσεται ακόμη και εποχιακά. (Κιλικίδης κ.ά., 1998). Ο ποσοτικός προσδιορισμός των ανόργανων ενώσεων του αζώτου και του φωσφόρου γίνεται με τη χρήση μεθόδων της φασματοφωτομετρίας ή και της ιονικής χρωματογραφίας, ενώ του οργανικού αζώτου με τη μέθοδο Kjeldahl. (APHA, 2005).

Τα χημικά λιπάσματα αποτελούνται κυρίως από τρία βασικά θρεπτικά συστατικά των φυτικών οργανισμών, δηλαδή ανόργανων ενώσεων του αζώτου (NO_3^-), του φωσφόρου (P_2O_5) και του καλίου (K). Τα ζωικά απόβλητα (κοπριά) χρησιμοποιούνται ως λιπάσματα στη γεωργία λόγω της μεγάλης περιεκτικότητάς τους στα στοιχεία αυτά. Η εφαρμογή επομένως χημικών λιπασμάτων ή ζωικών αποβλήτων στις γεωργικές καλλιέργειες, σε βαθμό που να υπερκαλύπτει τις ανάγκες των φυτών σε θρεπτικές ουσίες, μπορεί να προκαλέσει ρύπανση των επιφανειακών και υπόγειων νερών. Κατά την έκπλυση των καλλιεργούμενων εδαφών από τα ατμοσφαιρικά κατακρημνίσματα γίνεται μεταφορά των θρεπτικών ουσιών των φυτών στα επιφανειακά ή και τα υπόγεια νερά, με αποτέλεσμα την ρύπανση τους. Επίσης, τα αστικά λύματα περιέχουν μεγάλες ποσότητες φωσφόρου εξαιτίας της χρήσης απορυπαντικών (Kilikidis et al., 1994b). Ποσότητες φωσφορικών και νιτρικών αλάτων μεταφέρονται μέσω των επιφανειακών απορροών και προκαλούν ευτροφισμό σε λίμνες, ποτάμια, εκβολές ποταμών και παράκτιες περιοχές.

Ο **ευτροφισμός** είναι το περιβαλλοντικό φαινόμενο κατά το οποίο η υπέρμετρη αύξηση της συγκέντρωσης θρεπτικών στοιχείων συνεπάγεται τη μείωση του διαλυμένου οξυγόνου στο νερό και κατά συνέπεια την αλλοίωση της βιοποικιλότητας σε αυτό. Το φαινόμενο αυτό παρουσιάζεται συνήθως σε λίμνες ή κλειστούς αβαθείς κόλπους. Ο ευτροφισμός προκαλείται από τον εμπλουτισμό των υδάτων με απορροές θρεπτικών στοιχείων. Τα θρεπτικά αυτά στοιχεία μπορεί να είναι νιτρικά και φωσφορικά ιόντα από λιπάσματα, απορυπαντικά και οργανικά απόβλητα. Αυτά όταν αποδομηθούν, παράγουν θρεπτικά συστατικά, τα οποία είναι η βασική τροφή για το φυτοπλαγκτόν και τα υδρόβια φυτά, που είναι καταναλωτές μεγάλων ποσοτήτων οξυγόνου, μειώνοντας έτσι και τη βιοποικιλότητα στο νερό. Η έλλειψη οξυγόνου, οδηγεί σε αναερόβιες συνθήκες μέσα στο νερό, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή τοξικών ουσιών όπως είναι το μεθάνιο, η αμμωνία, το υδρόθειο και η φωσφίνη. Τα βακτήρια και τα φύκη αυξάνονται σε αριθμό τόσο, που σχηματίζουν επικάλυμμα στις υδάτινες επιφάνειες, προκαλώντας σκίαση στο νερό κάτω από την επιφάνεια. Χωρίς φως, οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί στον πυθμένα θανατώνονται, προσφέροντας ακόμη μεγαλύτερη ποσότητα τροφής σε άλλα βακτήρια, που συνεχίζουν να αναπτύσσονται. Καθώς ο αριθμός των βακτηρίων αυξάνεται, η κατανάλωση του διαλυμένου στο νερό οξυγόνου αυξάνεται δραματικά, ενώ η παραγωγή ελαττώνεται, με αποτέλεσμα να μην υπάρχει οξυγόνο για τους μη φωτοσυνθετικούς οργανισμούς, όπως, π.χ. τα ψάρια. Αποτέλεσμα του ευτροφισμού είναι η μεταβολή της χλωρίδας και πανίδας των υδροβιότοπων καθώς όμως και οι περιορισμένες δυνατότητες για αναψυχή.

Σε ό,τι αφορά στις υδατοκαλλιέργειες η παραγωγικότητα στα υδάτινα οικοσυστήματα έχει θετικές και αρνητικές επιπτώσεις. Οι θετικές επιπτώσεις, συνίστανται στο ότι η ανάπτυξη φυτοπλαγκτονικών οργανισμών δίνει είτε άμεσα τροφή στους υδρόβιους οργανισμούς είτε έμμεσα εξαιτίας της ταυτόχρονης ανάπτυξης όλων των οργανισμών (ζωοπλαγκτόν, βενθικοί οργανισμοί) της υδάτινης τροφικής αλυσίδας.

Επιπλέον, η ανάπτυξη των υδρόβιων φυτικών οργανισμών (φυτοπλαγκτόν, υδρόβια φυτά) εμπλουτίζει το νερό, μέσω της φωτοσυνθετικής τους δραστηριότητας, με οξυγόνο. Στη μεσότροφη κατάσταση, τα υδάτινα οικοσυστήματα χαρακτηρίζονται από την αύξηση της συνολικής παραγωγικότητάς τους και την ποικιλομορφία των ειδών που διαβιούν σε αυτά. Αυτό, δίνει τη δυνατότητα της φυσικής παρουσίας αλλά και της υδατοκαλλιέργειας μεγαλύτερου αριθμού «επιθυμητών» υδρόβιων οργανισμών. Αντίθετα στις εύτροφες και πολύ περισσότερο στις υπereύτροφες καταστάσεις στα υδάτινα οικοσυστήματα, παρατηρείται, μετά από την αρχική εκρηκτική ανάπτυξη (blooms), σταδιακή μείωση της παραγωγικότητας, μείωση της ποικιλομορφίας των ειδών που διαβιούν σε αυτά, αλλοίωση των ποιοτικών χαρακτηριστικών του νερού με επικράτηση αντίξων για την επιβίωση των υδρόβιων οργανισμών και τέλος τη μείωση του αριθμού των ειδών των «επιθυμητών» για υδατοκαλλιέργεια υδρόβιων οργανισμών.

Στις άμεσες αρνητικές συνέπειες του φαινομένου αυτού στα υδάτινα οικοσυστήματα συμπεριλαμβάνονται: η υπερβολική αύξηση της βιομάζας των φυτικών οργανισμών, το μεγαλύτερο μέρος της οποίας καθιζάνει στα ιζήματα του πυθμένα, όπου και αποδομείται καταναλώνοντας οξυγόνο καθώς και η αποτροπή της διείσδυσης της ηλιακής ακτινοβολίας στη στήλη του νερού και στην αποτροπή της φωτοσυνθετικής δραστηριότητας ακόμη και σε μερικά εκατοστά της στήλης κάτω από την επιφάνεια. Η εξάντληση του διαλυμένου οξυγόνου μειώνει τους ρυθμούς ανάπτυξης των ψαριών και σε ακραίες αλλά όχι σπάνιες περιπτώσεις οδηγεί στο θάνατό τους. Σε υπereύτροφες καταστάσεις παρατηρούνται ακόμη και ομαδικοί θάνατοι ψαριών, εξαιτίας της παντελούς σχεδόν έλλειψης οξυγόνου. Επιπλέον, λόγω των αναερόβιων συνθηκών που επικρατούν, παράγονται τοξικά αέρια, όπως το μεθάνιο, η αμμωνία και το υδρόθειο, που είναι εξαιρετικά επικίνδυνα για τους υδρόβιους οργανισμούς.

2.1.4 Βαρέα μέταλλα

Τα απόβλητα των βιομηχανιών αποτελούν την κυριότερη πηγή ρύπανσης της υδρόσφαιρας με βαρέα μέταλλα. Επίσης, τα αστικά λύματα, τα κατάλοιπα από τα καύσιμα, τα ελαστικά των οχημάτων και οι γεωργικές καλλιέργειες μέσω της έκπλυσης των λιπασμάτων και των φυτοφαρμάκων που περιέχουν μεταλλικά ιχνοστοιχεία αποτελούν πηγές ρύπανσης των υδάτινων οικοσυστημάτων με βαρέα μέταλλα. Η ρύπανση των υδάτων με βαρέα μέταλλα προκαλείται επίσης από την διάβρωση του εδάφους, όπως και από τα ατμοσφαιρικά κατακρημνίσματα.

Η μείωση του διαλυμένου οξυγόνου στα νερά αυξάνει την τοξικότητα των αλάτων των μετάλλων, ενώ αντίθετα η τοξικότητά τους μεταβάλλεται ανάλογα με τη σκληρότητα των νερών, (EPA, 2004). Τα κυριότερα μέταλλα που συνδέονται με τοξικώσεις των ψαριών είναι: ο υδράργυρος (Hg), το κάδμιο (Cd), ο ψευδάργυρος (Zn), το χρώμιο (Cr), ο μόλυβδος (Pb), το σελήνιο (Se), ο χαλκός (Cu) και το αρσενικό (As).

Η τοξικότητα των μετάλλων αυτών αυξάνεται σε περιπτώσεις συνέργειας τους, όπως για παράδειγμα του Cd ή του Zn παρουσία Cu. Ιδιαίτερα τοξικός είναι ο υδράργυρος στη μεθυλιωμένη του μορφή.

Πίνακας 2.1 Τα ανώτατα όρια για τη μέγιστη και τη συνεχή συγκέντρωση μετάλλων σε γλυκά και αλμυρά νερά

Μέταλλο	Γλυκά νερά		Αλμυρά νερά	
	Μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση (μg/l)	Διαρκής επιτρεπόμενη συγκέντρωση (μg/l)	Μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση (μg/l)	Διαρκής επιτρεπόμενη συγκέντρωση (μg/l)
Αρσενικό	340	150	69	36
Κάδμιο	2	0,25	40	8,8
Χρώμιο (VI)	16	11	1100	50
Χαλκός	13	9	4,8	3,1
Μόλυβδος	65	2,5	210	8,1
Υδράργυρος	1,4	0,77	1,8	0,94
Σελήνιο	-	5	290	71
Ψευδάργυρος	120	120	90	81

Στον Πίνακα 2.1, δίνονται οι ανώτατες συγκεντρώσεις των κυριότερων μετάλλων, οι οποίες χρησιμοποιούνται ως όρια ασφαλείας για την ποιότητα των γλυκών και αλμυρών νερών σε σχέση με την μέγιστη και τη συνεχή παρουσία τους, σύμφωνα με την Υπηρεσία για την Ποιότητα του Περιβάλλοντος των Η.Π.Α., (EPA, 2004)

Η μακροσκοπική εικόνα της τοξίκωσης των ψαριών από μέταλλα είναι η εκδήλωση ανησυχίας, η αύξηση του αναπνευστικού ρυθμού, η υπερέκκριση βλέννας, η εξασθένηση (που εκδηλώνεται με την πλάγια θέση του σώματος), και τέλος η ασφυξία.

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των μετάλλων στο νερό, στα ιζήματα και στη σάρκα των υδρόβιων οργανισμών γίνεται κυρίως με τη χρήση μεθόδων της φασματοσκοπικής ατομικής απορρόφησης, (Atomic Absorption Spectroscopy, AAS), ή άλλες συναφείς φασματοσκοπικές τεχνικές. (APHA, 2005)

2.1.5 Οργανικοί χημικοί ρύποι

Τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs) αποτελούν ομάδα ανθεκτικών χλωριωμένων υδρογονανθράκων που έχουν την ιδιότητα να συγκεντρώνονται τόσο στο αβιοτικό περιβάλλον όσο και στους οργανισμούς. Τα PCBs δεν υπάρχουν στη φύση, αλλά παράγονται τεχνητά και χρησιμοποιούνται στην ήλεκτρο-βιομηχανία για την κατασκευή πυκνωτών και μετασχηματιστών λόγω της ιδιότητάς τους ως μη εύφλεκτα υλικά. Επιπλέον, βρίσκουν εφαρμογή στη σύσταση λιπαντικών λαδιών, σε υδραυλικά συστήματα, σε πλαστικά, σε χρώματα και μελάνια καθώς επίσης και σε στεγανοποιητικά υλικά. Τα PCBs είναι χημικά σταθερά και ανθεκτικά στη θέρμανση και στην υδρόλυση. Στα υδάτινα οικοσυστήματα προσροφούνται από τα αιωρούμενα στερεά και καθιζάνουν με αυτά. Είναι λιποδιαλυτές ενώσεις και ως τέτοιες βιοσυγκεντρώνονται στους υδρόβιους οργανισμούς και βιομεγελνθύνονται στην τροφική τους αλυσίδα. Εξαιτίας της λιποδιαλυτότητάς τους, η οξεία τοξική τους δράση είναι χαμηλή οπότε απασχολούν περισσότερο με τη χρόνια τοξική τους επίδραση. Σε ότι αφορά στους υδρόβιους οργανισμούς, σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,1 ppb), προκαλούν παρεμπόδιση της ανάπτυξης φυτό-πλαγκτονικών οργανισμών (διάτομα), ενώ τα καρκινοειδή είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα. Αντίστοιχα, οι *Dosis et al.*, (2011 και 2016) διαπίστωσαν την παρουσία πολυβρωμιωμένων διφαινυλίων (PBDs) στα νερά, στα ιζήματα και στα μύδια του Θερμαϊκού κόλπου.

Οι οργανοφωσφορικές ενώσεις χρησιμοποιούνται ευρέως για την καταπολέμηση των εντόμων στις γεωργικές καλλιέργειες. Οι οργανικές ενώσεις του κασσίτερου χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία των πλαστικών (σταθεροποίηση των πολυβινυλοχλωριδίων, PVC), των χρωμάτων και ως βιοκτόνα για την αποτροπή των βιολογικών αποθέσεων στα ύφαλα των πλοίων και των εγκαταστάσεων των ιχθυοκαλλιεργειών που βρίσκονται σε επαφή με το νερό (δίκτυα, πλωτήρες, εξέδρες). Η χρήση των ενώσεων κασσίτερου έχει απαγορευτεί ή περιοριστεί στους χώρους των ιχθυοκαλλιεργειών, εξαιτίας της υψηλής τοξικότητάς τους.

Το πετρέλαιο και τα προϊόντα του είναι υδρογονάνθρακες και αποτελούν σημαντικό ρύπο των υδάτινων οικοσυστημάτων. Η κύρια πηγή ρύπανσης είναι τα ναυτικά ατυχήματα, ο καθαρισμός των δεξαμενόπλοιων, οι πλωτές εξέδρες εξόρυξης πετρελαίου και τα αστικά λύματα. Οι επιπτώσεις από τη ρύπανση με πετρέλαιο ή τα προϊόντα του στους υδρόβιους οργανισμούς μπορεί να είναι άμεσες (σε περιπτώσεις εκτεταμένης ρύπανσης) ή και έμμεσες με την έννοια της χρόνιας τοξίκωσης. Οι χρόνιες επιπτώσεις αφορούν προβλήματα που εκδηλώνονται στον μεταβολισμό, στην αναπαραγωγή και στην ανάπτυξη των υδρόβιων οργανισμών ενώ οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH) θεωρούνται υπεύθυνοι για την καρκινογόνο και μεταλλαξιογόνο τους δράση. (Καμαριανός, 2000).

Οι οργανικοί χημικοί ρύποι προσδιορίζονται ποιοτικά και ποσοτικά με τις μεθόδους της αέριας χρωματογραφίας και της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης. Οι σύγχρονες οργανολογίες χρωματογραφίας- φασματομετρία μάζας πετυχαίνουν πολύ χαμηλά όρια ανίχνευσής τους. (Kilikidis *et al.*, 1994).

Η ρύπανση των αποβλήτων και των επιφανειακών υδάτων από διάφορους οργανικούς χημικούς ρύπους (π.χ. φαρμακευτικά και οι μεταβολίτες τους) είναι ευρέως γνωστή σήμερα. Τα φαρμακευτικά προϊόντα και οι μεταβολίτες τους που είναι παρόντα σε ρυπασμένα νερά, θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά τους υδάτινους οργανισμούς όπως αλλαγές στη συμπεριφορά, αλλοίωση των ιστολογικών και βιοχημικών παραμέτρων όπως και αναπαραγωγικές τροποποιήσεις που έχουν παρατηρηθεί. Από οικοτοξικολογικής, οικολογικής άποψης και της ασφάλειας των τροφίμων, είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε αν τα φαρμακευτικά προϊόντα εισέρχονται στα ψάρια και σε άλλους υδάτινους οργανισμούς.

Η ανάπτυξη εξαιρετικά εκλεκτικών αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό και την ποσοτικοποίηση των ενώσεων αυτών είναι αναγκαία. Ο συνδυασμός υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης-φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκαστήρα (HPLC-ESI-MS) θεωρείται ως η πιο ευαίσθητη και επιλεκτική αναλυτική τεχνική για τον προσδιορισμό των διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών καθώς και των μεταβολιτών τους που υπάρχουν σε σύνθετα δείγματα βιολογικής και περιβαλλοντικής προέλευσης. Ωστόσο υπάρχουν δυσκολίες όσον αφορά την επαναληψιμότητα, την ακρίβεια και την ακρίβεια του προσδιορισμού των αναλυτών-στόχων που προκαλούνται σε αυτά τα είδη δειγμάτων σε εξαιρετικά χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης. Απαιτείται η εφαρμογή φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (HRMS) για την σημαντική μείωση του κινδύνου ψευδών/θετικών αποτελεσμάτων.

Η προεπεξεργασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων είναι ένα από τα σημαντικότερα βήματα για μια επιτυχημένη αναλυτική διαδικασία των πολλαπλών υπολειμματικών ουσιών. Η προεπεξεργασία βιολογικών ή περιβαλλοντικών δειγμάτων αποτελείται από διάφορα βήματα όπως αυτό της ομογενοποίησης (homogenization), της φυγοκέντρωσης (centrifugation), της κατεργασίας με υπερήχους (sonication), της λυοφιλίωσης (freeze-drying), εκχύλιση (extraction), διήθηση (filtration) κλπ.

Σήμερα, πολλές διαφορετικές τεχνικές εκχύλισης δειγμάτων με βάση την εκχύλιση υγρού-υγρού (liquid-liquid extraction, LLE), την εκχύλιση στερεού-υγρού (solid-liquid extraction, SLE), υποβοηθούμενη εκχύλιση με υπερήχους και διαλύτη (ultrasound-assisted solvent extraction, USE), εκχύλιση πιεσιμένου υγρού (pressurized liquid extraction, PLE), εκχύλιση στερεάς φάσης (solid phase extraction, SPE), μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (microextraction, SPME), την εκχύλιση υποβοηθούμενη από μικροκύματα (microwave-assisted extraction, MAE), QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) και οι τροποποιήσεις τους χρησιμοποιούνται για την προ-συγκέντρωση φαρμακευτικών προϊόντων σε σύνθετα

δείγματα οργανισμών. Ο βασικός σκοπός της εφαρμογής μιας εκχύλισης στην ανάλυση πολλαπλών συστατικών είναι η ανάκτηση των αναλυτών (από πολικές σε μη πολικές ενώσεις) και η μείωση των συν-εκχυλισμάτων (άλατα, λιπίδια, αμίνες, πεπτίδια, κ. λ. π.) καθώς και η μείωση του συνολικού χρόνου ανάλυσης και του κόστους κατά την τακτική ανάλυση μεγάλων σειρών δειγμάτων. (Katerina Grabicova, 2018)

2.2 Οδηγίες της Ε.Ε. για επικίνδυνες ουσίες

Η Ευρωπαϊκή νομοθεσία σχετικά με την απόρριψη επικίνδυνων ουσιών στο νερό είναι εκτεταμένη κυρίως εξαιτίας του μεγάλου εύρους των ουσιών που χρειάζεται να καλυφθούν.

- Οδηγία 67/548/EEC

Αυτή η οδηγία καθορίζει τις επικίνδυνες ουσίες και απαιτεί την γνωστοποίηση όλων των καινούργιων καθώς και την αξιολόγηση της επικινδυνότητάς τους και απαιτεί να έχουν επισημανθεί κατάλληλα. Οι ουσίες ορίζονται ως επικίνδυνες εάν είναι εκρηκτικές, οξειδωτικές, εύφλεκτες, τοξικές, επιβλαβείς, διαβρωτικές. Στο πλαίσιο της παρούσας οδηγίας νοούνται ως ουσίες τα χημικά στοιχεία και ενώσεις τους όπως παρουσιάζονται στην φυσική τους κατάσταση ή όπως παράγονται από τη βιομηχανία.

- Οδηγία 76/464/EEC

Αυτή η οδηγία διαχωρίζει τις επικίνδυνες ουσίες σε δύο κατηγορίες: Η πρώτη περιέχει τις πιο επικίνδυνες ουσίες και ο στόχος είναι η εξάλειψη της ρύπανσης από αυτές. Η δεύτερη έχει σαν στόχο τη μείωση των επιπέδων ρύπανσης από τις αντίστοιχες ενώσεις.

Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει:

- Όργανο-φωσφορικές ενώσεις
- Καρκινογόνα
- Έμμονες (persistent) συνθετικές ουσίες που μπορεί να καθιστούν δυσχερή κάθε χρήση των υδάτων.

Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει:

- Ουσίες της πρώτης κατηγορίας για τις οποίες δεν έχουν καθοριστεί τιμές για τα όρια τους.
- Ο χαλκός, το σελήνιο, το αρσενικό, το βόριο και οι ενώσεις αυτών.
- Βιοκτόνα

- Ουσίες που έχουν επίδραση στη γεύση και την οσμή των προϊόντων που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση και προέρχονται από το υδρόβιο περιβάλλον, καθώς και ουσίες που ενδέχεται να προκαλέσουν αύξηση συγκέντρωσης σε τέτοιες ουσίες στο νερό.
- Ανόργανες ενώσεις του φωσφόρου που επηρεάζουν αρνητικά την ισορροπία του οξυγόνου στα φυσικά νερά.

