



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ
ΜΙΚΡΟΥΥΠΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ ΖΩΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ
(HRMS) ΚΑΙ ΡΟΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΥΠΟΠΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΔΕΜΑΤΑΤΗ ΔΑΦΝΗ

Χημικός

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΧΗΜΕΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΚΑΙ ΣΧΕΤΙΚΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ
ΜΙΚΡΟΥΡΥΠΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ ΖΩΩΝ ΜΕ ΤΗ
ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ
ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (HRMS) ΚΑΙ ΡΟΩΝ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΣΑΡΩΣΗΣ ΥΠΟΠΤΩΝ
ΕΝΩΣΕΩΝ**

ΔΕΜΑΤΑΤΗ ΔΑΦΝΗ

Χημικός

Επιβλέπων: Αλμπάνης Τριαντάφυλλος, Ομ. Καθηγητής

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος: Ομ. Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. Βασιλική Μπόττη: Μέλος ΕΔΙΠ, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. Χελά Δήμητρα: Καθηγήτρια, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2026

*Στους γονείς μου , Βασίλη
και Χριστίνα*

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιομηχανικής Χημείας, του Τομέα Βιομηχανικής Χημείας, Χημείας Περιβάλλοντος και Τροφίμων, στο πλαίσιο του προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών του Τμήματος Χημείας, υπό την επίβλεψη του Ομότιμου Καθηγητή Κ. Τριαντάφυλλου Αλμπάνη. Αντικείμενο της εργασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της παρουσίας και της συνύπαρξης μυκοτοξινών και σχετικών οργανικών μικρορύπων-φυτοπροστατευτικών προϊόντων, κτηνιατρικών φαρμακευτικών ουσιών και φυτικών βιοδραστικών ενώσεων- σε εμπορικές ζωοτροφές κατοικίδιων ζώων, μέσω της εφαρμογής υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS) και ροών εργασίας σάρωσης ύποπτων ενώσεων (suspect screening). Η επιλογή του θέματος υπαγορεύθηκε, αφενός από την αυξανόμενη σημασία της ασφάλειας των ζωοτροφών για την υγεία των ζώων συντροφιάς και κατ'επέκταση για τη δημόσια υγεία, και αφετέρου, από το σαφώς διαπιστώμενο κενό στη βιβλιογραφία σχετικά με τη συνύπαρξη πολλαπλών κατηγοριών ρύπων σε τροφές σκύλου και γάτας, σε αντιδιαστολή με τα εκτενή δεδομένα που υφίστανται για τις ζωοτροφές παραγωγικών ζώων. Στο σημείο αυτό, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου σε όλους όσους συνέβαλαν για την ολοκλήρωση της παρούσας προσπάθειας. Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω, οφείλοντας την ολόθυμη ευγνωμοσύνη μου στον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Τριαντάφυλλο Αλμπάνη, για την ανάθεση του θέματος της παρούσας διατριβής, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη διάρκεια την εκπόνησης της, καθώς και για την πολύτιμη επιστημονική καθοδήγηση. Ιδιαίτερες ευχαριστίες απευθύνω στα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, την κ. Βασιλική Μπότη, Μέλος ΕΔΙΠ του Τμήματος Χημείας και την Καθηγήτρια κ. Δήμητρα Χελά, για τον χρόνο που αφιέρωσαν στην κριτική αξιολόγηση της εργασίας και για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις τους. Ειδικότερα, στην κ. Μπότη οφείλω θερμές ευχαριστίες για την αμέριστη στήριξη, τη συστηματική καθοδήγηση κατά την εργαστηριακή πορεία και την ουσιαστική συμβολή της σε όλα τα στάδια της πειραματικής διαδικασίας, της επεξεργασίας και της ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Τέλος, ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα επίσης να εκφράσω και στον υποψήφιο διδάκτορα κ. Δημήτριο Γκουντούρα για την καθοριστική συμβολή στην εξοικείωση μου με τις πειραματικές τεχνικές και την αμέριστη υποστήριξη κατά την εκτέλεση των αναλύσεων. Θερμές ευχαριστίες εκφράζω, επίσης, στο σύνολο του ερευνητικού και τεχνικού προσωπικού του Εργαστηρίου Βιομηχανικής Χημείας, καθώς και στους συναδέλφους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες, για το άριστο κλίμα συνεργασίας. Τέλος, η ολοκλήρωση των σπουδών μου δεν θα ήταν εφικτή χωρίς την αδιάλειπτη στήριξη της οικογένειάς μου. Ιδιαίτερη μνεία επιφυλάσσω για τους γονείς μου, Βασίλη και Χριστίνα, στους οποίους οφείλω ευγνωμοσύνη για την υπομονή, τη διαρκή ενθάρρυνση και την ανεπιφύλακτη πίστη τους στις επιλογές και στις προσπάθειές μου. Σε εκείνους αφιερώνεται η παρούσα εργασία, ως ελάχιστη ένδειξη ευγνωμοσύνης.