2.3 Αναλυτικές μέθοδοι προσδιορισμού οργανικών ρύπων

Για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων και άλλων ρύπων σε τρόφιμα, έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι οι οποίες βασίζονται σε δύο βασικά στάδια:

- Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την προεργασία του δείγματος. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την εκχύλιση του δείγματος κατά την οποία διαχωρίζεται σε μεγάλο ποσοστό η ποσότητα της υπό μελέτη ουσίας από το υπόστρωμα. Στη συνέχεια ακολουθεί ο καθαρισμός του δείγματος για την απομάκρυνση των συνεκχυλιζόμενων ενώσεων οι οποίες μπορούν να επηρεάσουν αρνητικά τον προσδιορισμό των υπό μελέτη ουσιών.
- Κατά ο δεύτερο στάδιο, αρχικά πραγματοποιείται ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών-στόχων του δείγματος με την βοήθεια χρωματογραφικών τεχνικών (υγρής ή αέριας), ενώ στη συνέχεια πραγματοποιείται ο ποσοτικός προσδιορισμός των ενώσεων του δείγματος. (Καρακίτσου, 2012).

2.4 Εκχύλιση υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών προϊόντων

Το πρώτο βήμα στην ανάπτυξη ή εφαρμογή μιας αναλυτικής μεθόδου υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα και αγροτικά προϊόντα είναι η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης που θα ακολουθηθεί. Η επιλογή αυτή εξαρτάται από το υπόστρωμα που μελετάται, τις φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό μελέτη ενώσεων ενώ επίσης θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη εάν οι αναλύτες ανήκουν στην ίδια ή διαφορετική χημική κατηγορία. Για την εκχύλιση δειγμάτων τροφίμων και αγροτικών προϊόντων, έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές. Βασικές διαφορές μεταξύ των κλασσικών και των νεότερων μεθόδων είναι ότι οι νεότερες μέθοδοι χαρακτηρίζονται ως πιο απλές στη χρήση τους, έχουν ελαχιστοποιήσει την εφαρμογή οργανικών διαλυτών, είναι πιο οικονομικές και όχι τόσο χρονοβόρες όσο οι κλασσικές μέθοδοι. Βασικό ερώτημα που τίθεται σε όλες τις μεθόδους εκχύλισης είναι το κατά πόσο ανακτάται όλη η ποσότητα του αναλύτη από το υπόστρωμα με την εφαρμογή της μεθοδολογίας και για αυτόν τον λόγο πραγματοποιούνται πειράματα ανάκτησης στα οποία γνωστή ποσότητα του αναλύτη προστίθεται στο υπόστρωμα που πρόκειται να μελετηθεί, το οποίο

όμως δεν περιέχει φυτοφάρμακα (blank), ακολουθεί η εκχύλιση αυτού με την επιλεγμένη μέθοδο και υπολογίζεται η επί % ανάκτηση των ενώσεων. (Καρακίτσου, 2012). Στον Πίνακα 2.1 παρατίθενται κάποιες από τις αναλυτικές μεθόδους εκχύλισης σε ψάρια και ψαροτροφή.

Πίνακας 2.1: Αναλυτικές μέθοδοι εκχύλισης υπολειμμάτων φυτοπροσταυτικών ουσιών και οργανικών ρύπων σε υποστρώματα ιχθύων και ψαροτροφής

Analyte	Matrix	Analytical method	Rec%	LOD	LOQ	Reference
11 organochlorine pesticides (OCPs) 5 polychlorinated	fish	Solid phase extraction (SPE)	70.1-112.3%			Xu et al. 2019
25 pesticides and pharmaceuticals	fish	Solid phase extraction (SPE)				Gao et al. 2019
Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)	seafood	Solid phase microextraction (SPME)	80.2-101%			Yongli Yuana et al. 2019
47organic contaminants	fish	solid-liquid extraction (SLE)	38-104%		5-30 ng/g	Carmona et al. 2017
47organic contaminants	fish	solid-phase extraction (SPE)	38-104%		5-30 ng/g	Carmona et al. 2017
20 polychlorinated	fish	Soxhlet (SOX)	80.3-117.6%		0.01-0.02 µg/kg.	Cao et al. 2018

2.4.1 Υγρή- υγρή Εκχύλιση, LLE (Liquid- liquid Extraction)

Η υγρή- υγρή εκχύλιση ή αλλιώς εκχύλιση με διαλύτη , είναι μια από τις παλαιότερες και πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές για την προεργασία του δείγματος και την ποσοτική και ποιοτική ανάλυση.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού περιλαμβάνει την απομάκρυνση οργανικών ενώσεων με εκχύλιση, με διαλύτη μη αναμειζίμο με το υπόστρωμα του δείγματος και στηρίζεται στις σχετικές διαλυτότητες του συστατικού ανάμεσα στο διαλύτη εκχύλισης και στο υπόστρωμα του δείγματος. Από τους μη πολικούς διαλύτες πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι είναι το εξάνιο και ο οξικός αιθυλεστέρας, ενώ οι αναμειζίμοι με το νερό διαλύτες, όπως η μεθανόλη, η ακετόνη χρησιμοποιούνται για εκχύλιση των πιο πολικών ενώσεων. (Τσούτση, 2008).

Κάποια από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της μεθόδου είναι τα εξής:

- Δεν προσφέρεται η εφαρμογή τους για όλες τις ομάδες ενώσεων
- Οι διαλύτες εκχύλισης που χρησιμοποιούνται έχουν μικρή εκλεκτικότητα
- Απαιτούνται μεγάλες ποσότητες δείγματος και μεγάλος όγκος οργανικού διαλύτη
- Υπάρχει η πιθανότητα σχηματισμού γαλακτωμάτων
- Είναι αρκετά χρονοβόρα μέθοδος.

2.4.2 Εκχύλιση Soxhlet (SOX)

Οι περισσότερες εφαρμογές της εκχύλισης Soxhlet αναφέρονται σε περιβαλλοντικά δείγματα, όπως είναι τα ιζήματα ή οι βιολογικοί ιστοί, έχει όμως χρησιμοποιηθεί και για την ανάλυση δειγμάτων τροφίμων με υψηλό ποσοστό λίπους. Στη συγκεκριμένη τεχνική το δείγμα τοποθετείται σε πορώδη ηθμό μιας χρήσης, από όπου ρέει συνεχώς διαλύτης με επαναρροή εκχυλίζοντας και προσυγκεντρώνοντας τις προσδιοριζόμενες ενώσεις. Το μέγεθος του συστήματος μπορεί να ποικίλλει, αλλά οι πιο συνηθισμένες απαιτήσεις γι' αυτό είναι περίπου 100 ml διαλύτη και 5-10 g στερεού δείγματος, για εκχυλίσεις που διαρκούν από 4 έως 18 ώρες. Στο Σχήμα 2.1 απεικονίζεται η διάταξη της εκχύλισης Soxhlet. Εφαρμογές της τεχνικής αυτής περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό πολυαρωματικών υδρογονανθράκων και πολυχρωριωμένων διφαινυλίων σε δείγματα τροφίμων κ.α. (Τσούτση, 2008).

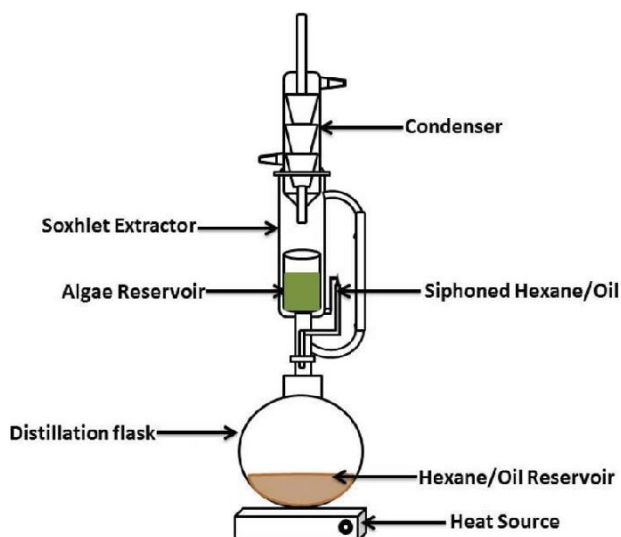
Η μέθοδος αυτή έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Πλεονεκτήματα: είναι απλή μέθοδος, μπορεί να εκχυλίσει ικανοποιητικές ποσότητες στερεού δείγματος και το τελικό εκχύλισμα δεν χρειάζεται διήθηση, περιλαμβάνει εύκολο χειρισμό στην παραλαβή εκχυλίσματος, διατήρηση σχετικά υψηλής θερμοκρασίας εκχύλισης που αυξάνει την διαλυτότητα των ενώσεων σαν χρησιμοποιούμενο διαλύτη, καλή αναπαραγωγικότητα και αποτελεσματικότητα.

Μειονεκτήματα: είναι μια αρκετά χρονοβόρα μέθοδος με μεγάλους χρόνους εκχύλισης, η εκχύλιση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες βρασμού του διαλύτη με αποτέλεσμα να δημιουργείται πρόβλημα στις θερμικά ευαίσθητες ενώσεις, δεν είναι δυνατή η χρήση ανάδευσης για την επιτάχυνση της διαδικασίας, κατανάλωση μεγάλης ποσότητας διαλυτών, απαιτείται συνήθως ένα στάδιο συμπύκνωσης του παραγόμενου εκχυλίσματος, απαιτεί εξειδικευμένο εργαστηριακό εξοπλισμό. Προκειμένου να μειωθούν τα μειονεκτήματα της και να αυξηθούν τα πλεονεκτήματα της, αναπτύχθηκαν κάποιες τεχνικές όπως:

- Εκχύλιση Soxhlet υψηλής πίεσης
- Αυτοματοποιημένη εκχύλιση Soxhlet
- Εκχύλιση Soxhlet υποβοηθούμενη με υπερήχους
- Εκχύλιση Soxhlet υποβοηθούμενη με μικροκύματα

(Καρακίτσου, 2012, Cao, et.al., 2018)



Σχήμα 2.1 Σχηματική απεικόνιση της διάταξης εκχύλισης soxhlet

2.4.3 Εκχύλιση στο Υπερκρίσιμο Σημείο, SFE (Supercritical Fluid Extraction)

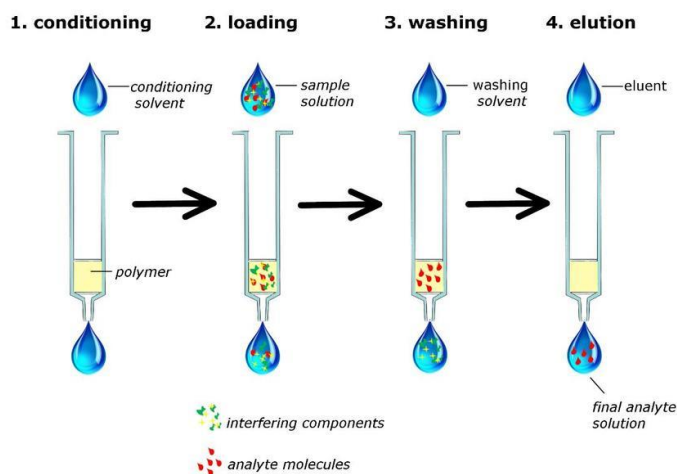
Πρόκειται για μια σχετικά νέα μέθοδο, που χρησιμοποιεί ως διαλύτη εκχύλισης ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Χάρη στις χημικές και φυσικές του ιδιότητες του CO₂ (χαμηλή κρίσιμη θερμοκρασία και πίεση), έχει καταστεί ο κύριος διαλύτης για την SFE. Το δείγμα τοποθετείται σε ένα δοχείο συνεχούς ροής και ένα υπερκρίσιμο ρευστό (συνήθως CO₂) διέρχεται από το δείγμα. Ύστερα από την αποσυμπίεση, το εκχύλισμα συλλέγεται σε διαλύτη ή παγιδεύεται σε προσροφητικό και εκροφάται με την βοήθεια διαλυτών. Στην

συγκεκριμένη τεχνική υπάρχει δυνατότητα αυτοματοποίησης, ενώ το εκχύλισμα που προκύπτει προσυγκεντώνεται και είναι καθαρό νερό, επειδή το CO₂ απομακρύνεται μετά την εκχύλιση. Εφαρμογές της τεχνικής αυτής στην ανάλυση τροφίμων περιλαμβάνουν τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε μέλι και PAHs σε φυτικά έλαια. (Τσούτση, 2008).

2.4.4 Υγρή- στερεή εκχύλιση, SPE (Solid Phase extraction)

Η τεχνική αυτή έχει αντικαταστήσει την κλασική εκχύλιση υγρού-υγρού και βασίζεται στην προσρόφηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων και άλλων συνεκχυλιζόμενων που υπάρχουν σε ένα δείγμα, σε ένα στερεό υπόστρωμα/ προσροφητικό. Τα πιο βασικά στάδια της τεχνικής απεικονίζονται στο Σχήμα 2.2 και είναι τα εξής:

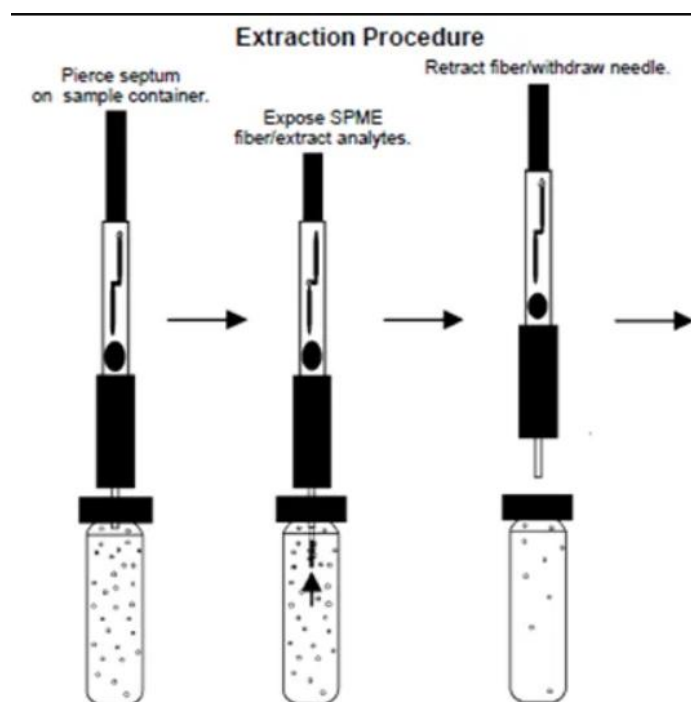
- Με τη βοήθεια ενός διαλύτη (CH₃OH, CH₃CN, H₂O, κ.α.) πραγματοποιείται η ενεργοποίηση του προσροφητικού
- Εισαγωγή δείγματος
- Για την απομάκρυνση των ενώσεων που παρεμποδίζουν γίνεται έκπλυση του προσροφητικού υλικού με διαφορετικούς διαλύτες
- Παραλαβή των ενώσεων που ενδιαφέρουν με κατάλληλο διαλύτη έκλουσης.
- (Τσούτση, 2008, Lijun Xu et al., 2019, Gao et al. 2019, Carmona et al., 2017)



Σχήμα 2.2 Στάδια της εκχύλισης στερεάς φάσης

2.4.5 Μικροεκχύλιση Διά της Στερεής Φάσης, SPME (Solid Phase MicroExtraction)

Η μικροεκχύλιση δια της στερεής φάσης αναπτύχθηκε για να καλύψει την ανάγκη ταχείας δειγματοληψίας και προετοιμασίας δείγματος. Η τεχνική αυτή μοιάζει με την εκχύλιση στερεής φάσης (SPE), αλλά διαφέρει από αυτήν στο ότι το προσροφητικό υλικό βρίσκεται στην επιφάνεια ίνας και όχι πακεταρισμένο πάνω σε επίπεδο δίσκο ή σε στήλη δίηθησης. Επίσης, ενώ η SPE είναι μέθοδος εξαντλητικής εκχύλισης και χρησιμοποιείται σε υγρά δείγματα, η SPME βασίζεται στην επίτευξη ισορροπίας, δηλαδή δεν είναι εξαντλητική και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για αέρια και στερεά δείγματα μετά από εκρόφηση των αναλυτών. Η τεχνική αυτή εκχύλισης βασίζεται στο διαχωρισμό του συστατικού στόχου, σε ακινητοποιημένη φάση εκχύλισης. Μετά την επίτευξη ισορροπίας ή με την πάροδο καθορισμένου χρονικού διαστήματος οι ενώσεις που έχουν προσροφηθεί, εκκροφούνται θερμικά ή με έκπλυση διαλύτη με την έκθεση της ίνας στην περιοχή που γίνεται η ένεση του δείγματος σε Αέριο Χρωματογράφο (GC) ή Υγρό Χρωματογράφο Υψηλής Απόδοσης αντίστοιχα ώστε να διαχωριστούν στην χρωματογραφική στήλη και να ποσοτικοποιηθούν. Η διάχυση στον ανιχνευτή των ενώσεων από το δείγμα προς την ίνα ξεκινά μόλις αυτά έρχονται σε επαφή. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η εκχύλιση θεωρείται ότι τελειώνει με την επίτευξη συγκέντρωσης ισορροπίας για την υπό ανάλυση ουσία μεταξύ του δείγματος και της επικάλυψης της ίνας. Αυτό σημαίνει ότι όταν το σύστημα φτάσει σε κατάσταση ισορροπίας η εκχυλιζόμενη ποσότητα είναι σταθερή, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος και δεν αλλάζει πλέον με την πάροδο του χρόνου. Η τεχνική της SPME, είναι μια εναλλακτική λύση έναντι των παραδοσιακών αναλυτικών τεχνικών που απευθύνονται σε πτητικές και ημι-πτητικές ενώσεις οργανικές ενώσεις. (Τσούτση, 2008, Yuan et al., 2019). Στο Σχήμα 2.3 παριστάνεται η διαδικασία της Μικροεκχύλισης Διά της Στερεής Φάσης.



Σχήμα 2.3 Στάδια της Μικροεκχύλισης Διά της Στερεής Φάσης

2.4.6 Εκχύλιση με χρήση Υπερήχων, USE (Ultrasonic Extraction)

Γενικά ως χημεία υπερήχων ορίζεται η χημική δραστηριότητα που προκαλείται ή/και καταλύεται από την έντονη πίεση των ηχητικών κυμάτων (>20 kHz) σε ένα σύστημα. Η μέθοδος αυτή έχει αναδειχθεί ως μια πολλά υποσχόμενη τεχνική που πληροί τα απαιτούμενα κριτήρια ως μια φθηνή τεχνική και φιλική στο περιβάλλον. Αξιοσημείωτα χαρακτηριστικά της μεθόδου είναι η ευελιξία, η απλότητα, η ασφάλεια, η ταχύτητα,

και η σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας, λόγω της μειωμένης κατανάλωσης χρόνου, ενέργειας και ακριβών οργανικών διαλυτών που συναντάμε σε άλλες παραδοσιακές τεχνικές εκχύλισης. Η εφαρμογή των υπερήχων κατά τη διάρκεια της εκχύλισης μπορεί να επηρεάσει και άλλες μεταβλητές διεργασίας, όπως τη θερμοκρασία και την πίεση εκχύλισης. Επίσης, η μέθοδος αποτελεί μια προτιμώμενη επιλογή για την εκχύλιση θερμοευαίσθητων ενώσεων από ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων όπως τα φυτά. Με την εκχύλιση υπερήχων, μπορούν να εκχυλιστούν ταυτόχρονα πολλά δείγματα χωρίς να απαιτείται εξειδικευμένη οργανολογία συγκριτικά με άλλες τεχνικές. Ωστόσο, η μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί να είναι δυσμενής όσον αφορά την ανάκτηση των αναλυτών του εκχυλίσματος. Επιπλέον, η τεχνική αυτή δεν μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί και δεν είναι κατάλληλη για πολύ πτητικές ενώσεις. Γενικά η παρουσία νερού στο δείγμα, μειώνει την απόδοση της εκχύλισης. Ως παραδείγματα εφαρμογών, έχει χρησιμοποιηθεί για τον

προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε μέλι με χρήση χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας και για την ανάλυση φαινολικών ενώσεων σε διάφορα τρόφιμα χωρίς να χρειάζεται επιπλέον βήμα καθαρισμού του εκχυλίσματος. (Τσούτση, 2008, Kashif, 2017).