Δεματάτη Δάφνη Ιωάννινα, 2026

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ασφάλεια των ζωοτροφών για ζώα συντροφιάς αποτελεί αναδυόμενο ζήτημα δημόσιας υγείας, δεδομένης της αυξανόμενης ενσωμάτωσης των κατοικίδιων στο οικογενειακό περιβάλλον και της καθημερινής κατανάλωσης τυποποιημένων εμπορικών σκευασμάτων, τα οποία ενδέχεται να περιέχουν πολλαπλές κατηγορίες οργανικών ρύπων. Ενώ τα συστηματικά δεδομένα για τις ζωοτροφές παραγωγικών ζώων είναι εκτενή, η πληροφόρηση σχετικά με τη συνύπαρξη πολλαπλών κατηγοριών ρύπων σε τροφές σκύλων και γατών παραμένει κατακερματισμένη. Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής ήταν η διερεύνηση της παρουσίας και της συνύπαρξης μυκοτοξινών και σχετικών οργανικών μικρορύπων-φυτοπροστατευτικών προϊόντων, κτηνιατρικών φαρμακευτικών ουσιών και φυτικών βιοδραστικών ενώσεων-σε εμπορικές τροφές σκύλων και γατών, με έμφαση στις μυκοτοξίνες, μέσω ρών εργασίας σάρωσης ύποπτων ενώσεων (suspect screening). Για τον σκοπό αυτό συλλέχθηκαν και αναλύθηκαν 65 δείγματα εμπορικών ζωοτροφών από την αγορά των Ιωαννίνων τον Μάιο του 2024, εκ των οποίων 32 προορίζονταν για σκύλους (14 ξηρές, 18 υγρές) και 33 για γάτες (7 ξηρές, 26 υγρές). Η προκατεργασία των δειγμάτων βασίστηκε στη μέθοδο QuEChERS και στην υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης συζευγμένη με υβριδικό αναλυτή φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας LTQ-Orbitrap (UHPLC-LTQ/Orbitrap HRMS) σε θετική λειτουργία ιονισμού (ESI+). Η επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό Compound Discoverer 3.3. μέσω εξατομικευμένης ροής εργασίας, με αντιπαραβολή των φασμάτων MS/MS με τις βάσεις δεδομένων mzCloud, NIST, MassBank και PubChem, και η απόδοση των ταυτοποιήσεων έγινε σύμφωνα με τα επίπεδα εμπιστοσύνης Schymanski (επίπεδα 1&2). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε πολυπαραγοντική στατιστική ανάλυση μέσω συντελεστή συσχέτισης Spearman και ανάλυσης κυρίων συνιστωσών PCA. Συνολικά 29 ενώσεις εντοπίστηκαν προσωρινά σε 186 ανιχνεύσεις. Το 76,9% των δειγμάτων ήταν μολυσμένα με μυκοτοξίνες. Οι αφλατοξίνες (B1, B2, G1 και G2), οι τοξίνες T-2 και οι τοξίνες HT-2 ήταν κυρίαρχες, με την αφλατοξίνη B1 να εμφανίζεται στο 33,8% των δειγμάτων και να παρουσιάζει υψηλότερη συχνότητα εμφάνισης στις ξηρές ζωοτροφές από ό,τι στις υγρές. Τα φυτοφάρμακα υπήρχαν στο 72,0% των ξηρών σκευασμάτων, συμπεριλαμβανομένων των aclonifen και pirimiphos-methyl, αλλά υπήρχαν μόνο στο 11% των υγρών σκευασμάτων. Βιοδραστικές ενώσεις φυτικής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένων των φυτοιστρογόνων, εντοπίστηκαν στο 51% των δειγμάτων, επισημαίνοντας τοξικολογικά σχετικούς υποψήφιους που αξίζουν προτεραιότητα για στοχευμένη επιβεβαίωση, ιδιαίτερα στις ζωοτροφές για γάτες. Φαρμακευτικά προϊόντα βρέθηκαν στο 23,8% των ξηρών ζωοτροφών (sparfloxacin και fumagillin). Η πολυπαραγοντική ανάλυση κατέδειξε σαφή διάκριση μεταξύ ξηρών και υγρών σκευασμάτων (PC1 62,8%) και αποκάλυψε