2.4.7 Εκχύλιση QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe)

Η τεχνική QuEChERS είναι μία σχετικά νέα τεχνική, μετρά περίπου δύο δεκαετίες εφαρμογής, με ευρύ φάσμα αναφορών για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα. Τα αρχικά γράμματα της μεθόδου προέρχονται από τις λέξεις «Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe» δηλαδή, γρήγορη, εύκολη, οικονομική, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής και δημοσιεύθηκε πρώτη φορά το 2003 από τους *Anastassiades et al.*. Ωστόσο έχει εξελιχθεί, βελτιστοποιηθεί και τροποποιηθεί με ποικίλους τρόπους ώστε πλέον να εφαρμόζεται, εκτός από τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων, και σε άλλες κατηγορίες επιμολυντών όπως κτηνιατρικά φάρμακα, μυκοτοξίνες, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs), δισφαινόλη Α και Β κ.α.. Η διαδικασία αποτελείται από δύο κύρια στάδια. Αρχικά το ομογενοποιημένο δείγμα εκχυλίζεται με τη χρήση ενός οργανικού διαλύτη και ενός υδατικού διαλύματος άλατος με την κατανομή των αναλυτών στόχων στην οργανική φάση. Στη συνέχεια το υπερκείμενο υπόκειται σε καθαρισμό με την τεχνική της εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσεως (dispersive solid phase extraction, d-SPE). Η τεχνική περιλαμβάνει ένα μικρό αριθμό βημάτων, μειώνοντας τον απαιτούμενο χρόνο και καθιστώντας δυνατή την αυτοματοποίηση της. Πιο συγκεκριμένα, στο αρχικό βήμα λαμβάνει χώρα η εκχύλιση, ανακίνηση και εν συνεχεία φυγοκέντρηση του ομογενοποιημένου δείγματος με κάποιον οργανικό διαλύτη και ταυτόχρονα η υγρή-υγρή κατανομή (liquid-liquid partitioning) παρουσία μεγάλων ποσοτήτων αλάτων όπως άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4), χλωριούχο νάτριο (NaCl), κιτρικά άλατα (trisodium citrate, sodium citrate dibasic sesquihydrate). Το υπερκείμενο διάλυμα που προκύπτει υπόκειται σε καθαρισμό και περεταίρω εκχύλιση με τη χρήση της εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσεως (d-SPE). Στην d-SPE μια μικρή ποσότητα προσροφητικής ουσίας (π.χ. primary-secondary amine, PSA) και άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) προστίθενται στο εκχύλισμα του δείγματος. Κατά τη διάρκεια του καθαρισμού απομακρύνονται η περίσσεια του νερού και συνεκχυλιζόμενα συστατικά του δείγματος. Ακολουθεί και πάλι ανακίνηση και φυγοκέντρηση του δείγματος, παραλαμβάνεται το υπερκείμενο υγρό που προκύπτει, ρυθμίζεται το pH εάν χρειάζεται και συμπυκνώνεται πριν αναλυθεί είτε με αέρια χρωματογραφία είτε με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Το σημαντικότερο αντιδραστήριο στην τεχνική QuEChERS αποτελεί ο οργανικός διαλύτης εκχύλισης, καθώς από αυτόν εξαρτάται το ποσοστό των αναλυτών που παραλαμβάνεται και επομένως τα ποιοτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου (ανάκτηση, Recovery, R). Στο Σχήμα 2.4 αναπαρίστανται αναλυτικά τα βήματα εκχύλισης QuEChERS. Συνήθως χρησιμοποιείται ακετονιτρίλιο, ακετόνη ή οξικός αιθυλεστέρας. Η ακετόνη

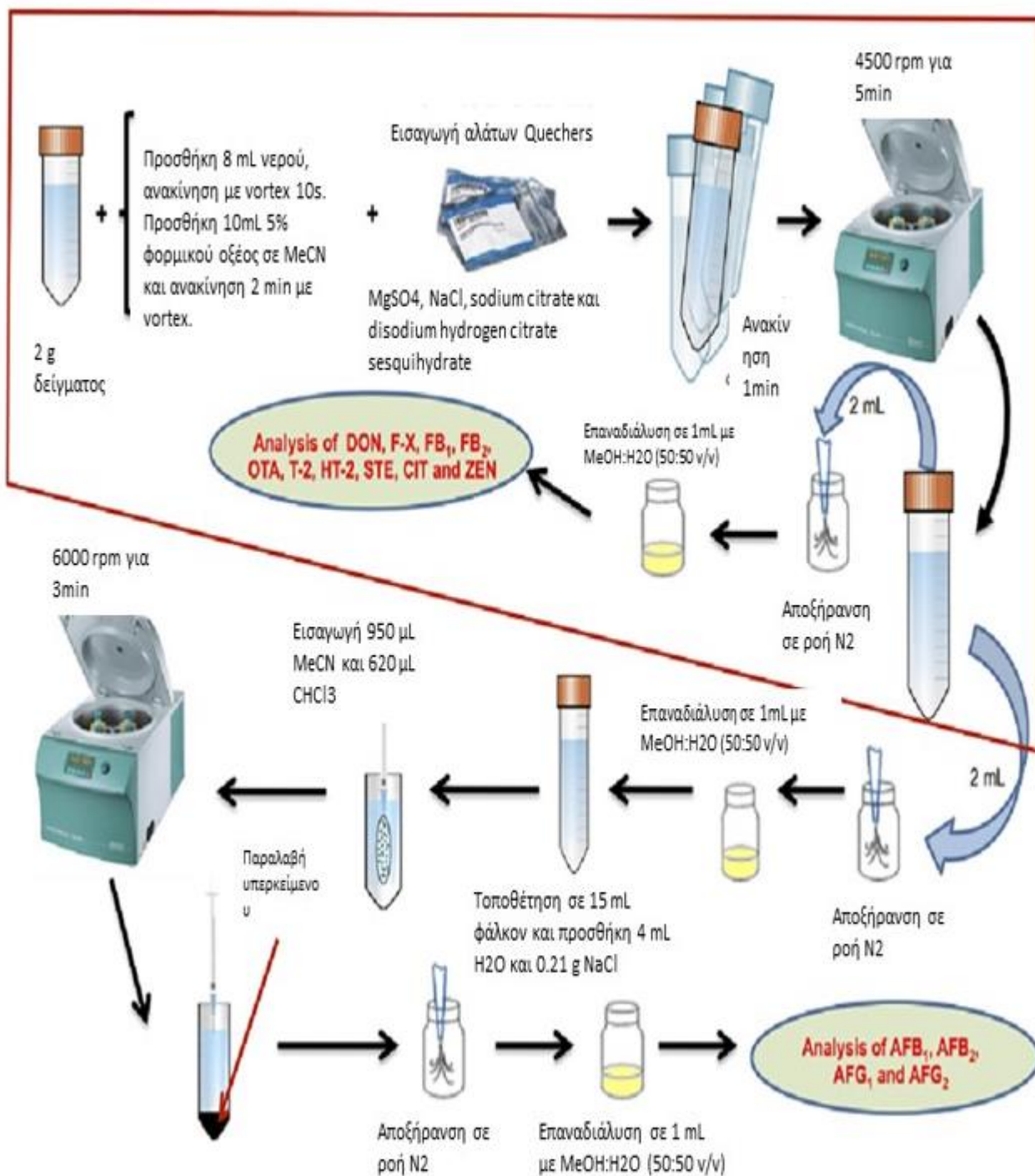
αναμειγνύεται εύκολα με το νερό δυσκολεύοντας τον διαχωρισμό τους, ο οξικός αιθυλεστέρας είναι λιγότερο αναμειξίμος με το νερό αλλά δεν παραλαμβάνει ποσοτικά τα πιο πολικά φυτοφάρμακα ενώ τα εκχυλίσματα ακετονιτρίλιου περιέχουν λιγότερες παρεμποδίζουσες ουσίες (matrix interferences), διαχωρίζεται εύκολα από το νερό (salting out) και τον καθιστούν ιδανικό στην τεχνική QuEChERS. Η προσθήκη αλάτων κατά το στάδιο της εκχύλισης έχει ως σκοπό την καλύτερη εκχύλιση και τον διαχωρισμό των φάσεων αλλά και την σταθερότητα των φυτοφαρμάκων, δηλαδή υψηλότερη ανάκτηση και εκλεκτικότητα για ευρύ φάσμα αναλυτών. Το θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) μειώνει τον όγκο της υδατικής φάσης βοηθώντας την κατανομή των πολικών αναλυτών στην οργανική φάση. Το χλωριούχο νάτριο (NaCl) βελτιώνει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης καθώς με μεταβολή της ποσότητας αυτού δύναται να ελεγχθεί η πολικότητα της μεθόδου και επομένως η ποσότητα των συνεκχυλιζόμενων ουσιών στο εκχύλισμα. Η τεχνική d-SPE προτιμάται εν αντιθέσει με την τεχνική της SPE για το στάδιο του καθαρισμού καθώς η τελευταία απαιτεί περισσότερο χρόνο, μεγαλύτερους όγκους, κόστος, καθώς απαιτείται συγκεκριμένη οργανολογία αλλά και περισσότερη ενασχόληση από τον αναλυτή. Για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων σε τρόφιμα αντιμετωπίζουμε δυσκολίες λόγω των πολυπληθών συστατικών του δείγματος. Η τεχνική QuEChERS παρέχει πολλές παραλλαγές ως προς τον καθαρισμό (cleanup) ώστε να ανταποκρίνεται καλύτερα στην εκάστοτε ανάλυση.

- Ψύξη του δείγματος: χρησιμοποιείται κατεψυγμένο ομογενοποιημένο δείγμα ώστε συστατικά της μήτρας όπως λίπη, κηροί, σάκχαρα να απομακρυνθούν. Η οργανική φάση μπορεί να αποθηκευτεί στην κατάψυξη ώστε τα συν εκχυλιζόμενα συστατικά της μήτρας με χαμηλή διαλυτότητα στο ακετονιτρίλιο να καθιζάνουν.
- Χρήση μίγματος PSA/ MgSO_4 ως προσροφητικά στην d-SPE: το MgSO_4 απομακρύνει τυχόν επιπλέον υγρασία ενώ η PSA, ως ασθενής ιονανταλλάκτης, απομακρύνει λιπαρά οξέα, σάκχαρα και πολικά οργανικά οξέα.
- Χρήση μίγματος PSA/C18 (ODS, octadecylsilane): χρησιμοποιείται συνδυασμός δύο προσροφητικών υλικών για δείγματα με υψηλά ποσοστά λιπαρών.
- Χρήση μίγματος PSA/GCB (Graphitized Carbon Black): χρησιμοποιείται συνδυασμός δύο προσροφητικών υλικών για δείγματα με μέτρια έως και υψηλά επίπεδα χλωροφύλλης, καροτινοειδών και άλλων χρωστικών. Η χρήση ενεργού άνθρακα πρέπει να γίνεται με προσοχή καθώς μπορεί να απομακρύνει και ουσίες που δεν παρουσιάζουν επίπεδη γεωμετρία στο χώρο (planar structure), όπως κάποια φυτοφάρμακα.
- Προσθήκη νερού: συνίσταται σε τρόφιμα με χαμηλό ποσοστό υγρασίας (<80%), πριν από όλη την διαδικασία, ώστε η τελική ποσότητα νερού να είναι 10 g.

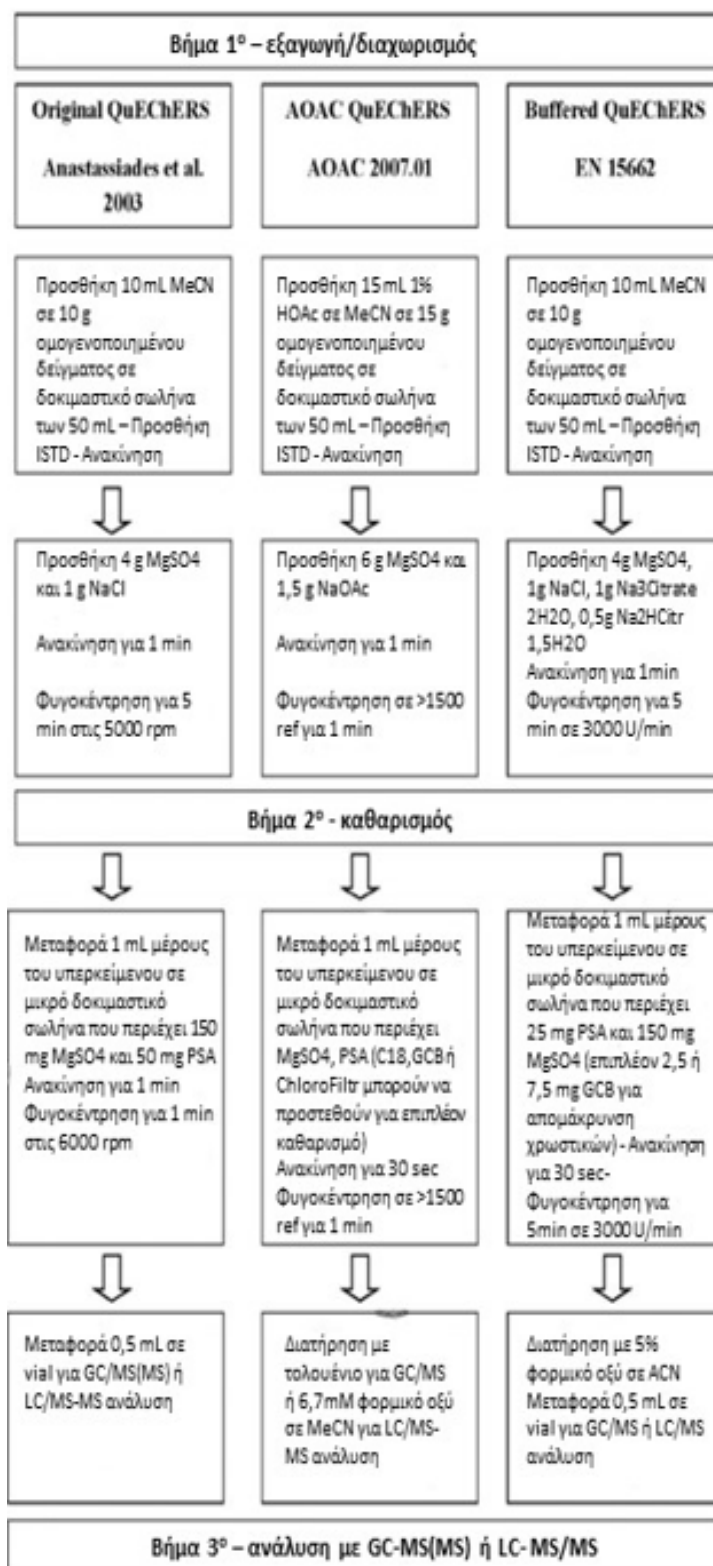
Στη μέθοδο QuEChERS διακρίνουμε τρεις διαφορετικές παραλλαγές στις οποίες η βασική διαφορά έγκειται στα άλατα που χρησιμοποιούνται κατά το πρώτο στάδιο. Στο Σχήμα 2.5 φαίνεται η διαδικασία που ακολουθείται για κάθε μια από τις τρεις παραλλαγές της μεθόδου.

Τέλος τα πλεονεκτήματα της τεχνικής QuEChERS, έναντι των άλλων τεχνικών προ κατεργασίας είναι:

- Η χρήση διαλυτών και αποβλήτων είναι πολύ μικρή.
- Απαιτείται ελάχιστος εργαστηριακός εξοπλισμός.
- Απαιτείται λίγος χώρος για την προ κατεργασία.
- Απαιτείται μικρό κόστος αντιδραστηρίων και αναλωσίμων.
- Είναι δυνατή η επεξεργασία 10-20 προ ζυγισμένων δειγμάτων ταυτοχρόνως μέσα σε 30-40 λεπτά.
- Δεν απαιτούνται ιδιαίτερες ικανότητες, δεξιότητες και εκπαίδευση για τον αναλυτή ώστε να πραγματοποιήσει την προ κατεργασία.
- Η προσθήκη του ακετονιτριλίου γίνεται απευθείας στον δοκιμαστικό σωλήνα χωρίς να έρχεται σε άμεση επαφή ο αναλυτής.
- Η τεχνική είναι συμβατή τόσο με την αέρια χρωματογραφία όσο και με την υγρή χρωματογραφία.
- Επιτυγχάνονται υψηλές ανακτήσεις (συνήθως >85%) για φυτοφάρμακα μεγάλου εύρους πολικότητας και πτητικότητας ακόμα και για πολύ δύσκολους αναλύτες. (Ψωμά, 2013)



Σχήμα 2.4 Στάδια εκχύλισης QuEChERS [Rejczak and Tuzimski, 2015]



Σχήμα 2.5 Παραλλαγές-διαφορετικές προσεγγίσεις της μεθόδου QuEChERS.

2.5 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography)

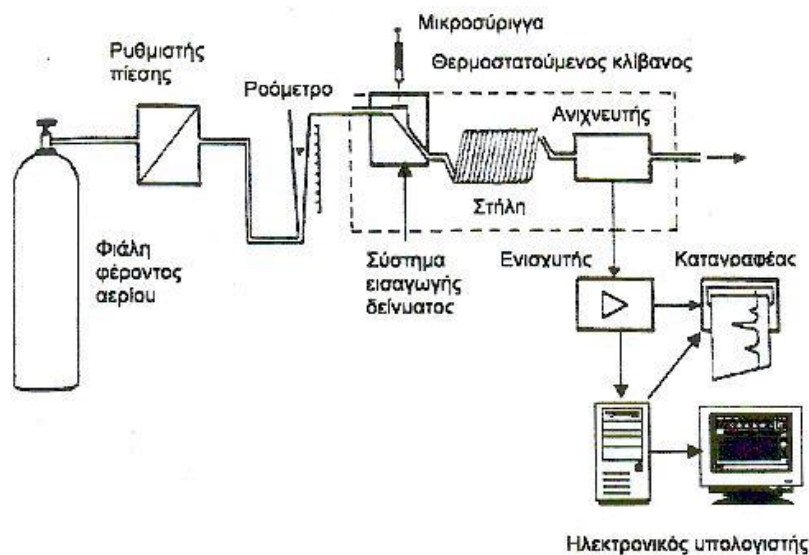
Η αέρια χρωματογραφία είναι μέθοδος διαχωρισμού και ανάλυσης πτητικών ή ημιπτητικών ενώσεων ανθεκτικών στην εξάτμιση και την θέρμανση (δεν διασπώνται σε υψηλές θερμοκρασίες).

Το δείγμα εισέρχεται στο σύστημα από τον εισαγωγέα, εξατμίζεται ακαριαία και εισχωρεί στην στήλη με την βοήθεια του φέροντος αδρανούς αερίου. Στην στήλη διαχωρίζονται οι ενώσεις οι οποίες διαδοχικά καταλήγουν στον ανιχνευτή ο οποίος δίνει χαρακτηριστικό σήμα ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα.

Τα σημαντικότερα μέρη του συστήματος είναι:

- Διάταξη φέροντος αερίου (οβίδα, μειωτήρας πίεσης, κτλ)
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος
- Στήλη χρωματογραφίας
- Ανιχνευτής (π.χ. ECD, NPD, FID, κ.α)

Τα βασικά χαρακτηριστικά του συστήματος αέριας χρωματογραφίας φαίνονται στο Σχήμα 2.6 (Καρακίτσου, 2012).



Σχήμα 2.6 Σχηματική αναπαράσταση συστήματος αέριας χρωματογραφίας

2.6 Αέρια Χρωματογραφία - Φασματομετρία Μάζας (Gas Chromatography/Mass Spectrometry)

Η φασματομετρία μάζας ορίζεται ως μια αναλυτική μέθοδος η οποία βασίζεται στην ανίχνευση μαζών των μορίων των ενώσεων. Η καρδιά κάθε φασματομετρίας μάζας είναι ο «αναλυτής μαζών (mass analyzer)» ο οποίος επιτρέπει την εκλεκτική και διαδοχική ανίχνευση των ιόντων των διαφορετικών μαζών.

Μετά τον διαχωρισμό τους στην χρωματογραφική στήλη τα μόρια των ενώσεων προωθούνται στην πηγή των ιόντων. Η πηγή ιοντισμού είναι ο χώρος στον οποίο ένα μέρος του δείγματος ιονίζεται και τα παραγόμενα ιόντα οδηγούνται στον αναλυτή μαζών. Ο σκοπός του αναλυτή μαζών είναι ο διαχωρισμός των ιόντων σύμφωνα με την μάζα και το φορτίο τους (δηλ. τον λόγο m/z). Στην συνέχεια τα ιόντα συλλαμβάνονται στον ανιχνευτή ο οποίος ενισχύει το λαμβανόμενο σήμα που οδηγείται στο κεντρικό σύστημα ελέγχου και καταγραφής δεδομένων.

2.6.1 Πλεονεκτήματα

Η οργανολογία GC-MS συνδυάζει τα πλεονεκτήματα και των δυο τεχνικών, δηλαδή τον υψηλό διαχωρισμό και την ταχύτητα της ανάλυσης που επιτυγχάνεται με την αέρια χρωματογραφία, ενώ η φασματομετρία μάζας παρέχει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και προσδιορισμού σε επίπεδα κάτω του $\mu\text{g mL}^{-1}$. Το εύρος μάζας σάρωσης συνήθως κυμαίνεται μεταξύ 10 έως 600 Daltons για τα συστήματα με χαμηλότερο κόστος και μέχρι 1000 Daltons για τα ακριβότερα συστήματα. Η μέθοδος ιοντισμού και θραυσματοποίησης με ρεύμα ηλεκτρονίων (electron impact, EI) είναι πιο απλή και διαδεδομένη προσφέροντας μεγάλη απόδοση ιοντισμού και επαναληψιμότητα στο φάσμα μαζών καθώς και εκτενής θραυσματοποίηση. (Καρακίτσου, 2012, Καψημάλη, 2008)

2.7 Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC, High Performance Liquid Chromatography)

Η HPLC χρησιμοποιείται ευρύτατα για την ανάλυση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, καθώς είναι μια εύελικτη τεχνική η οποία στηρίζεται στην δυναμική κατανομή των μορίων των ενώσεων που μελετώνται μεταξύ της στατικής και της υγρής κινητής φάσης. Ένα σημαντικό πλεονέκτημα που έχει είναι ότι εφαρμόζεται σχεδόν σε κάθε οργανική ένωση ανεξάρτητα από την πολικότητα και την θερμική σταθερότητα.

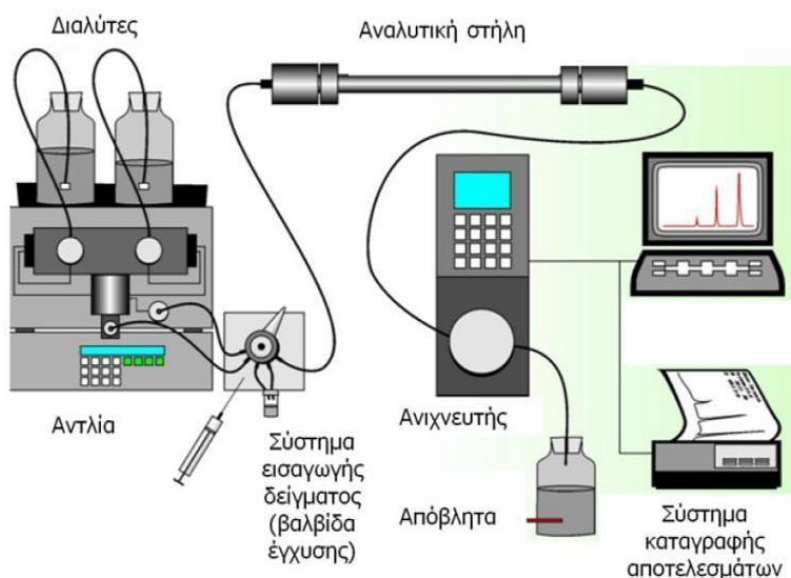
Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου είναι ότι εφαρμόζεται για τον διαχωρισμό οποιανδήποτε ουσιών διαλυτών στην κινητή φάση, έχουμε δύο ενεργές φάσεις (στατική και κινητή) που αλληλοεπιδρούν, δυνατότητα ανάλυσης σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ευκολία στην ανάκτηση του δείγματος.