στατιστικά σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ μυκοτοξινών, φυτικών μεταβολιτών και υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών, οι οποίες αποδίδονται στην κοινή γεωργική τους προέλευση. Τα ευρήματα της παρούσας διερευνητικής μελέτης καταδεικνύουν την καταλληλότητα της LC-HRMS σε συνδυασμό με στρατηγικές σάρωσης ύποπτων ενώσεων ,ως εργαλείο έγκαιρης προειδοποίησης και ιεράρχησης ρύπων για την ανάλυση σύνθετων υποστρωμάτων ζωοτροφών, αναδεικνύοντας παράλληλα ένα κρίσιμο κανονιστικό κενό όσον αφορά τη συνύπαρξη πολλαπλών κατηγοριών ρύπων σε τροφές ζώων συντροφιάς. Τα αποτελέσματα συνηγορούν υπέρ της ενσωμάτωσης μη στοχευμένων αναλυτικών προσεγγίσεων στους ελέγχους ρουτίνας και υπογραμμίζουν την ανάγκη για μελλοντικές στοχευμένες ποσοτικές μελέτες και αξιολογήσεις τοξικολογικού κινδύνου

Λέξεις κλειδιά: ζωοτροφές, σάρωση ύποπτων ενώσεων, LC-HRMS, ασφάλεια ζωοτροφών, μόλυνση ζωοτροφών για κατοικίδια, μυκοτοξίνες, φυτοφάρμακα, κτηνιατρικά φάρμακα, φυτικοί μεταβολίτες.

ABSTRACT

The safety of pet food is an emerging public health concern, given the increasing integration of pets into family environments and the daily consumption of commercial pet food products, which may contain multiple categories of organic contaminants. While systematic data on feed for animal production is extensive, information regarding the co-existence of multiple categories of contaminants in dog and cat food remains fragmented. This master's Thesis aimed to investigate the presence and coexistence of mycotoxins and related organic micropollutants—plant protection products, veterinary pharmaceuticals, and plant bioactive compounds—in commercial dog and cat foods, with an emphasis on mycotoxins, using suspect screening workflows. For this purpose, 65 samples of commercial pet food were collected and analyzed from the Ioannina market in May 2024, of which 32 were intended for dogs (14 dry, 18 wet) and 33 for cats (7 dry, 26 wet). Sample preparation was based on the QuEChERS method and ultra-high-performance liquid chromatography coupled with a high-resolution hybrid mass spectrometer LTQ-Orbitrap (UHPLC-LTQ/ Orbitrap HRMS) in positive ionization mode (ESI+). Data processing was performed using Compound Discoverer 3.3 software via a customized workflow, with MS/MS spectra matched against the mzCloud, NIST, MassBank, and PubChem databases, and identifications were assigned according to Schymanski confidence levels (levels 1 & 2). Additionally, multivariate statistical analysis was performed using Spearman's correlation coefficient and principal component analysis (PCA). A total of 29 compounds were provisionally identified in 186 detections. 76.9% of the samples were contaminated with mycotoxins. Aflatoxins (B1, B2, G1, and G2), T-2 toxins, and HT-2 toxins were predominant, with aflatoxin B1 occurring in 33.8% of the samples and appearing in a higher frequency of occurrence in dry feed than in wet feed. Pesticides were present in 72.0% of dry formulations, including aconifen and pirimiphos-methyl, but were present in only 11% of wet formulations. Bioactive compounds of plant origin, including phytoestrogens, were detected in 51% of the samples, highlighting toxicologically relevant candidates that warrant priority for targeted confirmation, particularly in cat food. Pharmaceutical products were found in 23.8% of dry pet foods (sparfloxacin and fumagillin). Multivariate analysis demonstrated a clear distinction between dry and wet formulations (PC1 62.8%) and revealed statistically significant correlations between mycotoxins, plant metabolites, and pesticide residues, which are attributed to their common agricultural origin. The findings of this exploratory study demonstrate the suitability of LC-HRMS in combination with screening strategies for suspect compounds, as an early warning and contaminant prioritization tool for the analysis of complex pet food matrices, while highlighting a critical regulatory gap regarding the coexistence of multiple contaminant categories in pet food. The results support the incorporation of non-

targeted analytical approaches into routine testing and underscore the need for future targeted quantitative studies and toxicological risk assessments

Keywords: animal feed, screening of suspect compounds, LC-HRMS, feed safety, contamination of pet food, mycotoxins, pesticides, veterinary drugs, plant metabolites

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	11
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	12
A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	14
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1. ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ	15
1.1. ΓΕΝΙΚΑ.....	15
1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ.....	17
1.3. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ.....	19
1.4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ , ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΠΗΓΕΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ.....	22
1.5. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ: ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ.....	24
2. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ.....	26
2.1. ΚΥΡΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ.....	26
2.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ.....	34
2.2.1. ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	34
2.2.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	35
2.2.3. ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	36
2.3. ΣΥΝΥΠΑΡΞΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ	37
2.4. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΣΚΥΛΟΥ ΚΑΙ ΓΑΤΑΣ	39
2.5. ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΥΣ ΡΥΠΟΥΣ	41
2.5.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ.....	42
2.5.2. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	44
2.5.3. ΦΥΤΙΚΕΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ.....	45
2.6. ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ.....	48
3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΡΥΠΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ.....	50
3.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΡΥΠΩΝ.....	50
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΚΤΗΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (HRMS) -ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΑΡΩΣΗΣ ΥΠΟΠΤΩΝ ΚΑΙ ΜΗ-ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (NTS).....	51
3.3. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ.....	54
3.4. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ	57
3.4.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΙΟΝΙΣΜΟΥ.....	58

3.4.2.	ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΜΑΖΑΣ- ΥΒΡΙΔΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ORBITRAP	59
3.5.	ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ.....	63
3.5.1.	ΕΚΧΥΛΙΣΗ QUECHERS (QUICK , EASY, CHEAP , EFFECTIVE , RUGGED AND SAFE)	65
B.	ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΟΥ ΜΔΕ.....	69
4.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	70
4.1.	ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	70
4.2.	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	73
4.3.	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	75
4.4.	ΑΝΑΛΥΣΗ LC-LTQ/ORBITRAP MS.....	77
4.5.	ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ	79
4.6.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	88
Δ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	88
5.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	88
5.1.	ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΣΑΡΩΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	88
5.2.	ΣΑΡΩΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	91
5.2.1.	ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ.....	99
5.2.2.	ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ.....	100
5.2.3.	ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ.....	104
5.2.4.	ΦΥΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ.....	104
5.3.	ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ.....	106
5.3.1.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ	106
5.3.2.	ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PCA) ΣΥΣΤΑΣΗΣ-ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ	108
5.4.	ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΥΠΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ	111
5.4.1.	ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ.....	111
5.4.2.	ΥΓΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ.....	113
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	114
7.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	117