Το μειονέκτημα που συναντάμε είναι ότι χρειάζεται μεγαλύτερος χρόνος ανάλυσης και μικρότερη διαχωριστική ικανότητα. (Καρακίτσου, 2012).

Μία βασική εργαστηριακή διάταξη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης αποτελείται από τα εξής επιμέρους μέρη όπως φαίνονται το Σχήμα 2.7 που ακολουθεί:

- Διαλύτες οι οποίοι θα αποτελέσουν την κινητή φάση και βρίσκονται αποθηκευμένοι σε φιάλες. Η κινητή φάση είναι απαραίτητη για την μεταφορά των δειγμάτων μέσα στην χρωματογραφική στήλη.

- Η αντλία (pump) η οποία εξασφαλίζει τη συνεχή άντληση και προώθηση της κινητής φάσης υπό ρυθμιζόμενη υψηλή πίεση και ροή, διαμέσου του συνόλου του συστήματος, από τους διαλύτες μέχρι το δοχείο συλλογής των αποβλήτων του συστήματος.
- Σύστημα εισαγωγής δείγματος ((injection system/ injector valve) στο οποίο γίνεται η έγχυση του δείγματος βρίσκεται πριν την χρωματογραφική στήλη και επιτρέπει την εισαγωγή του δείγματος στην ροή της κινητής φάσης.
- Στην χρωματογραφική στήλη (column) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός του μίγματος στα συστατικά του. Η θερμοκρασία είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει τον διαχωρισμό των συστατικών και για αυτόν τον λόγο η στήλη βρίσκεται εντός θερμοστατούμενου κλιβάνου (column oven).
- Η ανίχνευση των ουσιών που εξέρχονται από τη στήλη γίνεται μέσω του ανιχνευτή (detector) και γίνεται κυρίως με φασματομετρία UV/Vis, όπου το παραγόμενο φως από τον ανιχνευτή προσπίπτει σε μια κυψελίδα από χαλαζία συνεχούς ροής και μετριέται η απορρόφηση του φωτός.
- Στο καταγραφικό καταγράφεται το μετρούμενο σήμα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των ουσιών και στη συνέχεια στέλνεται σε κάποιον υπολογιστή που παράγει το χρωματογράφημα της ανάλυσης.
- Τέλος, στη δεξαμενή αποβλήτων συλλέγεται η κινητή φάση μαζί με τα περιεχόμενα συστατικά του δείγματος. (Καρκαλούσος, 2015)



Σχήμα 2.7 Σχηματική αναπαράσταση συστήματος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

2.8 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI) βασίζεται στην παραγωγή και μεταφορά ιόντων που βρίσκονται σε ένα διάλυμα στην αέρια φάση. Αρχικά, το 1968 ο Dole εισήγαγε την έννοια του ESI για το σχηματισμό ιόντων στην αέρια φάση, ενώ το 1984 ο Fenn ήταν εκείνος που συνέδεξε τον ηλεκτροψεκασμό με τη φασματομετρία μαζών. Είναι μια πολύ ήπια τεχνική ιοντισμού με την οποία παράγονται απλά ή πολλαπλά φορτισμένα ιόντα, χρησιμοποιείται ευρέως σε χημικές και βιοχημικές αναλύσεις. Βρίσκει εφαρμογή στην ανάλυση μη πτητικών και θερμικά ασταθών βιομορίων που δεν επιδέχονται ανάλυση με συμβατικές τεχνικές.

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου και υπό συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και θερμοκρασίας. Το διάλυμα διέρχεται μέσα από έναν τριχοειδή σωλήνα με χαμηλή ροή ($1-10 \mu\text{L min}^{-1}$). Για να παραχθεί ηλεκτρικό πεδίο χρειάζεται η εφαρμογή διαφοράς δυναμικού (2,5-6 kV) μεταξύ του τριχοειδούς σωλήνα και ενός κυλινδρικού ηλεκτροδίου. Δημιουργείται ένα εκνέφωμα από πολύ φορτισμένα σταγονίδια με την ίδια πολικότητα με την τριχοειδή τάση. Τα φορτισμένα σταγονίδια παράγονται στην έξοδο του άκρου του ηλεκτροψεκασμού και με τη βοήθεια αυξημένης θερμοκρασίας και/ή άλλου ρεύματος αερίου ξήρανσης (συνήθως αζώτου N_2) επιτυγχάνεται η εξάτμιση του διαλύτη και τα μόρια του αναλύτη φορτίζονται, ενώ μειώνονται συνεχώς σε μέγεθος οδηγώντας σε αύξηση της πυκνότητας επιφανειακής φόρτισης και μείωση της ακτίνας σταγονιδίων. Το φαινόμενο ονομάζεται «εξάτμιση με ιοντισμό». (Ho et al., 2003, Wilm, 2011)

2.8.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα Ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό

Ο ηλεκτροψεκασμός παρέχει έναν σχετικά απλό τρόπο ιοντισμού μη πτητικών διαλυμάτων επιτρέποντας στο φασματόμετρο μάζας να παρέχει μια ευαίσθητη άμεση ανίχνευση. Η φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί όχι μόνο για την ανίχνευση και ανάλυση ανόργανων ουσιών, αλλά και για την ανάλυση συμπλόκων οργανομεταλλικών ιόντων και βιομακρομορίων. Συνδυάζεται αποτελεσματικά με μια ποικιλία χρωματογράφων (π.χ. υγρή χρωματογραφία) για ανάλυση πολύπλοκων συστημάτων.

Ωστόσο, η χρήση του δεν ενδείκνυται για μη πολικές ή χαμηλής πολικότητας ενώσεις ενώ υπάρχει ένα όριο στην επιλογή του διαλύτη και στο εύρος των διαλυμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Ταυτόχρονα, η απόκριση του φασματόμετρου μάζας σε διαφορετικά σύμπλοκα ποικίλλει ευρέως, γεγονός που εμποδίζει την ακριβή ποσοτική ανάλυση.

2.9 Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρία Μάζας (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry)

Με την σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με την φασματομετρία μάζας (LC-MS) επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μείγματος με την ταυτόχρονη ταυτοποίησή τους.

Στις συνθήκες χρωματογραφικές τεχνικές η ταυτοποίηση των συστατικών γίνεται με την χρήση ανιχνευτών απορρόφησης και φθορισμού και με κριτήριο τους χρόνους κατακράτησης των υπό μελέτη ενώσεων σε ένα δείγμα, με τους αντίστοιχους χρόνους κατακράτησης σε ένα πρότυπο διάλυμα υπό τις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Εντούτοις, υπάρχει ένας μεγάλος αριθμός ενώσεων που παρουσιάζει παρόμοιους χρόνους κατακράτησης με τις χημικές ενώσεις που μελετώνται, με αποτέλεσμα να είναι δύσκολη η ακριβής ταυτοποίηση των ενώσεων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον. Επίσης, με την χρήση της υγρής χρωματογραφίας σε πολύπλοκα υποστρώματα υπάρχει δυσκολία στον πλήρη διαχωρισμό όλων των συστατικών, με αποτέλεσμα ο ποσοτικός προσδιορισμός να μην είναι πάντα αξιόπιστος και σε ορισμένες περιπτώσεις να είναι ανέφικτος.

Η φασματομετρία μάζας παρέχει τη δυνατότητα ταυτοποίησης με ακρίβεια, αφού για πολλές ενώσεις τα φάσματα μαζών είναι μοναδικά. Ωστόσο, παραμένει ο διαχωρισμός των προσδιοριζόμενων ενώσεων ενός μείγματος πριν την εισαγωγή της στο φασματόμετρο μάζας, διότι εάν δεν επιτευχθεί αυτό, το φάσμα θα περιέχει τα ιόντα και άλλων συστατικών, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την αξιοπιστία της ταυτοποίησης. Επίσης, ο προσδιορισμός είναι ανέφικτος όταν οι αναμενόμενες συγκεντρώσεις των ενώσεων που θέλουμε να προσδιορίσουμε είναι πολύ χαμηλές ή είναι ίχνη.

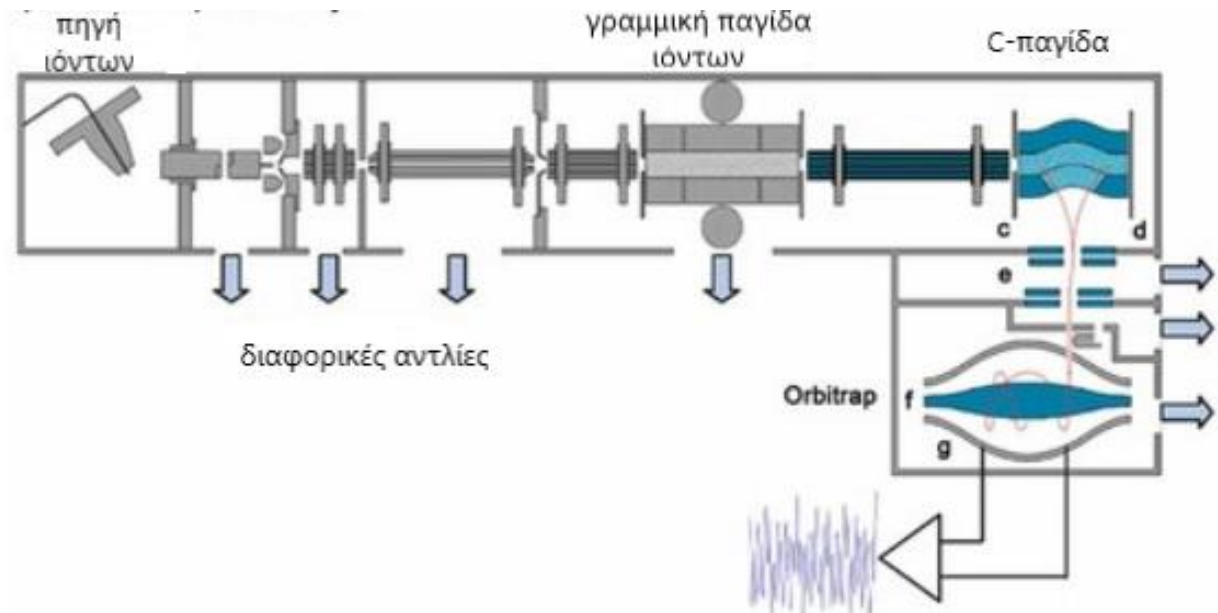
Τελικά, με την σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας και της φασματομετρίας μάζας επιτυγχάνεται η εισαγωγή των διαχωρισμένων ουσιών στο φασματόμετρο μάζας και η αξιόπιστη ταυτοποίηση τους, ακόμα και αν ο διαχωρισμός δεν είναι πλήρης, διότι ενώσεις με διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης θα παρουσιάζουν διαφοροποίηση στο φάσμα μαζών.

2.10 Υβριδικός αναλυτής μαζών τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap)

Ο καινοτόμος υβριδικός αναλυτής μαζών LTQ Orbitrap κατασκευάστηκε από τη Thermo Electron και είναι ο πρώτος υψηλής απόδοσης αναλυτής μαζών που χρησιμοποιεί σε συνδυασμό την γραμμική και τροχιακή παγίδα των ιόντων. Η διάταξη τροχιακής παγίδας ιόντων- Orbitrap, εφευρέθηκε από τον Makarov και βασίστηκε στην παγίδα ιόντων Kingdon που είχε συλληφθεί ως ιδέα αλλά δεν είχε κατασκευαστεί πρακτικά.

Ο αναλυτής μαζών Orbitrap αποτελείται από δύο ειδικά διαμορφωμένα (κεντρικό και εξωτερικό) ηλεκτρόδια. Τα παραγόμενα ιόντα στην πηγή ιοντισμού παγιδεύονται στον αναλυτή μαζών και μπορούν να αναλυθούν με τη χρήση μεθόδων σαρώσεως MS και MSⁿ.

Η γενική διάταξη φασματομέτρου μάζας με συνδυασμό LTQ-Orbitrap απεικονίζεται στο Σχήμα 2.8.



Σχήμα 2.8 Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή LTQ Orbitrap

Πιο συγκεκριμένα, τα επιμέρους τμήματα περιλαμβάνουν ένα διαφορικό σύστημα με τελικό κενό $<8 \times 10^{-10}$ Torr, φακούς μεταφοράς ιόντων υπό υψηλό κενό, γραμμική παγίδα θραυσματοποιήσεων, κελί συλλογής ιόντων με άζωτο (C-Trap), τροχιακή παγίδα, σύστημα για τον ακριβή έλεγχο της θερμοκρασίας, ενισχυτές και μετατροπείς σήματος σε συχνότητα με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transformation, FT) για την απόκτηση φασμάτων μάζας.

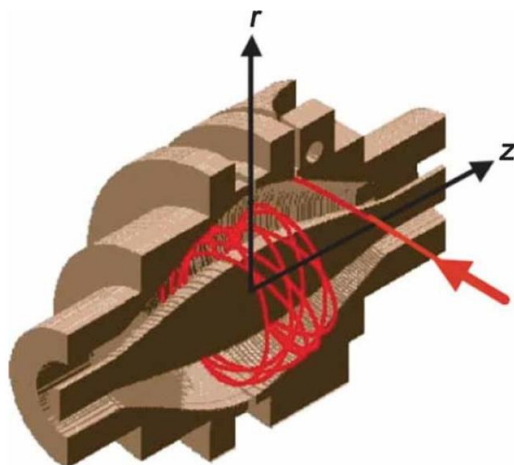
2.10.1 Αρχή Λειτουργίας Αναλυτή Orbitrap

Η αρχή λειτουργίας του αναλυτή μαζών Orbitrap βασίζεται στην τροχιακή παγίδευση των ιόντων. Τα ιόντα που έχουν παραχθεί στην πηγή, εισέρχονται και συσσωρεύονται στην γραμμική παγίδα ιόντων (linear ion trap), αρχίζουν να επιταχύνονται και οδηγούνται στην C-παγίδα ιόντων (C-trap). Στην συνέχεια συμπιέζονται δημιουργώντας ένα μικρό νέφος ιόντων και τελικά εισέρχονται στο Orbitrap. Τα συμμετρικά αξονικά ηλεκτρόδια του Orbitrap δημιουργούν ένα ηλεκτροστατικό δυναμικό που περιγράφεται από την παρακάτω εξίσωση:

$$U_{(r,z)} = k/2 (z^2 - r^2/2) + k/2 (R_m)^2 \ln[r/R_m] + C$$

Όπου: r, z οι κυλινδρικές συντεταγμένες, k η σταθερά καμπυλότητας του πεδίου και R_m η χαρακτηριστική ακτίνα καμπυλότητας.

Τα εγχεόμενα ιόντα πραγματοποιούν περιστροφική κίνηση γύρω από ένα κεντρικό ηλεκτρόδιο (r, φ όπου φ η γωνιακή συντεταγμένη) και ταυτόχρονα ταλαντώνονται στην κατεύθυνση του οριζόντιου άξονα (z). (Σχήμα 2.9).



Σχήμα 2.9 Απεικόνιση του τροχιακού αναλυτή μαζών Orbitrap

[<https://analyticalsciencejournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mas.20186>]

Η ταλάντωση μπορεί να θεωρηθεί αρμονική και είναι ανεξάρτητη από τις παραμέτρους r, φ της κίνησης των ιόντων. Τα ταλαντευόμενα ιόντα παράγουν ένα περιοδικό σήμα στα εξωτερικά ηλεκτρόδια, το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί με έναν διαφορικό ενισχυτή. Τα σήματα του αποτυπωμένου ρεύματος (ιόντα συγκεκριμένης μάζας) μετατρέπονται σε φάσμα συχνοτήτων με χρήση του αλγορίθμου μετατροπής Fourier (FT algorithm).

Ο λόγος m/z του κάθε ιόντος σχετίζεται άμεσα με τη συχνότητα ταλάντωσης (ω) του ιόντος όπως φαίνεται στην Εξίσωση 2.1. Τα ιόντα που έχουν διαφορετικό λόγο m/z θα διαφέρουν ως προς την περιστροφή και την αξονική ταλάντωση, με αποτέλεσμα να παράγουν διαφοροποιημένα τελικά σήματα στον ενισχυτή.

$$\omega = \sqrt{\frac{k}{m/z}}$$

Εξίσωση 2.1

Όπου ω είναι η συχνότητα της ταλάντωσης, k η σταθερά του συστήματος και m/z ο λόγος μάζα προς φορτίο. Από τον υπολογισμό της συχνότητας ταλάντωσης προκύπτει ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας. Η ανάλυση μαζών μπορεί να γίνει με δυο τρόπους:

- a. Fourier Transform (FT) mode, όπου πραγματοποιείται μέτρηση των συμφασικών ταλαντώσεων στην οριζόντια κατεύθυνση (image current detection)
- b. Mass Selective Instability (MSI) mode, η οποία περιλαμβάνει την έγχυση ιόντων και τη συλλογή τους πάνω σε έναν ανιχνευτή.

2.10.2 Πλεονεκτήματα χρήσης αναλυτή Orbitrap

Ο αναλυτής μαζών Orbitrap προσελκύει το ενδιαφέρον λόγω της υψηλής διακριτικής ικανότητας, της ακρίβειας μάζας, της χωρητικότητας φορτίων, του μεγάλου γραμμικού δυναμικού εύρους και της σταθερότητας. Οι αναλυτές Orbitrap έχουν την ικανότητα να συνδυάζουν την αξιόπιστη ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση των αναλυτών σε μια μόνο ανάλυση.

Η ακρίβεια μάζας του οργάνου μπορεί να φτάσει τα 3 ppm και με εσωτερική βαθμονόμηση το 1 ppm. Η διακριτική ικανότητα είναι 60000-100000 (m/z 400) με ταχύτητα σάρωσης 1 Hz. Το εύρος μάζας κυμαίνεται μεταξύ 50 και 2000 amu και 200-4000 amu, ενώ η ευαισθησία φτάνει και σε επίπεδα fmol. Επιπλέον, υπάρχει δυνατότητα διαδοχικής ανάλυσης MS/MS, (θεωρητικά $n=1-10$), χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές διάσπασης σε κάθε περίπτωση (CID, HCD, PQD κ.α.).

Η οργανολογία LTQ Orbitrap παρέχει επιπλέον δυνατότητες όπως τον ιοντισμό με τη μέθοδο MALDI (matrix-assisted laser desorption/ionization) και με μεταφορά ηλεκτρονίων (electron-transfer dissociation, ETD). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο υβριδικός αναλυτής μαζών Orbitrap έχει ευρύ πεδίο εφαρμογής στην πρωτεϊνική ανάλυση, στην ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση, στους μεταβολίτες, στην ανάλυση λιπιδίων. Τέλος, η περιβαλλοντική ανάλυση και η ανάλυση υπολειμμάτων σε τρόφιμα κερδίζει συνεχώς έδαφος στις εφαρμογές του αναλυτή Orbitrap. (Νάννου, 2018).

2.11 Επικύρωση αναλυτικής μεθόδου

Η ορθότητα και αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου εκτιμάται μέσω μελετών επικύρωσης. Διεθνή θεσμικά όργανα έχουν συνεργαστεί για την έκδοση πρωτοκόλλων ή οδηγιών ώστε να παρέχονται οι ελάχιστες απαιτήσεις των διαδικασιών που εξασφαλίζουν επαρκή επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων (Thomson et al., 2002; SANTE 2019). Οι κυριότερες παράμετροι επικύρωσης μιας αναλυτικής μεθόδου είναι οι παρακάτω:

- Ορθότητα (trueness): ορίζεται ως ανάκτηση (recovery) ανάλογα με τον τρόπο υπολογισμού και δείχνει την έλλειψη ακρίβειας (inaccuracy).
- Πιστότητα (precision): με τον όρο πιστότητα εννοούμε τον επαναλαμβανόμενο ορθό υπολογισμό της συγκέντρωσης ενός δείγματος. Επηρεάζεται σημαντικά από τυχαία σφάλματα, κάτι που μπορεί εύκολα να ελεγχθεί μέσω της επανάληψης της ίδιας πειραματικής διαδικασίας σε διαφορετικά δείγματα την ίδια ημέρα ή την επανάληψη της πειραματικής διαδικασίας σε διαφορετικά δείγματα αλλά σε διαφορετικές ημέρες.
- Γραμμικότητα (linearity): η γραμμικότητα της απόκρισης προσδιορίζεται σε καθαρά πρότυπα διαλύματα και σε πραγματικά δείγματα. Αποτελεί ιδιαίτερα σημαντική ιδιότητα μιας αναλυτικής μεθόδου και οποιαδήποτε απόκλιση μπορεί να εξηγηθεί από την συνολική εκτίμηση πιστότητας.
- Ανιχνευσιμότητα (detectability): εκφράζει την ικανότητα της μεθόδου να ανιχνεύει / ποσοτικοποιεί χαμηλές συγκεντρώσεις του αναλύτη. Η ικανότητα αυτή ποσοτικοποιείται με δύο εκφράσεις:
 - Όριο ανίχνευσης (LOD-Limit of Detection): χαρακτηρίζεται ως η ελάχιστη συγκέντρωση της προσδιοριζόμενης ουσίας η οποία μπορεί να ανιχνευτεί με βεβαιότητα 99,6%. Κατά την ανάπτυξη μιας αναλυτικής τεχνικής στόχος είναι τα ιδιαίτερα χαμηλά όρια ανίχνευσης. Το όριο ανίχνευσης (LOD) δίνεται από τον τύπο: $S/N=3$, όπου S το σήμα και N ο θόρυβος.
 - Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ-Limit of Quantitation): το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) είναι η ελάχιστη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου αναλύτη που μπορεί να προσδιοριστεί με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) δίνεται από τον τύπο: $S/N=10$ ή $LOQ=3,3 * LOD$

Ο ορισμός αυτών των ορίων βασίζεται στην ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει το σήμα του αναλύτη από το σήμα του υποβάθρου ή θορύβου και τα επιτρεπόμενα σφάλματα πρώτου και δευτέρου είδους.

Η περιοχή των σημάτων / συγκεντρώσεων χωρίζεται σε τρεις περιοχές:

- 1) Περιοχή στην οποία η ανίχνευση του αναλύτη δεν είναι δυνατή (θόρυβος)

- 2) Περιοχή στην οποία η ανίχνευση του αναλύτη είναι αξιόπιστη και το σήμα του αναλύτη διακρίνεται από το θόρυβο.
- 3) Περιοχή στην οποία η ποσοτικοποίηση του αναλύτη είναι αξιόπιστη (ξεκάθαρη διάκριση σήματος αναλύτη από θόρυβο)

- Ανθεκτικότητα (ruggedness): ονομάζεται η επιδεκτικότητα μιας αναλυτικής τεχνικής σε διαφορετικές πειραματικές συνθήκες.
- Εκλεκτικότητα/ Διακριτικότητα (Selectivity/ Specificity): ο όρος σχετίζεται με τον βαθμό ιδιαίτερης απόκρισης μιας μεθόδου απέναντι σε μια συγκεκριμένη ένωση προς ανάλυση.
- Αβεβαιότητα: είναι ένα εύρος γύρω από το αναφερόμενο αποτέλεσμα εντός του οποίου μπορεί να βρίσκεται η πραγματική τιμή αναμένεται να βρίσκεται με συγκεκριμένη βεβαιότητα (συνήθως επίπεδο εμπιστοσύνης 95%). Τα δεδομένα αβεβαιότητας λαμβάνουν υπόψη την πιστότητα (bias) και την αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου.(SANTE/12682/2019).

2.12 ΣΚΟΠΟΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

Ο προσδιορισμός οργανικών χημικών ρύπων σε περιβαλλοντικά υποστρώματα είναι ένα πεδίο έρευνας που έχει μελετηθεί αρκετά αλλά συνεχίζει να απασχολεί τους επιστήμονες. Σήμερα δίνεται όλο και περισσότερη σημασία στον πολύ-υπολειμματικό προσδιορισμό καταλοίπων φυτοφαρμάκων, σε υποστρώματα με υψηλά ποσοστά λίπους και λιπιδίων, όπως τα ζωικής προέλευσης (ιστοί ψαριών, γαιοσκωλήκων, χοιρινού και άλλα) αλλά και τα φυτικής προέλευσης με γρήγορες μεθόδους που δύναται να αυτοματοποιηθούν ώστε να καθίσταται εφικτό η ανάλυση όσο το δυνατόν περισσότερων αναλυτών σε μεγάλο πλήθος δειγμάτων εύκολα και γρήγορα.

Πιο συγκεκριμένα, τα ψάρια αποτελούν βασικό μέρος της διατροφής του ανθρώπου και απασχολούν ιδιαίτερα τους ερευνητές σε ό,τι αφορά την παρουσία υπολειμμάτων οργανικών ρύπων και όχι μόνο, λόγω των δυσμενών επιπτώσεων αυτών στον ανθρώπινο οργανισμό αλλά και στο σύνολο της διατροφικής αλυσίδας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη μιας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό εννιά φυτοπροστατευτικών ουσιών και είκοσι οκτώ φαρμακευτικών ουσιών, με συνδυασμό εκχύλισης QuEChERS και φασματομετρίας μάζας υψηλής ευκρίνειας και ακρίβειας, LC-MS/LTQ-ORBITRAP σε δείγματα από λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*).

Β. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Στην παρούσα εργασία, οι φυτοπροστατευτικές ενώσεις που επιλέχθηκαν καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δράσης σε όλη την Ελλάδα και εν γένει στην Ευρώπη. Οι επιλεγμένες ενώσεις είναι στην πλειοψηφία τους εγκεκριμένες και είναι πιθανή η ανίχνευσή τους σε ίχνη στο περιβάλλον. Τα κριτήρια στα οποία βασίστηκε η επιλογή των εν λόγω ενώσεων ήταν ο βαθμός χρήσης τους στις υδατοκαλλιέργειες, η πιθανότητα να καταλήξουν στο περιβάλλον και το θαλάσσιο οικοσύστημα λόγω εκτεταμένης χρήσης τους στη γεωργία αλλά και η δυνατότητα προσδιορισμού τους με χρήση υγρής χρωματογραφίας.

Οι φαρμακευτικές ενώσεις που επιλέχθηκαν ανήκουν σε διαφορετικές θεραπευτικές ομάδες και τα κριτήρια στα οποία βασίστηκε η επιλογή αυτών των ενώσεων ήταν:

- ο βαθμός κατανάλωσης και χρήσης τους για την καταπολέμηση ασθενειών από τον άνθρωπο αλλά και από τις ίδιες τις μονάδες ιχθυοκαλλιέργειών.
- η ύπαρξη και ανθεκτικότητά τους στο περιβάλλον αλλά και οι πιθανές επιπτώσεις τους στον άνθρωπο και στο υδάτινο οικοσύστημα.

Στον Πίνακα 3.1 φαίνονται οι επιλεγμένες φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις, ο αριθμός CAS, η χημική δομή, ο μοριακός τύπος, το μοριακό βάρος τους, καθώς και ορισμένες φυσικοχημικές τους ιδιότητες.

Πίνακας 3.1 Ιδιότητες επιλεγμένων φυτοπροσταυτικών ουσιών

Ένωση	Αριθμός CAS	Χημικός τύπος ^[a]	Μοριακό βάρος	pKa (25°C) ^[a]	logKow ^[a]	Διαλυτότητα στο νερό (20°C) (mg l ⁻¹)
Abamectin	65195-55-3	C ₄₈ H ₇₂ O ₁₄	873,09	12,47	5,85	7,2
Azamethiphos	35575-96-3	C ₉ H ₁₀ ClN ₂ O ₅ PS	324,67	-0,91	1,05	1100
Azoxystrobin	131860-33-8	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	403,39	0,94	2,50	6,7
Boscalid	188425-85-6	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	343,21	-0,11	2,96	4,6
Irgarol	28159-98-0	C ₁₁ H ₁₉ N ₅ S	253,37	-	3,95	7,0
Malathion	121-75-5	C ₁₀ H ₁₉ O ₆ PS ₂	330,35	-6,8	2,75	148
Pyrimiphos-methyl	29232-93-7	C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₃ PS	305,33	4,3	4,20	11
Tebufenozide	112410-23-8	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂	352,48	-3,2	4,25	0,83
Ethoxyquin	91-53-2	C ₁₄ H ₁₉ NO	217,31	-	-	17,46

Πίνακας 3.2 Ιδιότητες επιλεγμένων φαρμακευτικών ουσιών

Ένωση	Αριθμός CAS	Χημικός τύπος ^[a]	Μοριακό βάρος	pKa (25°C) ^[a]	logKow ^[a]	Διαλυτότητα στο νερό (20°C) (mg l ⁻¹)
Oxolinic acid	14698-29-4	C ₁₃ H ₁₁ NO ₅	261,23	6,3	1,67	0,003
Sulfadiazine	68-35-9	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S	250,28	6,48	0,09	<1000
Sulfamethazine	57-68-1	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,33	7,59	0,89	1500
Sulfamethoxazole	723-46-6	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,28	5,70	0,89	1000
Sulfapyridine	144-83-2	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	249,29	8,43	0,35	268
Trimethoprim	738-70-5	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,32	7,12	0,91	400
Paracetamol	103-90-2	C ₈ H ₉ NO ₂	151,16	7,24/14,17	0,49	14000
Alprazolam	28981-97-7	C ₁₇ H ₁₃ ClN ₄	308,77	18,30/5,08	2,12	13,1
Amisulpride	71675-85-9	C ₁₇ H ₂₇ N ₃ O ₄ S	369,48	14,03/7,05	1,10	290
Amitriptyline	50-48-6	C ₂₀ H ₂₃ N	277,40	9,76	4,9	4,5
Bupropion	34841-39-9	C ₁₃ H ₁₈ ClNO	239,74	18,29/8,22	3,85	140
Carbamazepine	298-46-4	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	236,27	15,96	2,77	150
Citalopram	28981-97-7	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	324,40	9,78	3,76	31,09
Diazepam	439-14-5	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,74	2,92	2,82	12
Fluoxetine	54910-89-3	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	309,33	9,80	4,09	1,7
Haloperidol	52-86-8	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	375,87	8,66	4,30	14

Πίνακας 3.2 (συνέχεια) Ιδιότητες επιλεγμένων φαρμακευτικών ουσιών

Ένωση	Αριθμός CAS	Χημικός τύπος ^[a]	Μοριακό βάρος	pKa (25°C) ^[a]	logKow[a]	Διαλυτότητα στο νερό (20°C) (mg l ⁻¹)
Risperidone	106266-06-2	C ₂₃ H ₂₇ FN ₄ O ₂	410,49	8,76	2,63	170
Sertraline	79617-96-2	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	306,23	9,85	5,15	0,15
Venlafaxine	93413-69-5	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277,41	14,42/8,91	2,74	230
Ketoprofen	22071-15-4	C ₁₆ H ₁₄ O ₃	254,29	4,45	3,20	21
Phenazone	60-80-0	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O	188,23	1,40	0,38	47,4·10 ³
Bezafibrate	41859-67-0	C ₁₉ H ₂₀ ClNO ₄	361,82	3,83	3,99	1,60
Atenolol	29122-68-7	C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O ₃	266,34	14,08/9,67	0,16	429
Budesonide	51333-22-3	C ₂₅ H ₃₄ O ₆	430,54	13,74/-2,9	2,42	45,7
Clozapine	5786-21-0	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄	326,83	7,5		11.8
Mirtazapine	61337-67-5	C ₁₇ H ₁₉ N ₃	265,36	7,70	2,90	1100
Paroxetin	61869-08-7	C ₁₉ H ₂₀ FNO ₃	329,37	9,90	2,30	8,5
Quetiapine	111974-69-7	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	383,51	15,12/7,06	281	40

[a] Δεδομένα από <https://go.drugbank.com>, <http://sitem.herts.ac.uk>, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound>

3.1 Υλικά και μέθοδοι

3.1.1 Χημικά, υλικά και όργανα

3.1.1.1 Πρότυπες ουσίες και υπόστρωμα

Οι πρότυπες ουσίες των φυτοπροστατευτικών προϊόντων ήταν υψηλής καθαρότητας (>98%) και προμηθευτήκαν σε στερεά μορφή από την εταιρία Sigma Aldrich (*Darmstadt, Germany*). Οι πρότυπες ουσίες ήταν οι: pirimiphos methyl, azoxystrobin, boscalid, malathion, tebufenozide, chlorpyrifos methyl, azamethiphos, irgarol, ethoxyquin.

Οι πρότυπες ουσίες για τα φαρμακευτικά προϊόντα ήταν επίσης υψηλής καθαρότητας (>98%) και προμηθευτήκαν και αυτά σε στερεά μορφή και ήταν τα εξής: sulfadiazine, trimethoprim, sulfamethoxazole, sulfapyridine, sulfamethazine, paracetamol, atenolol, amisulpride, antipyrine-phenazone, risperidone, mirtazapine, venlafaxine, clozapine, citalopram, quetiapine, haloperidol, carbamazepine, paroxetine, amitriptyline, fluoxetine, bupropion, alprazolam, sertraline, ketoprofen, bezafibrate, diazepam, budesonide, fenofibrate.

Το υπόστρωμα ήταν το ψάρι *Dicentrarchus labrax* (λαβράκι) και προμηθεύτηκε από ιχθυοκαλλιέργειες της Ηπείρου.

3.1.1.2 Πρότυπα διαλύματα

Τα πυκνά πρότυπα διαλύματα (stock solutions) για κάθε προσδιοριζόμενη ένωση παρασκευάστηκαν ξεχωριστά, σε συγκεντρώσεις 2000 mg/L ή 1000 mg/L, σε διαλύτη μεθανόλη καθαρότητας LC-MS, και μεταφέρθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 8 mL. Από τα παραπάνω πυκνά πρότυπα διαλύματα παρασκευάστηκε πρότυ διάλυμα εργασίας μίγματος των προσδιοριζόμενων φυτοπροστατευτικών, αντιβιοτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε συγκέντρωση 10 mg/L, σε διαλύτη μεθανόλη LC-MS. Τόσο τα πυκνά πρότυπα διαλύματα, όσο και το μίγμα των φυτοπροστατευτικών, αντιβιοτικών και φαρμακευτικών ενώσεων κλείστηκαν αεροστεγώς με πώμα και αποθηκεύτηκαν απουσία ηλιακής ακτινοβολίας στους -20°C.

Τα αραιωμένα πρότυπα διαλύματα εργασίας (working solutions) των μιγμάτων των φυτοπροστατευτικών, αντιβιοτικών, φαρμακευτικών ενώσεων παρασκευάζονταν σε διαλύτη MeOH LC-MS και σε συγκεντρώσεις 50, 100, 250, 500, 1000, 5000 ng/L. Επίσης τόσο το metobromuron όσο και το μίγμα των δευτεριωμένων εσωτερικών προτύπων παρασκευάστηκαν σε διαλύτη MeOH LC-MS και σε συγκεντρώσεις 1000 και 5000 ng/L.

3.1.1.3 Διαλύτες

Οι διαλύτες μεθανόλη (MeOH, methanol) και το ακετονιτρίλιο (ACN, acetonitrile) βαθμού καθαρότητας LC-MS >99,5% προμηθεύτηκαν από τη Fisher Scientific (Leicestershire, UK). Η ακετόνη (acetone) καθαρότητας >99,9% ήταν του οίκου Honeywell (Morris Plains, NJ, USA) ενώ το νερό καθαρότητας LC-MS προμηθεύτηκε από τον οίκο Fisher Scientific.

3.1.1.4 Αντιδραστήρια και προσροφητικά υλικά

Χρησιμοποιήθηκε οξικό οξύ (HAc) καθαρότητας 98-100%. Για τον καθαρισμό των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκαν το προσροφητικό: C18, LiChroprep RP-18, 40-64 μm του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).

Για τη βελτιστοποίηση και εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS χρησιμοποιήθηκαν:

1. άνυδρο θειικό μαγνήσιο (MgSO_4) καθαρότητας 99,5%
2. οξικό νάτριο (sodium acetate, NaOAc)
3. κιτρικό νάτριο (tri-sodium citrate dehydrate) καθαρότητας 99% του οίκου Merck (Darmstadt, Germany)
4. χλωριούχο νάτριο (sodium chloride, NaCl) του οίκου Riedel de Haën (Hannover, Germany)
5. σεσκιωδρίτης διβασικού κιτρικού νατρίου καθαρότητας 99% (sodium citrate dibasic sesquihydrate) του οίκου Sigma Aldrich (Steinheim, Germany)
6. Πριν την έγχυση στο σύστημα υγρής χρωματογραφίας, τα δείγματα διηθήθηκαν σε φίλτρα σύριγγας με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), με διάμετρο πόρων 0,22 μm και 0,45 μm , του οίκου Millipore (Cork, Ireland) με τη βοήθεια αποστειρωμένων συρίγγων μιας χρήσης όγκου 1 ή 3 ml.

3.1.1.5 Υλικά και Σκεύη

- Πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου 50 ml, 28mm ,του οίκου Millipore (Cork, Ireland)
- Πλαστικοί σωλήνες φυγόκεντρου 15 ml, 17mm ,του οίκου Millipore (Cork, Ireland)
- Αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 2-20 μL , 20-200 μL , 200-1000 μL (Eppendorf, Germany)
- Ποτήρια ζέσεως των 100, 250 και 500 mL
- Πλαστικά ακρορύγχια των 200, 1000 mL για αυτόματες πιπέτες
- Ογκομετρικά συφώνια
- Μεταλλικές σπάτουλες διαφόρων μεγεθών
- Αλουμινόχαρτο

- Πιπέτες Pasteur
- Σύριγγα των 3 και 1 mL- SOFTcare LABORATORY SERIES
- Φίλτρα σύριγγας με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), με διάμετρο πόρων 0,22μm και 0,45μm, του οίκου Millipore (Cork, Ireland)
- Γυάλινα φιαλίδια δειγμάτων με βιδωτό πώμα (2 mL)- Γυάλινο φιαλίδιο Target Analysis A.E. Kinesis
- Micro-inserts (200 μL)
- Ταινία parafilm
- Σκαφίδια

3.1.1.6 Συσκευές

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένο με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany).
- Αναλυτικός ζυγός ακρίβειας 4 δεκαδικών ψηφίων (Denver Instrument Company, AA- 160, Göttingen, Germany).
- Ζυγός ακριβείας τριών δεκαδικών ψηφίων
- Για τη φυγοκέντρωση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή φυγοκέντρωσης μέγιστης ταχύτητας περιστροφής 4000rpm μοντέλο B4i του οίκου Joun (Saint-Herblain, France), ενώ για την ανάδευση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η συσκευή περιδίνησης Vortex IR της STARLAB (Hamburg, Germany).
- Για τη συμπύκνωση των εκχυλισμάτων χρησιμοποιήθηκε θερμαινόμενη συσκευή συμπύκνωσης υπό ήπιο ρεύμα αζώτου Techne Dri-Block DB-3D (Staffordshire, UK), με χρήση γεννήτριας αζώτου μοντέλο NG10LA της Peak Scientific (Illinois,US).
- Η συσκευή υπερήχων Elmasonic P του οίκου Elma Schmidbauer (Singen, Germany), χρησιμοποιήθηκε για την ομογενοποίηση των διαλυμάτων.
- Τέλος, για τη φύλαξη και τη συντήρηση των αντιδραστηρίων, των προτύπων διαλυμάτων και δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν ψυγεία με θερμοκρασία λειτουργίας 4-8 °C και καταψύκτες ελάχιστης θερμοκρασίας -30 °C.

3.1.1.7 Χρωματογραφικό Σύστημα

Για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των επιλεγμένων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκε σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης (Ultra High Performance Liquid Chromatography, UHPLC) συζευγμένο με ανιχνευτή μαζών LTQ/Orbitrap FT. Το

σύστημα περιλαμβάνει αυτόματο δειγματολήπτη (Accela AS autosampler model 2.1.1), αντλία αυτόματης ροής δείγματος (Accela quaternary gradient U-HPLC-pump model 1.05.0900) και φασματοόμετρο μάζας LTQ Orbitrap XL 2.5.5 SP1 της εταιρείας Thermo Fisher Scientific (Bremen, Germany). Το τμήμα της γραμμικής παγίδας ιόντων (LTQ) του υβριδικού αναλυτή μαζών είναι εξοπλισμένο με πηγή ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού, Ion Max Electrospray Ionization (ESI) που λειτουργεί σε μέθοδο θετικών ή αρνητικών ιόντων. Ο έλεγχος του οργάνου και η περαιτέρω επεξεργασία του ακριβούς φάσματος μάζας (mass range m/z 50-2000) με υψηλή διακριτική ικανότητα (60000 FWHM) πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Xcalibur v.2.2 της εταιρείας Thermo Electron (San Jose, CA, USA). Η αντλία παραγωγής αζώτου προμηθεύτηκε από την εταιρεία Brezza-Claid (NiGen LCMS 40-1).

Οι επιλεγμένοι αναλύτες διαχωρίστηκαν σε αναλυτική στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil GOLD (50mm x 2.1mm, 1.9 μ m) της Thermo (Bremen, Germany). Σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή, η σωστή λειτουργία του οργάνου ελέγχονταν εβδομαδιαία με βαθμονόμηση με τη χρήση ενός διαλύματος καφεΐνης, MRFA (πεπτίδιο) και Ultramark 1621 (πολυμερές) στην λειτουργία θετικού ιοντισμού.

3.1.2 Βελτιστοποίηση μεθόδου QuEChERS

Για την εκχύλιση του ψαριού επιλέχθηκε η τεχνική QuEChERS η οποία χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο στη βιβλιογραφία για προετοιμασία δειγμάτων για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων αλλά και φαρμακευτικών ουσιών. Τα βήματα της πειραματικής διαδικασίας που βελτιστοποιήθηκαν ήταν:

- Η επιλογή της μεθόδου εκχύλισης QuEChERS σε υπόστρωμα ψαριού
- Επιλογή και αναλογία προσροφητικών υλικών για απομάκρυνση παρεμποδίζουσων – συνεκχυλιζόμενων ουσιών
- Βελτιστοποίηση του όγκου του τελικού δείγματος

3.2 Εμβολιασμός δειγμάτων

Για τη βελτιστοποίηση και επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου, τα δείγματα ψαριών εμβολιάστηκαν χωριστά κάθε φορά με τα μίγματα των φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών (αντιβιοτικά και φαρμακευτικά) ενώσεων, αφού πρώτα αναλύθηκαν για να διασφαλιστεί η απουσία ιχνών των αναλυτών.

3.2.1 Δοκιμές μεθόδου εκχύλισης QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) σε υπόστρωμα ψαριού

Αρχικά πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με τις τρεις κύριες εκδοχές της μεθόδου QuEChERS: (A) την αυθεντική-πρωταρχική μέθοδο (original QuEChERS), (B) την οξιμισμένη μέθοδο (σύμφωνα με την AOAC) και (C) την μέθοδο με την προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH (buffered QuEChERS) σε ψάρι ώστε να βρεθεί η πιο αποτελεσματική εκδοχή, με τις καλύτερες ανακτήσεις των αναλυτών που μελετώνται.

Κατά το πρώτο στάδιο δεν έγινε καθαρισμός του δείγματος ούτε συμπύκνωση, παρά μόνο αραιώση ακετονιτριλίου με νερό (ACN:H₂O) σε αναλογία 50:50 αντίστοιχα, χρησιμοποιώντας φίλτρα σύριγγας με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE), με διάμετρο πόρων 0,22μm και 0,45μm, του οίκου Millipore (Cork, Ireland) με τη βοήθεια αποστειρωμένων συρίγγων μιας χρήσης όγκου 1, 3 ή 5 mL και στη συνέχεια ξανά αραιώση ακετονιτριλίου με νερό σε αναλογία 50:50 αλλά χωρίς τη χρήση φίλτρων. Έγινε εμβολιασμός των δειγμάτων με τα μίγματα των φυτοφαρμάκων και των φαρμακευτικών ουσιών σε συγκέντρωση από 100 ng/g. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Σχήμα 3.1) περιγράφονται τα στάδια που πραγματοποιήθηκαν για κάθε μία από της μεθόδους QuEChERS.