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

ΣΧΗΜΑ 1: ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑΣ ΑΓΟΡΑΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ (2024-2032) (32).....	16
ΣΧΗΜΑ 2: ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ	17
ΣΧΗΜΑ 3: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΙΣΟΡΡΟΠΗΜΕΝΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ.....	21
ΣΧΗΜΑ 4: ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ (60).....	24
ΣΧΗΜΑ 5: ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΤΩΝ 11 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ: (Α) ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β1, (Β) ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β2, (C) ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ G1, (D) ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ G2, (E) ΔΕΟΞΥΝΙΒΑΛΕΝΟΛΗ, (F) ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α, (G) ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΗ Β1, (H) ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΗ Β2, (I) ΤΟΞΙΝΗ Τ-2, (J) ΤΟΞΙΝΗ ΗΤ-2, (K) ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ.....	27
ΣΧΗΜΑ 6: ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΜΟΛΥΝΘΕΙ ΑΠΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΑΡΙΘΜΟ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ (ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΕΛΥΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ=89) (68)39	
ΣΧΗΜΑ 7: ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΑΝΑΛΥΘΕΝΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΡΟΦΩΝ ΓΙΑ ΓΑΤΕΣ ΚΑΙ ΣΚΥΛΟΥΣ, ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟ ΝΟΜΙΚΟ ΚΑΘΕΣΤΩΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΈΝΩΣΗ (158).....	44
ΣΧΗΜΑ 8: ΓΕΝΙΚΗ ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΣΤΟΧΩΝ, ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ, ΥΠΟΠΤΩΝ ΚΑΙ ΜΗ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΠΟΥ ΑΠΟΚΤΗΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ(201)	54
ΣΧΗΜΑ 9: ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΛΥΤΩΝ ΜΑΖΑΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	60
ΣΧΗΜΑ 10: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΟΥ ΥΒΡΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ LTQ-ORBITRAP (212).63	
ΣΧΗΜΑ 11: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΣΙΩΝ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QUECHERS (217)67	
ΣΧΗΜΑ 12: ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ.....	78
ΣΧΗΜΑ 13: ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗ ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (CUSTOM WORKFLOW) ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ COMPOUND DISCOVERER 3.3 ΓΙΑ ΤΗ ΣΑΡΩΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (SUSPECT SCREENING) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ.....	81
ΣΧΗΜΑ 14: ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΑΝ ΣΕ ΥΓΡΕΣ ΚΑΙ ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΡΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥΣ DSPE(A :150 MG ΑΝΥΔΡΟΥ ΜGSO4 , 50 MG PSA ΚΑΙ 50 MG C18 , B: 300 MG ΑΝΥΔΡΟΥ ΜGSO4 , 50 MG PSA ΚΑΙ 50 MG C18 ,C: 50 MG Z-SEP+).....	91
ΣΧΗΜΑ 15: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ,ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ,ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ (Α): ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΣΚΥΛΟΥ ΚΑΙ (Β) ΥΓΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΣΚΥΛΟΥ (ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΥΝ ΤΟΝ ΑΙΡΘΜΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΑΝΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΡΥΠΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΟΜΑΔΑ ΤΡΟΦΩΝ).....	97
ΣΧΗΜΑ 16: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ,ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ,ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ (Α): ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΓΑΤΑΣ ΚΑΙ (Β) ΥΓΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΓΑΤΑΣ (ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΥΝ ΤΟΝ ΑΙΡΘΜΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΑΝΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΡΥΠΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΟΜΑΔΑ ΤΡΟΦΩΝ).....	98
ΣΧΗΜΑ 17: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ G1 ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΗPLC-LTEQ/ORBITRAP HRMS. (Α) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ MS ² , (Β) ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ MZCLOUD.....	98

ΣΧΗΜΑ 18:ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΙΡΙΜΙΦΟΣ-ΜΕΘΥΛΙΟ(PIRIMIPHOS-METHYL) ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ UHPLC-LTEQ/ORBITRAP HRMS. (Α)ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΕΞΑΧΘΕΝΤΟΣ ΙΟΝΤΟΣ (EIC) ,(Β)ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ MS ² ,(Γ)ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΩ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ NIST ,(Δ)ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ MZCLOUD	103
ΣΧΗΜΑ 19: ΧΑΡΤΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΚΑΤΑ SPEARMAN (P<0,5) ΠΟΥ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΙ ΤΙΣ ΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ. Η ΕΝΤΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΚΑΤΟΠΤΡΙΖΕΙ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΑΙ ΤΟ ΠΡΟΗΜΟ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ R ΤΟΥ SPEARMAN.	107
ΣΧΗΜΑ 20:ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PCA) ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΦΟΡΤΙΣΕΩΝ (LOADING PLOTS) ΠΟΥ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΥΝ ΤΗ ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ :PC1 (62,8%) ΚΑΙ PC2 (12,3%)· ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (SCORES) ΕΙΝΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΕΝΕΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ (ΞΗΡΗ/ΥΓΡΗ, ΓΑΤΑΣ/ΣΚΥΛΟΥ), ΕΝΩ ΤΑ ΚΟΚΚΙΝΑ ΔΙΑΝΥΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΥΝ ΤΙΣ ΦΟΡΤΙΣΕΙΣ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ.	110

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

- ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΚΥΡΙΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩ
- ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΔΙΑΘΕΣΙΜΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΡΟΦΩΝ ΓΙΑ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΑ
- ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΕ
- ΠΙΝΑΚΑΣ 4: Παραλλαγές της μεθόδου QuEChERS
- ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QUENCHERS ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ
- ΠΙΝΑΚΑΣ 6: Διατροφική σύνθεση (πρωτεΐνες, λίπος και υγρασία) εμπορικών τροφών για σκύλους και γάτες, χωρισμένων σε ξηρές και υγρές συνταγές
- ΠΙΝΑΚΑΣ 7: Πρόγραμμα έκλουσης βαθμίδας UHPLC και παράμετροι φασματομετρίας μαζών (MS) συστήματος LTQ-Orbitrap HRMS, που εφαρμόστηκαν για τον διαχωρισμό οργανικών προσμίξεων σε τροφές ζώων συντροφιάς