3.2.1.1 Άλατα εκχύλισης

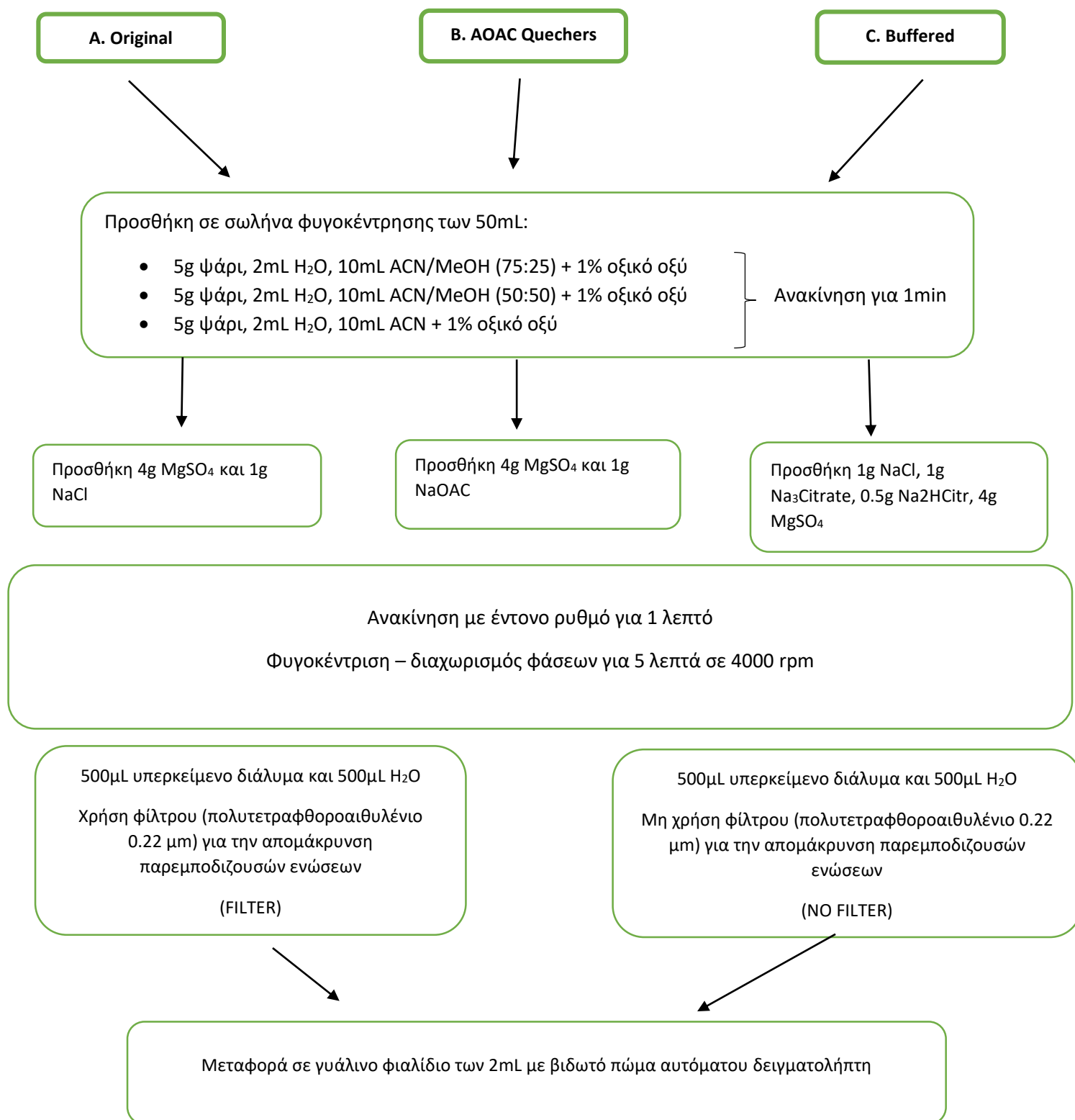
1. 4 g MgSO₄, 1g NaCl, για την «κλασσική μέθοδο» (“original”) (M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck, “Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce”, J. AOAC Int., 86 (2003), 412-431)

2. 4 g MgSO₄, 1g NaCl, 1g tri-sodium citrate dihydrate, 0.5g di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate για τη μέθοδο με την προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH (buffered QuEChERS) (Austrian Standards Institute (2009) European Standard EN15662: Foods of plant origin-Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/ portioning and clean-up by dispersive SPE-QuEChERS-method.)

3. 6 g MgSO₄, 1.5g CH₃COONa (acetic buffer) για τη την οξιμισμένη μέθοδο (σύμφωνα με την AOAC) (AOAC Official Method 2007.01 (2007) Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partioning with Magnesium Sulfate. AOAC Int.)

Η προσθήκη του MgSO₄ αποσκοπεί στην απομάκρυνση του νερού και την αύξηση της ιοντικής ισχύος του υδατικού μίγματος που προκύπτει, ενισχύοντας τον καλύτερο διαχωρισμό της οργανικής φάσης (ακετονιτρίλιο) από την υδατική. Το NaCl βοηθά στην άρση των πολικών παρεμποδίσεων και στην αποφυγή δημιουργίας γαλακτωμάτων. Η χρήση τροποποιητών (buffers) όπως τα κιτρικά άλατα αποτελεί παραλλαγή

της κλασικής μεθόδου και περιλαμβάνει ρύθμιση και διατήρηση του pH σταθερού στη βέλτιστη τιμή με ρυθμιστικά διαλύματα, εμποδίζοντας ταυτόχρονα τη διάσπαση των ευαίσθητων στο pH ενώσεων.



Σχήμα 3.1 : Τα στάδια που πραγματοποιήθηκαν στις τρεις κύριες εκδοχές μεθόδου εκχύλισης QuEChERS.

Αρχικά, κατά (A) την αυθεντική-πρωταρχική μέθοδο (original QuEChERS) ζυγίστηκαν σε 3 φυγοκεντρικούς σωλήνες 5 g ιστού από ψάρι, έγινε εμβολιασμός με 50 μL από το διάλυμα 10 mg/L με το μίγμα των φυτοπροστατευτικών και των φαρμακευτικών ενώσεων αντίστοιχα. Στη συνέχεια προστέθηκαν 2 mL H_2O σε κάθε έναν από τους τρεις φυγοκεντρικούς σωλήνες και προστέθηκε μίγμα διαλύτη ακετονιτρίλιο με μεθανόλη σε αναλογία 75:25 (ACN/MeOH 75:25) μαζί με 500 μL οξικού οξέος. Τέλος, προστέθηκαν τα άλατα MgSO_4 4 g, NaCl 1 g. Κάθε σωλήνας ανακινείται αμέσως μετά την προσθήκη για 30 sec χειροκίνητα για την παρεμπόδιση σχηματισμού κρυσταλλικών συσσωματωμάτων και για να εξασφαλιστεί επαρκής αλληλεπίδραση του διαλύτη με όλο το δείγμα και έπειτα ανακίνηση για 1 min σε vortex (4000 rpm). Ακολουθεί φυγοκέντρωση για 5 min στις 4000 rpm για τον διαχωρισμό των φάσεων και παραλαβή της υπερκείμενης φάσης.

Ύστερα από την φυγοκέντρωση έγινε παραλαβή από κάθε σωλήνα 500 μL από το υπερκείμενο, τα οποία προστέθηκαν σε σύριγγα των 3 mL όπως επίσης προστέθηκαν και 500 μL H_2O στην σύριγγα και στη συνέχεια το εκχύλισμα διηθήθηκε με χρήση φίλτρου σύριγγας (πολυτετραφθοροαιθυλένιο 0.22 μm) για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων και μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο των 2 mL με βιδωτό πώμα αυτόματου δειγματολήπτη για περαιτέρω ανάλυση. Ακολούθησε η ίδια πειραματική διαδικασία χωρίς την χρήση φίλτρων.

Σε ό,τι αφορά τη δημιουργία καμπύλης βαθμονόμησης προσομοίωσης/αντιστοίχισης μήτρας η διαδικασία που ακολούθησε ήταν η εξής:

Σε τρεις φυγοκεντρικούς σωλήνες ζυγίστηκαν 5 g ιστού από ψάρι, προστέθηκαν 2 mL H_2O με ογκομετρικό σιφώνιο καθώς και μείγμα διαλύτη ακετονιτρίλιο με μεθανόλη σε αναλογία 75:25 (ACN/MeOH 75:25) και 500 μL οξικού οξέος. Ύστερα προστέθηκαν τα άλατα MgSO_4 4 g, NaCl 1 g και ακολούθησε ανάδευση χειροκίνητα για 30 sec, ανάδευση σε vortex για 1 min και τέλος έγινε φυγοκέντρωση για 5 min στις 4000 rpm.

Μετά το πέρας των 5 λεπτών έγινε παραλαβή 500 μL από το υπερκείμενο, όπου τοποθετήθηκαν σε σύριγγα του 1 mL με φίλτρο μαζί με 425 μL H_2O , 50 μL από τις φαρμακευτικές ενώσεις και 25 μL από τις φυτοπροσταυτικές ενώσεις. Αντίστοιχα έγινε και για το μη φιλτραρισμένο δείγμα.

Η ίδια πειραματική διαδικασία πραγματοποιήθηκε και για τη δοκιμή όπου για διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν το ακετονιτρίλιο με μεθανόλη σε αναλογία 50:50 (ACN/MeOH 50:50) προσθέτοντας και 500 μL οξικού οξέος και τέλος για τη δοκιμή όπου σαν διαλύτης χρησιμοποιήθηκε μόνο το ακετονιτρίλιο μαζί με 500 μL οξικού οξέος. Ακολουθήθηκε η παραπάνω διαδικασία και στις εκδοχές της εκχύλισης QuEChERS (B) οξινισμένη και (C) Buffered με τη διαφορά ότι στην οξινισμένη χρησιμοποιήθηκαν τα άλατα MgSO_4 4 g, NaOAc 1 g και στην Buffered τα άλατα Tri-sodium citrate dihydrate 1 g, Sodium citrate dibasic 0.5 g, MgSO_4 4 g, NaCl 1 g. Σχετικά με τον διαλύτη εκχύλισης, η επιλογή του ακετονιτρίλιου βασίστηκε

στο γεγονός ότι είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης στις μεθόδους QuEChERS επιτρέποντας την εκχύλιση ενός ευρέος φάσματος παρασιτοκτόνων με διαφορετικές πολικότητες. Η προσθήκη 1% οξικού οξέος σε διαλύτη ακετονιτρίλιο, προάγει την επίδραση εξαλάτωσης και ρυθμίζει το pH του εκχυλίσματος (Rizzeti et al., 2016, Nannou et al., 2018) .

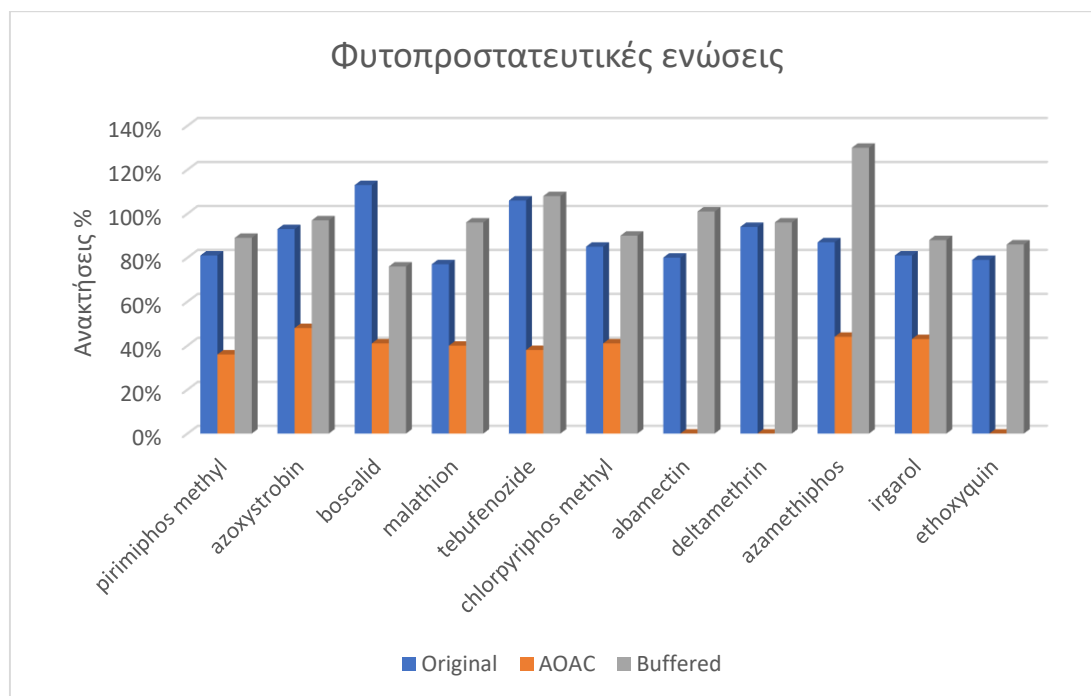
Στην αυθεντική πρωταρχική μέθοδο (original QuEChERS, μέθοδος Α) οι φυτοπροστατευτικές ουσίες παρουσίασαν ανακτήσεις από 77% έως 106% και οι φαρμακευτικές 38% έως 83%. Στην οξινοσμένη μέθοδο (AOAC, μέθοδος Β) οι φυτοπροστατευτικές ουσίες παρουσίασαν ανακτήσεις 36% έως 48% και οι φαρμακευτικές 44% έως 93%. Υψηλότερες ανακτήσεις παρατηρήθηκαν στην μέθοδο με την προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH (buffered QuEChERS) (μέθοδος C) με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE) σε σύγκριση με τις άλλες δύο μεθόδους, καθώς για τις φυτοπροστατευτικές ουσίες οι ανακτήσεις ήταν 76% έως 130% και για τις φαρμακευτικές 72% έως 100% (Σχήμα 3.2, Σχήμα 3.3). Τα ποσοστά ανάκτησης των τριών μεθόδων για τις φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ουσίες αντίστοιχα φαίνονται στον Πίνακα 3.3 και Πίνακα 3.4.

Πίνακας 3.3 Ποσοστά ανάκτησης φυτοπροστατευτικών ουσιών χωρίς καθαρισμό (clean up)

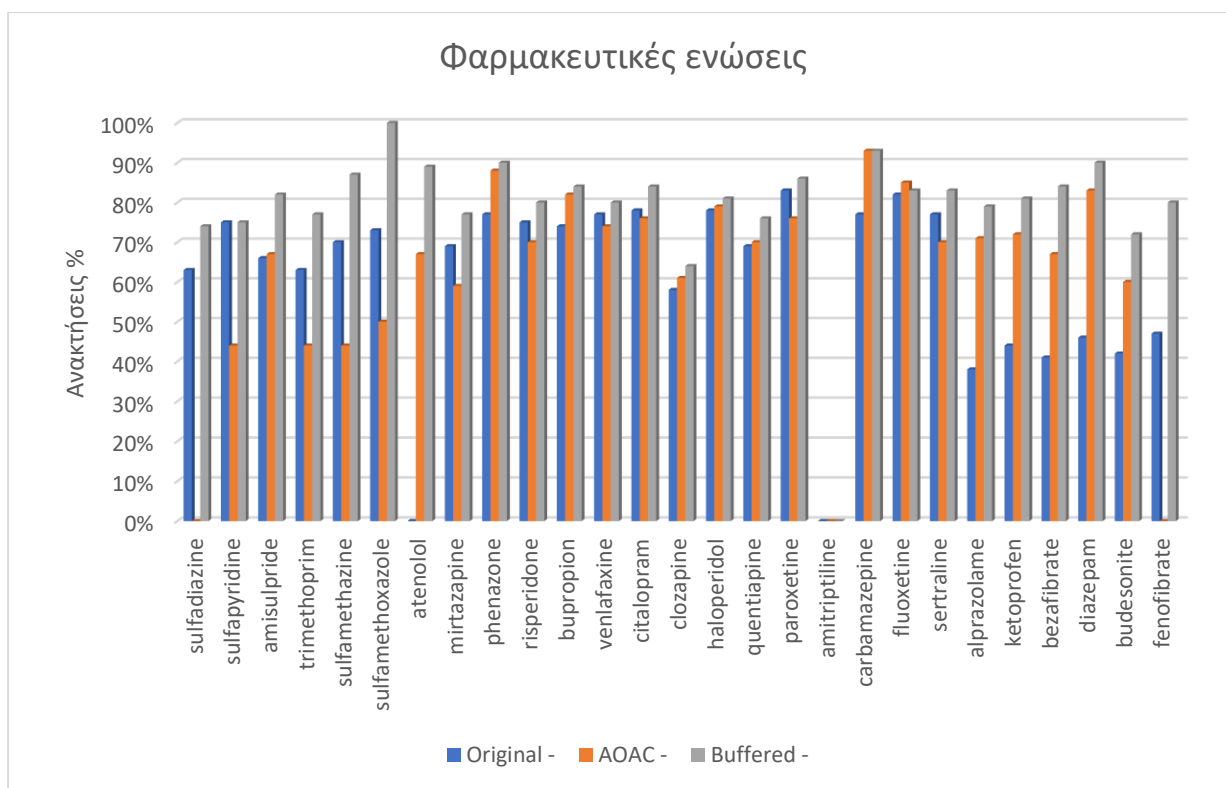
ΕΝΩΣΗ	ΜΕΘΟΔΟΣ		
	Original	AOAC	Buffered
pirimiphos methyl	81%	36%	89%
azoxystrobin	93%	48%	97%
boscalid	113%	41%	76%
malathion	77%	40%	96%
tebufenozide	106%	38%	108%
chlorpyrifos methyl	85%	41%	90%
abamectin	80%	-	101%
deltamethrin	94%	-	96%
azamethiphos	87%	44%	130%
irgarol	81%	43%	88%
ethoxyquin	79%	-	86%

Πίνακας 3.4 Ποσοστά ανάκτησης φαρμακευτικών ουσιών χωρίς καθαρισμό (clean up)

ΕΝΩΣΗ	ΜΕΘΟΔΟΣ		
	Original	AOAC	Buffered
paracetamol	-	-	-
sulfadiazine	63%	-	74%
sulfapyridine	75%	44%	75%
amisulpride	66%	67%	82%
trimethoprim	63%	44%	77%
sulfamethazine	70%	44%	87%
sulfamethoxazole	73%	50%	100%
atenolol	-	67%	89%
mirtazapine	69%	59%	77%
phenazone	77%	88%	90%
risperidone	75%	70%	80%
bupropion	74%	82%	84%
venlafaxine	77%	74%	80%
citalopram	78%	76%	84%
clozapine	58%	61%	64%
haloperidol	78%	79%	81%
quantiapine	69%	70%	76%
paroxetine	83%	76%	86%
amitriptyline	-	-	-
carbamazepine	77%	93%	93%
fluoxetine	82%	85%	83%
sertraline	77%	70%	83%
alprazolame	38%	71%	79%
ketoprofen	44%	72%	81%
bezafibrate	41%	67%	84%
diazepam	46%	83%	90%
budesonite	42%	60%	72%
fenofibrate	47%	-	80%



Σχήμα 3.2 Ποσοστά ανάκτησης (%) με την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων QuEChERS χωρίς καθαρισμό (clean up)



Σχήμα 3.3 Ποσοστά ανάκτησης (%) με την εφαρμογή διαφορετικών μεθόδων QuEChERS χωρίς καθαρισμό (clean up)

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της μεθόδου ως προς το στάδιο του καθαρισμού. Το υλικό που δοκιμάστηκε για τον καθαρισμό του δείγματος ήταν το προσροφητικό υλικό C18. Η χρήση του C18 επιτρέπει την αφαίρεση των λιπιδίων, στερολών, οργανικών οξέων, πρωτεϊνών, καροτινοειδών και άλλων χρωστικών ουσιών πριν από μια ανάλυση GC-MS/MS ή LC-MS/MS. Η μέθοδος που επιλέχθηκε ήταν με την προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH (Buffered QuEChERS) με καθαρισμό (clean-up) με το προσροφητικό υλικό C18. Αφού πραγματοποιήθηκαν τα βήματα ζύγισης ιστού από ψάρι, εμβολιασμός δειγμάτων, προσθήκη διαλυτών και αλάτων, όπως περιγράφεται και παραπάνω, ακολούθησε η φυγοκέντρωση.

Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης έγινε παραλαβή από τον κάθε φυγοκεντρικό σωλήνα 1 mL από το υπερκείμενο διάλυμα και μεταφορά σε σωλήνα φυγοκέντρωσης 15 mL που περιείχε τα προσροφητικά άλατα για τον καθαρισμό (C18, 25 mg). Το υπερκείμενο αναδεύτηκε στο vortex για 1 min και στη φυγόκεντρο για 5 min στις 4000 rpm. Έπειτα, έγινε παραλαβή του υπερκείμενου διαλύματος όπου και τοποθετήθηκε σε νέους φυγοκεντρικούς σωλήνες των 15 mL. Ακολούθησε η συμπύκνωση υπό ήπιο ρεύμα αζώτου για περίπου 1 ώρα και 30 λεπτά. Μετά το πέρας της συμπύκνωσης έγινε επαναδιάλυση σε 500 μ L με τον διαλύτη νερό και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 90:10 (H_2O :ACN 90:10), αναδεύτηκε για 1 min στο vortex και στη συνέχεια το διάλυμα διηθήθηκε με χρήση φίλτρου σύριγγας (πολυτετραφθοροαιθυλένιο 0.22 μ m) των 3 mL για την απομάκρυνση τυχόν σωματιδίων και μεταφέρθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο των 2 mL με βιδωτό πώμα αυτόματου δειγματολήπτη για περαιτέρω ανάλυση.

Κατά το στάδιο αυτό, παρατηρήθηκαν υψηλότερες ανακτήσεις τόσο για τις φαρμακευτικές ενώσεις, όπου το ποσοστό ανάκτησης κυμάνθηκε μεταξύ 84% έως 129%, όσο και για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις όπου τα ποσοστά ανάκτησης κυμάνθηκαν μεταξύ 80% έως 130%.

3.3 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία και φασματομετρία μάζας

Για την χρωματογραφική ανάλυση, οι επιλεγμένες ενώσεις μελετήθηκαν και αναλύθηκαν σε δύο ξεχωριστά μίγματα. Το πρώτο μίγμα περιλάμβανε τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις ενώ το δεύτερο μίγμα όλες τις φαρμακευτικές ενώσεις συμπεριλαμβανομένου και των αντιβιοτικών. Η χρωματογραφική ανάλυση και στις δύο περιπτώσεις περιλάμβανε βαθμωτό πρόγραμμα έκλουσης.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, η κινητή φάση αποτελούνταν από (A) H_2O LC-MS+ 5mM FNH_4^+ 0.1%FA και (B) MeOH LC-MS+ 5mM FNH_4^+ 0.1%FA. Για τον διαχωρισμό των ενώσεων του μίγματος αυτού, χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης συνολικής διάρκειας 10 λεπτών. Η αρχική σύσταση των διαλυτών ήταν 90% (A) και 10% (B). Η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή για 0.6 min και στη συνέχεια το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε έως ότου φτάσει στο 100% στα 5.1 min, όπου και

διατηρήθηκε σταθερή για 1.2 min. Τελικά, το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Η ταχύτητα ροής ήταν σταθερή στα 300 $\mu\text{L min}^{-1}$ και ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) ήταν 5 μL . Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν στους 20°C.

Για τις φαρμακευτικές ενώσεις, η κινητή φάση αποτελούνταν από (A) $\text{H}_2\text{O LC-MS}+0.1\%\text{FA}$ και (B) $\text{MeOH LC-MS}+ 0.1\%\text{FA}$. Για τον διαχωρισμό των ενώσεων του μίγματος αυτού, χρησιμοποιήθηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης συνολικής διάρκειας 10 λεπτών. Η αρχική σύσταση των διαλυτών ήταν 95% (A) και 5% (B). Η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή για 1 min και στη συνέχεια το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε έως ότου φτάσει στο 70% στα 2 min. Στη συνέχεια, το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε εκ νέου σε 100% έως τα 5min όπου και διατηρήθηκε σταθερή για 2 min. Τελικά, το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Η ταχύτητα ροής ήταν σταθερή στα 250 $\mu\text{L min}^{-1}$ και ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) ήταν 5 μL . Η θερμοκρασία του φούρνου ήταν στους 35 °C.

Για τον καθορισμό του χρόνου κατακράτησης των προς ανάλυση ενώσεων αλλά και την επιλογή των ιόντων (m/z) για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε αρχικά σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan) στη μέθοδο θετικού ιονισμού (positive ion mode) και για εύρος μαζών από 120-1000. Για την ταυτοποίηση επιλέχθηκαν τα ψευδο-μοριακά ιόντα $[\text{M}+\text{H}]^+$ για όλες τις ενώσεις εκτός από το Abamectin για το οποίο χρησιμοποιήθηκε το ψευδο-μοριακό ιόν $[\text{M}+\text{Na}]^+$. Οι βασικές παράμετροι της φασματομετρίας μάζας παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5 Παράμετροι φασματομετρίας μάζας

Παράμετροι (Full Scan)	Φυτοφάρμακα	Φάρμακα
Δυναμικό ψεκασμού (spray voltage)	3,7 kV	4,0 kV
Διακριτική ικανότητα (resolution)	60000 FWHM	30000 FWHM
Δυναμικό μεταλλικού τριχοειδούς (capillary voltage)	30 V	50 V
Δυναμικό δακτυλιοειδούς φακού (tube lens)	90 V	90V
Ροή αερίου περιβάλλουσας ροής (sheath gas)	40 au	35 au
Ροή αερίου αποδιαλύτωσης (auxiliary gas flow)	15 au	10 au
Θερμοκρασία τριχοειδούς (capillary temperature)	320 °C	320 °C
Automatic gain control (AGC) target	$4 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^5$

3.4 Ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός με τη χρήση της υγρής χρωματογραφίας- φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και υψηλής ακρίβειας μάζας στηρίχθηκε στα προβλεπόμενα κατά την ΕΕ κριτήρια (*European Commission, SANTE/11813/2017*), δηλαδή στο χρόνο κατακράτησης των ουσιών (t_R), το κύριο ψευδομοριακό ιόν αλλά και ένα τουλάχιστον δευτερεύον διαγνωστικό μοριακό ιόν της ένωσης. Ο χρόνος κατακράτησης (retention time, t_R) των προσδιοριζόμενων ενώσεων στο προς ανάλυση δείγμα, θα πρέπει να συμφωνεί με εκείνον του προτύπου βαθμονόμησης με επίπεδο ανοχής $\pm 0,1\text{min}$.

Οι επιλεγμένες ενώσεις ανιχνεύτηκαν στη μέθοδο θετικού ιονισμού, στη λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan), σε τιμή διακριτικής ικανότητας 60000 FWHM. Η ακριβής πειραματική μάζα για τους επιλεγμένους αναλύτες εκτιμήθηκε με έγχυση πρότυπου διαλύματος σε συγκέντρωση 50 $\mu\text{g/L}$. Το σφάλμα μάζας (Δ) εκφρασμένο σε ppm υπολογίστηκε αυτόματα κάθε φορά από το λογισμικό. Από την εκάστοτε μέτρηση της ακριβούς πειραματικής μάζας και του σφάλματος μάζας ($<3\text{ ppm}$) αποδείχθηκε πως η επιλεγμένη διακριτική ικανότητα και στις δύο περιπτώσεις παρέχει μετρήσεις υψηλής ακρίβειας μάζας.

Για επιβεβαίωση θετικών ανιχνεύσεων, χρησιμοποιήθηκε η θραυσματοποίηση στη λειτουργία ddMS2, για την οποία η διακριτική ικανότητα μειώνεται στα 15000 FWHM. Η ποσοτικοποίηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του κύριου μοριακού ιόντος, το οποίο και παρουσίασε τη μεγαλύτερη σχετική ένταση κατά την ανάλυση των προτύπων.

3.5 Επικύρωση μεθόδου

Η επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων στις εργαστηριακές συνθήκες πραγματοποιήθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα με βάση τις ισχύουσες οδηγίες 2002/657/EK, SANTE/12682/2019 (*European Commission, (2019)*). Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε ως συνδυασμός της επί τοις εκατό ανάκτησης (%Recovery, %R) και της πιστότητας. Η πιστότητα είναι εκφρασμένη ως επαναληψιμότητα εντός της ίδιας ημέρας (repeatability, RSD_r) και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (within-lab-reproducibility, RSD_R). Μελετήθηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) της μεθόδου και η γραμμικότητα (linearity).

Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των αναλυτών πραγματοποιήθηκε με τη χρήση καμπυλών αναφοράς με προσομοίωση υποστρώματος (matrix-matched calibration curves). Η γραμμικότητα της μεθόδου εκφράστηκε με την καμπύλη αναφοράς (calibration curves) επτά σημείων η οποία κάλυπτε εύρος συγκεντρώσεων από το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) της κάθε ένωσης έως περίπου 100 φορές την τιμή αυτή (100 LOQ).

Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν με την πραγματοποίηση τριών διαδοχικών εκχυλίσεων ($n=3$) δειγμάτων εμβολιασμένων σε δυο επίπεδα συγκέντρωσης για τις φυτοπροστατευτικές ουσίες και τριών διαδοχικών εκχυλίσεων ($n=3$) σε ακόμη δύο επίπεδα για τις φαρμακευτικές ουσίες.

Η πιστότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε ως η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) που προκύπτει για διαδοχικές εκχυλίσεις εμβολιασμένου δείγματος την ίδια ημέρα, από τον ίδιο αναλυτή, οπότε εκφράζει την επαναληψιμότητα (repeatability, RSD_r) καθώς και για την ίδια διαδικασία σε τρεις διαφορετικές μέρες, οπότε εκφράζει την αναπαραγωγιμότητα (reproducibility, RSD_R). Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης που θεωρούνται αποδεκτές είναι $\leq \pm 20\%$.

3.6 Επίδραση υποστρώματος (matrix effect)

Στην περίπτωση που η απόκριση των αναλυτών στο εκχύλισμα είναι αυξημένη (ενίσχυση σήματος, signal enhancement) ή μειωμένη (καταστολή σήματος, signal suppression) σε σχέση με το σήμα τους στο διαλύτη, τότε πρόκειται για ένα ανεπιθύμητο φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος (matrix effect), το οποίο δυσκολεύει την ανάλυση και μπορεί να επηρεάσει σε μεγάλο βαθμό την ανθεκτικότητα της μεθόδου, και κατά συνέπεια την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Trufelli et al., 2011).

Κατά τη χρήση υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας, όπου χρησιμοποιείται ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό, η επίδραση του υποστρώματος είναι σημαντική, καθώς η πηγή ιοντισμού με ψεκασμό ηλεκτρονίων (ESI) εμφανίζει την τάση να ιονίζει άλλες ενώσεις. Η επίδραση υποστρώματος προκαλείται από τη συνέκλωση των συστατικών του υποστρώματος, τα οποία συστατικά επηρεάζουν την ικανότητα ιοντισμού των αναλυτών. Ειδικότερα, τα συστατικά του υποστρώματος ανταγωνίζονται με τους αναλύτες για την πρόσβαση στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Επιπρόσθετα, έχει παρατηρηθεί επίδραση του υποστρώματος σε περιπτώσεις όπου οι αναλύτες προσροφώνται στην περιεχόμενη οργανική ύλη των δειγμάτων και κατά συνέπεια να παρατηρείται μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερα διαλυμένων ουσιών και παρεμπόδιση της ανίχνευσής τους. Τα συστατικά του υποστρώματος μπορεί επίσης να επηρεάζουν το ιξώδες και την επιφανειακή τάση του εκλούσματος της στήλης, τον σχηματισμό σταγονιδίων και κατά συνέπεια τη διαδικασία εξάτμισης, επηρεάζοντας έτσι τον αριθμό των φορτισμένων ιόντων. Επιπλέον, τα μη πτητικά συστατικά μπορούν να σχηματίσουν στερεά σωματίδια συμπεριλαμβάνοντας και τις αναλυόμενες ενώσεις.

Σε μερικές περιπτώσεις, τα συστατικά του υποστρώματος μπορούν να δρουν ως αντιδραστήρια σύζευξης ιόντων με ήδη ιοντισμένους αναλύτες. Τέλος, η ύπαρξη διαφόρων παρεμποδιστών στο αρχικό υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της γραμμής αναφοράς, (baseline) και κατά συνέπεια λανθασμένες μετρήσεις των εμβαδών τους. Η επίδραση του υποστρώματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο

τύπος του δείγματος, η προκατεργασία που δέχεται, η τεχνική εκχύλισης ή και του καθαρισμού, η σύσταση της κινητής φάσης, η γεωμετρία και ο σχεδιασμός της πηγής ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού κ.ά. Γενικότερα, έχει παρατηρηθεί ότι τα μικρά, μέτρια πολικά μόρια, όπως αρκετά φαρμακευτικά και σύγχρονα φυτοφάρμακα, είναι πιο ευαίσθητα στη μείωση του σήματος. (Νάννου, 2018). Η σύγκριση των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σε καθαρό διαλύτη με τις καμπύλες αναφοράς προτύπων διαλυμάτων σε δείγματα υποστρώματος για τον υπολογισμό της επίδρασης του υποστρώματος πραγματοποιήθηκε με την Εξίσωση 3.1.

$$ME (\%) = \left(\frac{\text{Απόκριση προτύπων στο υπόστρωμα}}{\text{Απόκριση προτύπων σε καθαρό διαλύτη}} - 1 \right) \times 100$$

Εξίσωση 3.1 Επίδραση μήτρας-υποστρώματος ME(%) σε ψάρι

Όταν η ME είναι 0% δεν υφίσταται καμία επίδραση μεταξύ υποστρώματος και αναλύτη. Όταν οι τιμές της ME είναι μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ όταν είναι μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ME% μεταξύ –20% και 20% θεωρείται πως το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος και η επίδραση θεωρείται μη σημαντική. Για τιμές μεταξύ –50% και –20% ή 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια, ενώ για τιμές μικρότερες του –50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή (Nannou et al., 2018).

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4 Επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε ψάρια.

4.1 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου σε δείγματα ψαριού

Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες προσομοίωσης του υποστρώματος σε συγκεντρώσεις LOQ-500 µg/kg. Η καμπύλη έγινε με τις συγκεντρώσεις 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 µg/kg μίγματος φαρμακευτικών και φυτοπροσταυτικών ουσιών αντίστοιχα. (Πίνακας 4.1 και Πίνακας 4.2)

Πίνακας 4.1: Επικύρωση της γραμμικότητας προσομοίωσης του υποστρώματος για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

ΦΥΤΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ	ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	R^2
Azamethiphos	LOQ-500	$Y = -379371 + 1687.5x$	0,9990
Azoxystrobin	LOQ-500	$Y = -359722 + 221013x$	0,9999
Boscalid	LOQ-500	$Y = -853931 + 51539.1x$	0,9956
Irgarol	LOQ-500	$Y = 841733 + 469136x$	0,9999
Malathion	LOQ-500	$Y = -507675 + 41536.4x$	0,9992
Tebufenozide	LOQ-500	$Y = -396237 + 56042.7x$	0,9991
Ethoxyquin	LOQ-500	$Y = 14295.3 + 19.5566x$	0,9921
Pirimiphos methyl	LOQ-500	$Y = -12008.1 + 423779x$	0,9945
Chlorpyrifos methyl	LOQ-500	$Y = -104730 + 4645.62x$	0,9975

Πίνακας 4.2: Επικύρωση της γραμμικότητας προσομοίωσης του υποστρώματος για τις φαρμακευτικές ενώσεις

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΕΥΡΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΩΝ	ΚΑΜΠΥΛΗ ΒΑΘΜΟΝΟΜΗΣΗΣ	r^2
Paracetamol	LOQ-500	$Y = -536159 + 11428.3x$	0,9574
Sulfadiazine	LOQ-500	$Y = -154200 + 13306.9x$	0,9929
Sulfapyridine	LOQ-500	$Y = 44736.1 + 40360.5x$	0,9965
Amisulpride	LOQ-500	$Y = 2.0341e+006 + 361859x$	0,9935
Trimethoprim	LOQ-500	$Y = -442441 + 166701x$	0,9973
Sulfamethazine	LOQ-500	$Y = -571147 + 60535.3x$	0,9929
Sulfamethoxazole	LOQ-500	$Y = -103737 + 38971.2x$	0,9998
Atenolol	LOQ-500	$Y = 209778 + 29438.8x$	0,9969
Mirtazapine	LOQ-500	$Y = 1.3021e+006 + 172483x$	0,9896
Phenazone	LOQ-500	$Y = 1.54503e+006 + 236145x$	0,9937
Risperidone	LOQ-500	$Y = 303864 + 903832x$	0,9443
Bupropion	LOQ-500	$Y = 751148 + 129079x$	0,9984
Venlafaxine	LOQ-500	$Y = 79427.3 + 356030x$	0,9897
Citalopram	LOQ-500	$Y = 2.27307e+006 + 168441x$	0,9955
Clozapine	LOQ-500	$Y = -698654 + 97333.3x$	0,9989
Haloperidole	LOQ-500	$Y = 3.5472e+006 + 180241x$	0,9897
Quetiapine	LOQ-500	$Y = 829960 + 301471x$	0,9960
Paroxetine	LOQ-500	$Y = 279039 + 207387x$	0,9979
Amitriptyline	LOQ-500	$Y = 2.56087e+006 + 377905x$	0,9933
Carbamazepine	LOQ-500	$Y = 197421 + 79784.7x$	0,9942
Fluoxetine	LOQ-500	$Y = 1.41825e+006 + 261730x$	0,9942
Sertraline	LOQ-500	$Y = -255034 + 146149x$	0,9928
Alprazolam	LOQ-500	$Y = -624660 + 119661x$	0,9933
Ketoprofen	LOQ-500	$Y = -64556.4 + 31816.5x$	0,9992
Bezafibrate	LOQ-500	$Y = -168867 + 30829.2x$	0,9992
Diazepam	LOQ-500	$Y = 472053 + 165430x$	0,9988
Budesonide	LOQ-500	$Y = -453958 + 50847.1x$	0,9985
Fenofibrate	LOQ-500	$Y = -662951 + 25288.1x$	0,9891

Η εκτίμηση της ακρίβειας της μεθόδου βασίστηκε στον υπολογισμό των ανακτήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα ψαριού. Εμβολιάστηκαν τρία δείγματα ψαριού ($n=3$) τα οποία αναλύθηκαν την ίδια μέρα, για να υπολογιστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r), και σε τρεις διαδοχικές ημέρες για να υπολογιστεί η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R). Τα επίπεδα εμβολιασμού για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις ήταν 20 ng/g (0,016 μg/kg) και 150 ng/g (0,12 μg/kg), ενώ για τις φαρμακευτικές ήταν 25 ng/g (0,02 μg/kg) και 250 ng/g (0,2 μg/kg). Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας τη συγκέντρωση που υπολογίστηκε μετά την εφαρμογή της μεθόδου QuEChERS στα εμβολιασμένα δείγματα, με το επίπεδο του εμβολιασμού.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού στο χαμηλό επίπεδο (20 ng/g) κυμάνθηκαν από 68,5% έως 139,5%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) για το χαμηλό επίπεδο ήταν για όλες τις ενώσεις μικρότερη από 11,2% και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ήταν μικρότερη από 13,6%. Οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού στο υψηλό επίπεδο (150 ng/g) κυμάνθηκαν από 77,8% έως 113,9%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) για το υψηλό επίπεδο ήταν για όλες τις ενώσεις μικρότερη από 11,8% και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ήταν μικρότερη από 13,8%.

Αντίστοιχα για τις φαρμακευτικές ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού στο χαμηλό επίπεδο (25 ng/g) κυμάνθηκαν από 51,8% έως 112,5%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) για το χαμηλό επίπεδο ήταν για όλες τις ενώσεις μικρότερη από 13,9% και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ήταν μικρότερη από 15,7%. Οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού στο υψηλό επίπεδο (250 ng/g) κυμάνθηκαν από 69,8% έως 117,3%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSD_r) για το υψηλό επίπεδο ήταν για όλες τις ενώσεις μικρότερη από 12,9% και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) ήταν μικρότερη από 15,7%.

Να σημειωθεί ότι το ανώτατο αποδεκτό όριο για όλες τις περιπτώσεις είναι το 20% το οποίο δεν ξεπέρασε καμία από τις φυτοπροστατευτικές και φαρμακευτικές ενώσεις.

Στον Πίνακα 4.3 δίνονται οι ανακτήσεις για το επίπεδο των 20 ng/g, οι ανακτήσεις, η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα για το επίπεδο των 150 ng/g της μεθόδου για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις. Αντίστοιχα στον Πίνακα 4.4 δίνονται οι ανακτήσεις για το επίπεδο των 25 ng/g και οι ανακτήσεις, η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα για το επίπεδο των 250 ng/g της μεθόδου για τις φαρμακευτικές ενώσεις.

Τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης της μεθόδου (LOQ και LOD) αποτελούν την ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη που αντιστοιχεί σε λόγο σήματος προς θόρυβο 3 και 10 αντίστοιχα. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD) κυμάνθηκαν από 0,06 ng/g (pirimiphos methyl) έως 6,25 ng/g (azamethiphos) και 0,06 ng/g (ethoxyquin) έως 2,5 ng/g

(azamethiphos, chlorpyrifos). Για τις φαρμακευτικές ενώσεις τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0,1 ng/g (risperidone) έως 12,5 ng/g (paracetamol, sulfadiazine, fenofibrate) και 0,03 ng/g (risperidone) έως 6,25 ng/g (fenofibrate). (Πίνακας 4.5, Πίνακας 4.6)

Πίνακας 4.3: Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγικότητα των φυτοπροστατευτικών ενώσεων

	20 ng/g			150 ng/g		
	R(%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	R(%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)
azamethiphos	97,5	7,3	11,9	99,9	10,5	13,8
azoxystrobin	88,8	8,8	9,5	77,8	7,1	12,9
boscalid	113,9	6,5	12,4	99,3	5,6	10,3
irgarol	109,7	9,1	10,8	96	6,9	9,1
malathion	97,6	11,2	13,6	107,7	8,1	10,8
tebufenozide	139,5	7,5	8,6	113,9	6,9	9,4
clorpyrifos methyl	68,5	10,4	12,9	95,5	11,8	13,8
ethoxyquin	108,2	9,3	10,2	77,9	8,8	8,9
pirimiphos methyl	115,9	8,6	13,5	99,5	6,9	9,4

Πίνακας 4.4 : Ανακτήσεις (%), επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα των φαρμακευτικών ενώσεων

	25ng/g			250ng/g		
	R(%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)	R(%)	RSD _r (%)	RSD _R (%)
paracetamol	78,3	12,6	13,8	103,6	11,4	14,7
sulfadiazine	90,6	8,8	13,2	79,4	9,4	15,7
sulfapyridine	112,5	7,6	10,8	107,8	5,6	8,5
amisulpride	95,5	8,9	12,3	85,7	7,8	9,1
trimethoprim	108,3	7,9	11,7	83,8	9,6	10,8
sulfamethazine	51,8	11,9	14,3	94,4	10,7	12,6
sulfamethoxazole	97,5	13,8	15,7	96,8	12,3	13,7
atenolol	85,1	10,5	12,4	94,2	7,8	8,9
mirtazapine	91,5	8,6	9,2	99,3	6,9	8,9
phenazone	75,4	5,8	9,5	110,9	6,1	10,8
risperidone	100,5	8,3	10,6	100,5	5,9	7,3
bupropion	69,1	11,6	13,5	94,8	7,5	8,9
venlafaxine	107,8	9,7	12,2	105,6	8,6	9,3
citalopram	96,1	8,3	11,4	97,4	5,9	7,3
clozapine	107,8	9,7	14,2	88,4	7,9	9,5
haloperidol	87,8	7,1	9,8	99,3	8,3	10,8
quetiapine	104,2	7,8	9,2	86,7	8,9	13,8
paroxetine	78,6	11,5	14,7	106,6	9,5	12,6
amitriptyline	89	9,9	12,6	96,8	8,6	10,6
carbamazepine	92,2	10,8	14,5	108,8	8,4	12,8
fluoxetine	86,6	8,5	13,7	89,4	7,8	11,8
sertraline	83,6	9,5	11,3	102	7,5	10,5
alprazolame	83,6	6,5	9,2	102	8,9	11,8
ketoprofen	81,6	7,4	9,6	75,2	9,6	10,5
bezafibrate	86,3	10,8	13,3	117,3	7,8	9,8
diazepam	87,9	7,5	10,5	101,9	6,8	8,5
budesonite	77,7	13,9	15,5	108,6	9,8	13,8
fenofibrate	99,7	9,8	12,4	69,8	12,9	15,7

Πίνακας 4.5: Όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD) για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

	LOQ(ng/g)	LOD(ng/g)
azamethiphos	6,25	2,5
azoxystrobin	0,25	0,1
boscalid	1,25	0,6
irgarol	0,1	0,6
malathion	0,25	0,1
tebufenozide	0,3	0,1
chlorpyrifos	6,25	2,5
ethoxyquin	0,1	0,06
pirimiphos methyl	0,06	0,02

Πίνακας 4.6: Όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD) για τις φαρμακευτικές ενώσεις

	LOQ(ng/g)	LOD(ng/g)
paracetamol	12,5	5
sulfadiazine	12,5	3,75
sulfapyridine	2,5	0,6
amisulpride	0,3	0,1
trimethoprim	1,25	0,3
sulfamethazine	1,25	0,3
sulfamethoxazole	6,25	2,5
atenolol	1,25	0,6
mirtazapine	0,25	0,1
phenazone	0,3	0,1
risperidone	0,1	0,03
bupropion	0,6	0,1
venlafaxine	1,25	0,3
citalopram	0,25	0,1
clozapine	0,6	0,25
haloperidol	0,25	0,1
quetiapine	0,6	0,25
paroxetine	0,6	0,1
amitriptyline	0,6	0,1
carbamazepine	0,6	0,25
fluoxetine	0,25	0,06
sertraline	1,25	0,3

	LOQ(ng/g)	LOD(ng/g)
alprazolame	1,8	0,6
ketoprofen	2,5	0,6
bezafibrate	1,8	0,6
diazepam	0,25	0,1
budesonite	2,5	1,25
fenofibrate	12,5	6,25

4.2 Επίδραση υποστρώματος

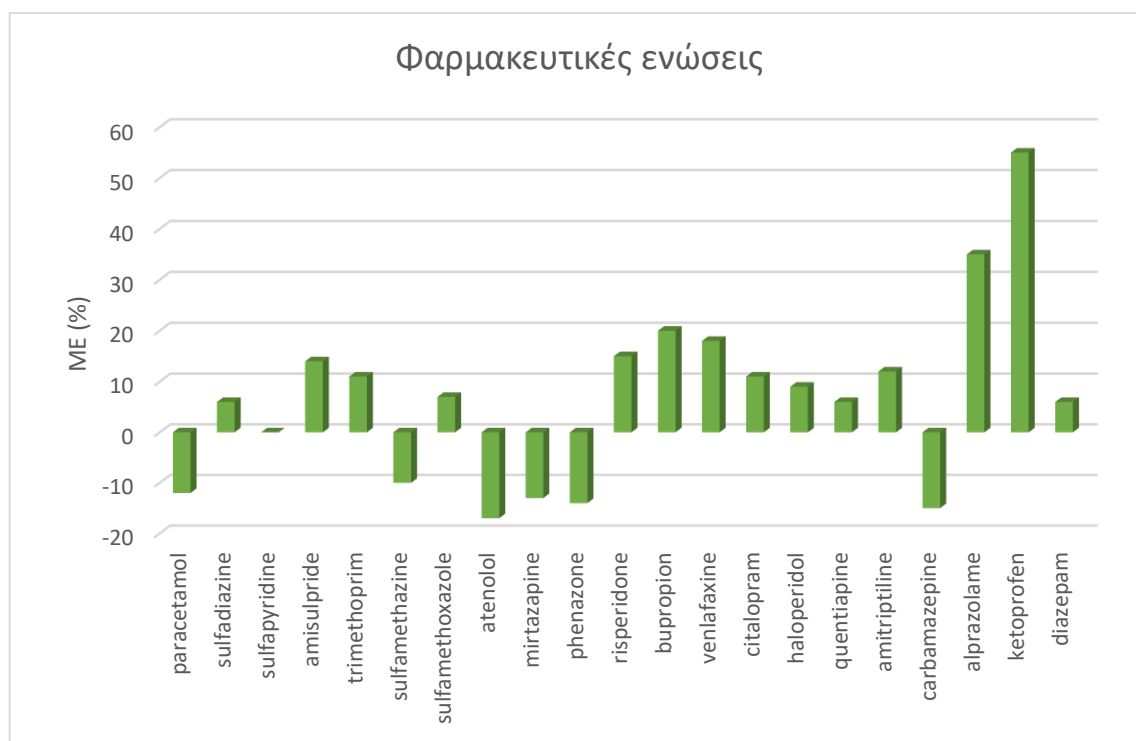
Η χρήση καμπυλών βαθμονόμησης με προσομοίωση υποστρώματος συνέβαλε σημαντικά στην ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων στους υπολογισμούς εξαιτίας του βαθμού στον οποίο επηρεάζεται ο ιοντισμός. Ως γνωστόν, για τιμές μικρότερες του 0% η επίδραση υποστρώματος μειώνει το αναλυτικό σήμα, ενώ για μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ME (Matrix Effect) μεταξύ -20% και 20% θεωρείται ότι το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος.



Σχήμα 4.1: Επίδραση υποστρώματος (%) στις φυτοπροστατευτικές ενώσεις

Στο Σχήμα 4.1, μόνο το boscalid έχει αρνητική τιμή (-0,4%) συνεπώς στην περίπτωση αυτή η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το αναλυτικό σήμα. Σε όλες τις άλλες περιπτώσεις η επίδραση του υποστρώματος

αυξάνει το αναλυτικό σήμα και μάλιστα στην περίπτωση του abamectin η επίδραση του υποστρώματος είναι μεγαλύτερη από 20% συνεπώς παρατηρείται ισχυρή επίδραση.



Σχήμα 4.2: Επίδραση υποστρώματος (%) στις φαρμακευτικές ενώσεις

Στο Σχήμα 4.2 φαίνεται πως το sulfamethazine, paracetamol, atenolol, mirtazapine, phenazone και carbamezapine έχουν αρνητική τιμή, άρα στις περιπτώσεις αυτές η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το αναλυτικό σήμα. Σε όλες τι άλλες περιπτώσεις η επίδραση του υποστρώματος αυξάνει το αναλυτικό σήμα και μάλιστα στην περίπτωση του ketoprofen και του alprazolame η επίδραση του υποστρώματος (%) είναι μεγαλύτερη από 20% συνεπώς ασκείται ισχυρή επίδραση.

4.2 Συμπεράσματα

Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε αναλυτική μέθοδος QuEChERS για τον προσδιορισμό εννιά (9) συνολικά φυτοπροστατευτικών ενώσεων και είκοσι οκτώ (28) φαρμακευτικών ενώσεων σε δείγμα ψαριού (λαβράκι). Το κυριότερο κριτήριο για την επιλογή των μελετώμενων ενώσεων ήταν η συχνότητα εφαρμογής τους. Η εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων από τα δείγματα ψαριού πραγματοποιήθηκε εφαρμόζοντας τις τρεις κύριες προσεγγίσεις της εκχύλισης QuEChERS και επιλέχθηκε εν τέλει το καταλληλότερο πρωτόκολλο για την εκχύλιση των επιλεγμένων ενώσεων.

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιλεγμένων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπερυψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (Ultra High Pressure Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry, UHPLC-MS) και πιο συγκεκριμένα με τον υβριδικό αναλυτή μαζών LTQ/Orbitrap MS. Η ποσοτικοποίηση έγινε με καμπύλες αναφοράς προσομοιωμένες στο υπόστρωμα (matrix-matched calibration curves).

Η καταλληλότερη μέθοδος ήταν η Buffered (προσθήκη αλάτων ρύθμισης του pH), χρησιμοποιήθηκαν 2 g νωπού, τεμαχισμένου και ομογενοποιημένου δείγματος ψαριού, τα άλατα MgSO_4 (4 g), NaCl (1 g), tri-sodium citrate dehydrate (1 g), di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate (0,5 g), έγινε καθαρισμός με το προσροφητικό υλικό C18, ακολούθησε συμπύκνωση υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση με τον διαλύτη νερό και ακετονιτρίλιο σε αναλογία 90:10 ($\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$). Τέλος, τα δείγματα διηθήθηκαν μέσω φίλτρων σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0,22 μm .

Η καταλληλότητα της QuEChERS για τον προσδιορισμό των επιλεγμένων ενώσεων στα δείγματα ψαριού επιβεβαιώθηκε από τα αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου. Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού για το χαμηλό επίπεδο (20 ng/g) κυμάνθηκαν από 68,5% έως 139,5% και για το υψηλό επίπεδο (150 ng/g) από 77,8% έως 113,9%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSDr) για το χαμηλό επίπεδο ήταν μικρότερη από 11,2% και για το υψηλό μικρότερη από 11,8%. Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) για το χαμηλό επίπεδο ήταν μικρότερη από 13,6% και για το υψηλό μικρότερη από 13,8%.

Αντίστοιχα, για τις φαρμακευτικές ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων εμβολιασμού για το χαμηλό επίπεδο κυμάνθηκαν από 51,8% έως 112,5% και για το υψηλό από 69,8% έως 117,3%. Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (RSDr) για το χαμηλό επίπεδο ήταν μικρότερη από 13,9% και για το υψηλό μικρότερη από 12,9%. Επίσης, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (RSD_R) για το χαμηλό επίπεδο ήταν μικρότερη από 15,7% και για το υψηλό μικρότερη από 15,7%.

Για τις φυτοπροστατευτικές ενώσεις, τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) και ανίχνευσης (LOD) κυμάνθηκαν από 0,06 ng/g έως 6,25 ng/g και 0,06 ng/g έως 2,5 ng/g και για τις φαρμακευτικές ενώσεις τα όρια ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0,1 ng/g έως 12,5 ng/g και 0,03 ng/g έως 6,25 ng/g.

Εν κατακλείδι, η τεχνική QuEChERS σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας είναι μία αποδοτική μεθοδολογία για την ανάλυση φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες σε δείγματα ψαριών. Από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθόδου που αναπτύχθηκε είναι ο μικρός συνολικός χρόνος ανάλυσης, ο μικρός αριθμός των σταδίων και το δυναμικό εύρος των προσδιοριζόμενων ενώσεων.

Η φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας, αποδεικνύεται πολύτιμο εργαλείο για την αναλυτική χημεία και την περιβαλλοντική ανάλυση. Η υψηλή διακριτική ικανότητα και η υψηλή ακρίβεια μάζας προσφέρει εξαιρετικά ακριβείς και αξιόπιστες μετρήσεις, εξαλείφοντας σχεδόν την πιθανότητα ψευδών αποτελεσμάτων ακόμα και σε πολύπλοκα υποστρώματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alabaster, J.S. and Lloyd, R. (1980) *Water Quality for Fresh Fish*. Butterworths, London, 283 p., *Journal of Geoscience and Environment Protection*, Vol.5 No.8, August 7, (2017)

AOAC Official Method 2007.01 *Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate* AOAC Int., (2007)

APHA. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. 21st Edition, APHA, Washington DC., (2005)

Austrian Standards Institute European Standard EN15662: Foods of plant origin- Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/portioning and clean-up by dispersive SPE- QuEChERS- method, (2009)

C.I. Nannou, V.I. Boti, T.A. Albanis, “Trace analysis of pesticide residues in sediments using liquid chromatography- high- resolution Orbitrap mass spectrometry”, *Anal. Bioanal. Chem.*, 410 (2018), 1977-1989

Cao, Y., Jiang D., Li F., Chen J., Li W., Jiao Y., “Determination of 20 polychlorinated biphenyls in fish samples by gas chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry isotope dilution method”, *Volume 36, Issue 7*, (2018), 685-692

Chapman, D. (1992) *Water Quality Assessment: A Guide to the Use of Biota, Sediment and Water in Environmental Monitoring*. WHO, Geneva, 585 p., *Journal of Environmental Protection*, Vol.5 No.13, October 23, (2014)

Coralia V., *Application of QuEChERS for Determining Xenobiotics in Foods of Animal Origin*, *Journal of Analytical Methods in Chemistry* Volume (2017)

Dosis I., Kamarianos A., Athanasiadou M., Athanasiadis I., Karamanlis X., *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in marine sediments of Thermaikos gulf, Greece*. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 91 (12), 1151 – 1165, (2011).

Dosis Ioannis, Ioannis Athanasiadis, Xanthippos Karamanlis. *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in mussels from cultures and natural population*. *Marine Pollution Bulletin* 107 (2016) 92–101, pp 92-101.

EPA *National recommended water quality criteria*. United States Environmental Protection Agency. EPA 2004.

Eric Carmona, Vicente Andreub, Yolanda Picó, “Multi-residue determination of 47 organic compounds in water, soil, sediment and fish—Turia River as case study”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 146 (2017) 117–125

European Commission, (2019). *Analytical Quality Control and Method Validation for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed* (SANTE/126 European Commission, 2019. *Analytical Quality Control and Method Validation for*

Pesticide Residues Analysis in Food and Feed SANTE/12682/2019) . Sante/12682/2019, 1–48.
https://www.eurlpesticides.eu/userfiles/file/EurlALL/AqcGuidance_SANTE_2019_12682.pdf

European Commission, Council Directive 96/23/EC Concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Communities, 211 (2002), 8-36

European Commission, SANTE/ 11813/2017, Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed (2017)
followed by LC-MS/MS determination, *Science of the Total Environment* 653 (2019) 958–967

H. Trufeli, P. Palma, G. Famigliini, A. Cappiello, “An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry”, *Mass Spectrom, Rev.*, 30 (2011)

Ho CS et al.. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications, *Clinical Biochemist Reviews*. 24(1): 3–12., (2003)

J.M. Peña-Herrera, N. Montemurro, D. Barceló, S. Pérez, “Development and validation of an analytical method for determination of pharmaceuticals in fish muscle based on QuEChERS extraction and SWATH acquisition using LC-QTOF-MS/MS system”, *Talanta* 199 (2019) 370-379

Kashif Ameer, Hafiz Muhammad Shahbaz, and Joong-Ho Kwon, *Green Extraction Methods for Polyphenols from Plant Matrices and Their Byproducts: A Review*, (2017)

Katerina Grabicova , Andrea Vojs Sta_nov, Olga Koba Ucu, Adam Borik, Tomas Randak, Roman Grabic “Development of a robust extraction procedure for the HPLC-ESI-HRPS determination of multi-residual pharmaceuticals in biota samples”, *Analytica Chimica Acta* 1022 (2018) 53-60

Kilikidis S., A.Kamarianos, X.Karamanlis, U.Giannakou. *Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the effluents of an urban waste treatment plant and the waters, sediments and mussels of Thermaikos gulf (N.Greece)* (1994). *Fresenius Envir. Bull.* 3(5):293-299 (1994).

Kilikidis S., A.Kamarianos, X.Karamanlis, U.Giannalou (1994b). Concentrations of LAS in the municipal waste water of the city of Thessaloniki and the receiver gulf of Thermaikos (N.Greece) (1994). *Fresenius Envir. Bull.* 3:95-100 (1994).

Lei Gao, Dongli Qin, Xiaoli Huang, Song Wu, Zhongxiang Chen, Shizhan Tang & Peng Wang Eric Carmona et.al., “Determination of pesticides and Pharmaceuticals from Fish Cultivation Water by parallel solid-phase extraction (SPE) and liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry (LC-QTOF-MS)”, ISSN: 0003-2719 (Print) 1532-236X (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/lanl20>, (2017)

Lijun Xu & Xiaohuan Miao & Zhaoguang Yang & Haipu Li & Bo Qiu, “Solid-Phase Extraction Combined with Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Based on Solidification of Floating Organic Droplet for Simultaneous Determination of Organochlorine Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Fish”, *Food Analytical Methods* (2019) 12:1871–1885

M. Anastasiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck “Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce”, *J. AOAC Int.*, 86 (2003), 412-431

Maria Vittoria Barbieri et al., Analysis of 52 pesticides in fresh fish muscle by QuEChERS extraction followed by LC-MS/MS determination, (2019)

Ricklefs E.R. (1996). *The Economy of Nature*. 4th edition. W.H. Freeman and Co. USA. (1996)

Thomson M., Ellison S.L.R. and Wood R. Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report), *Pure Applied Chemistry*, 74(5), 835-855, (2002)

Wilm M, Principles of Electrospray Ionization. *Molecular & Cellular Proteomics* 10: 10.1074/mcp.M111.009407, 1–8, (2011).

Yongli Yuana, Xiaoting Lina, Tianhua Li a, Tianyu Panga, Youren Donga, Rongjie Zhuoa, Qiqin Wang b,*, Yuting Caoa, Ning Gana., “A solid phase microextraction Arrow with zirconium metal–organic framework/molybdenum disulfide coating coupled with gas chromatography–mass spectrometer for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in fish samples”, *Journal of Chromatography A*, 1592 (2019) 9-18

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αληγιάννης Νεκτάριος (Επικ. Καθηγητής), Μητάκου Σοφία (Αναπλ. Καθηγήτρια), Ειδικά Μαθήματα Φαρμακογνωσίας, Εθνικό Και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών Τμήμα Φαρμακευτικής Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας & Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Αθήνα (2011)

Καμαριανός Α. Σημειώσεις: Υδάτινο περιβάλλον- αλληλεπιδράσεις μεταξύ περιβάλλοντος και υδατοκαλλιεργειών. Α.Π.Θ., Τμήμα Εκδόσεων, Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο (2000).

Κανδυλιάρη Π. Αικατερίνη, Ανάλυση υποπροϊόντων ψαριών ιχθυοκαλλιέργειας και διερεύνηση της βιοδραστικότητας τους, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Επιστήμης Τροφίμων και Διατροφής του Ανθρώπου, Εργαστήριο Χημείας και Ανάλυσης Τροφίμων, Μονάδα Διατροφής του Ανθρώπου, Διδακτορική διατριβή, Αθήνα (2020)

Καρακίτσου Αναστασία, Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε αγροτικά προϊόντα και εκτίμηση της διατροφικής πρόσληψης, Πανεπιστήμιο Δυτικής Ελλάδας, Τμήμα διοίκησης επιχειρήσεων αγροτικών προϊόντων και τροφίμων, Διδακτορική διατριβή, (2012)

Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., & Φούντζουλα, Χ. Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (απόδοσης) στην κλινική χημεία. Βασικές αρχές και παραδείγματα. [Κεφάλαιο]. (2015).

Καρκαλούσος, Π., Γεωργίου, Ζ., Κρούπης, Χ., Παπαϊωάννου, Α., Πλαγεράς, Π., Σπυρόπουλος, Β., Τσότσου, Γ., & Φούντζουλα, Χ. Εργαστηριακές ασκήσεις κλινικής χημείας [Εργαστηριακός Οδηγός]. Κάλλιπος, Ανοικτές Ακαδημαϊκές Εκδόσεις. (2015)

Καψημάλη Δήμητρα, Τμήμα Χημείας, Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, (2008)

*Κιλικίδης Σ., Α. Καμαριανός, Ξ. Καραμανλής, Γ. Φώτης, Ι. Κρεστενίτης, Κ. Μπαρμποπούλος, Κ. Κατσούλης, Ε. Γαβριηλίδου και Α. Πνευματικάτου. Εκτίμηση του ρυθμού ανάπτυξης των εκτρεφόμενων μυδιών (*Mytilus galoprovincialis*) σε συνάρτηση με την πυκνότητα του πληθυσμού και την ποιότητα του θαλάσσιου περιβάλλοντος. Μελέτη ερευνητικού προγράμματος. Α.Π.Θ., Τμήμα Κτηνιατρικής, Εργ. Οικολογίας και Προστασίας Περιβάλλοντος, Θεσσαλονίκη, (1998), σελίδες 52.*

Ξανθίππος Ν. Καραμανλής, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης Τμήμα Κτηνιατρικής Εργαστήριο Οικολογίας Και Προστασίας Περιβάλλοντος, Υδατινο Περιβαλλον Αλληλεπιδράσεις Μεταξύ Περιβάλλοντος Και Υδατοκαλλιέργειων, Θεσσαλονίκη (2018)

Τσούτση Χαρούλα, Ανάπτυξη και εφαρμογές της αναλυτικής τεχνικής μικροεκχύλισης δια της στερεάς φάσης (srpme) για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε φυτικά προϊόντα διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων Σχολή Θετικών Επιστημών Τμήμα Χημείας, Ιωάννινα (2008)

Χριστίνα Ι. Νάννου, Σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε φυσικά νερά και ιζήματα, Διδακτορική Διατριβή, Ιωάννινα (2018)

Ψωμά Αικατερίνη, Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού φυτοπροστατευτικών ουσιών σε μαστίχα Χίου με γυροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC-MS/MS), Αθήνα (2013)

ΦΕΚ 46/16-03-2009

ΦΕΚ 2505/4-11-2011

ΦΕΚ 209/21-09-2011

ΦΕΚ 182/29-08-2014

ΦΕΚ 248/17-11-2014

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

FAO (Food and Agriculture Organization of the United States)

APHA (American Pharmacists Association), 2005

EPA (Environmental Protection Agency), 2004

ΣΕΘ (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιέργειών)

ΥΠΑΑΤ (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων)

ΕΛΣΤΑΤ (Ελληνική Στατιστική Αρχή)