ΠΙΝΑΚΑΣ 8:Ανάλυση διερεύνησης στοχευμένων ενώσεων μέσω UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ Compound Discoverer 3.3 TM

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: Πρωτογενή δεδομένα ανίχνευσης επιμολυντών ανά τυπο ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ δείγμα (Δεδομένα προερχόμενα από τα 65 αναλυθέντα δείγματα ζωοτροφών (D= ξηρή τροφή, W = υγρή τροφή).

ΠΙΝΑΚΑΣ 11: Συνοπτική παρουσίαση των ενώσεων που ταυτοποιήθηκαν προσωρινά σε εμπορικές ζωοτροφές γάτας και σκύλου μέσω σαρωσης υπόπτων ενώσεων (suspect screening) με LC-LTQ/Orbitrap HRMS.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ (ΤΙΜΕΣ r) ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΩΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: Φορτίσεις PCA των θρεπτικών παραμέτρων και των κατηγοριών επιμολυντών

A. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ασφάλεια των ζωοτροφών για τα ζώα συντροφιάς αποτελεί ολοένα και σημαντικότερη πρόκληση για την υγεία των ζώων όσο και της δημόσιας υγείας, δεδομένης της αυξανόμενης ενσωμάτωσης των κατοικίδιων στο οικογενειακό περιβάλλον(1). Τα ζώα συντροφιάς , κυρίως οι σκύλοι και οι γάτες καταναλώνουν καθημερινά τυποποιημένες τροφές του εμπορίου. Συνεπώς ακόμη και χαμηλά επίπεδα επιμόλυνσης μπορεί να οδηγήσουν σε χρόνια έκθεση και συσσώρευση τοξικών ουσιών(2,3). Ενώ υπάρχει εκτενής βιβλιογραφία για ζωοτροφές παραγωγικών ζώων , τα δεδομένα για τροφές κατοικίδιων, παραμένουν περιορισμένα, αναδεικνύοντας ένα σημαντικό κενό γνώσης(4,5). Οι οργανικοί ρύποι που έχουν καταγραφεί σε ζωοτροφές περιλαμβάνουν μυκοτοξίνες, φυτοφάρμακα, κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα και φυτικές βιοδραστικές ενώσεις(6). Αυτές οι ενώσεις μπορούν να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα μέσω μολυσμένων καλλιεργειών, ανεπαρκών διαδικασιών αποθήκευσης ή χαμηλής ποιότητας πρώτων υλών(7). Η συνύπαρξη πολλαπλών κατηγοριών ρύπων αυξάνει τον κίνδυνο πολυτοξικότητας μέσω συνεργιστικών δράσεων(8). Οι μυκοτοξίνες , αποτελούν δευτερογενείς μεταβολίτες μυκήτων όπως τα γένη *Aspergillus*, *Penicillium* και *Fusarium*, έχουν λάβει ιδιαίτερη προσοχή λόγω της ανθεκτικότητάς τους και της τοξικότητάς τους(2,5,9). Έχουν συσχετιστεί με ανοσοκαταστολή , καρκινογένεση , ηπατοτοξικότητα και αναπτυξιακές διαταραχές (10,11). Τα τοξικά προϊόντα μετασχηματισμού των μυκοτοξινών , (TPs) , μπορούν να επιβιώσουν σε διάφορα στάδια επεξεργασίας των τροφών , οδηγώντας σε μόλυνση των τελικών προϊόντων (8,12). Παράλληλα , φυτοφάρμακα , υπολείμματα κτηνιατρικών φαρμάκων καθώς και φυτοϊστρογόνες ενώσεις με ενδοκρινική δράση μπορούν να συσσωρευτούν σε ζωοτροφές αυξάνοντας περαιτέρω τον τοξικολογικό κίνδυνο(13–16). Διεθνείς οργανισμοί , όπως η Ευρωπαϊκή επιτροπή (EE) , ο FDA και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχουν θεσπίσει όρια για τις βασικές μυκοτοξίνες σε τρόφιμα και ζωοτροφές. Η EFSA και το Σύστημα Ταχείας Ειδοποίησης για Τρόφιμα και Ζωοτροφές (RASFF)

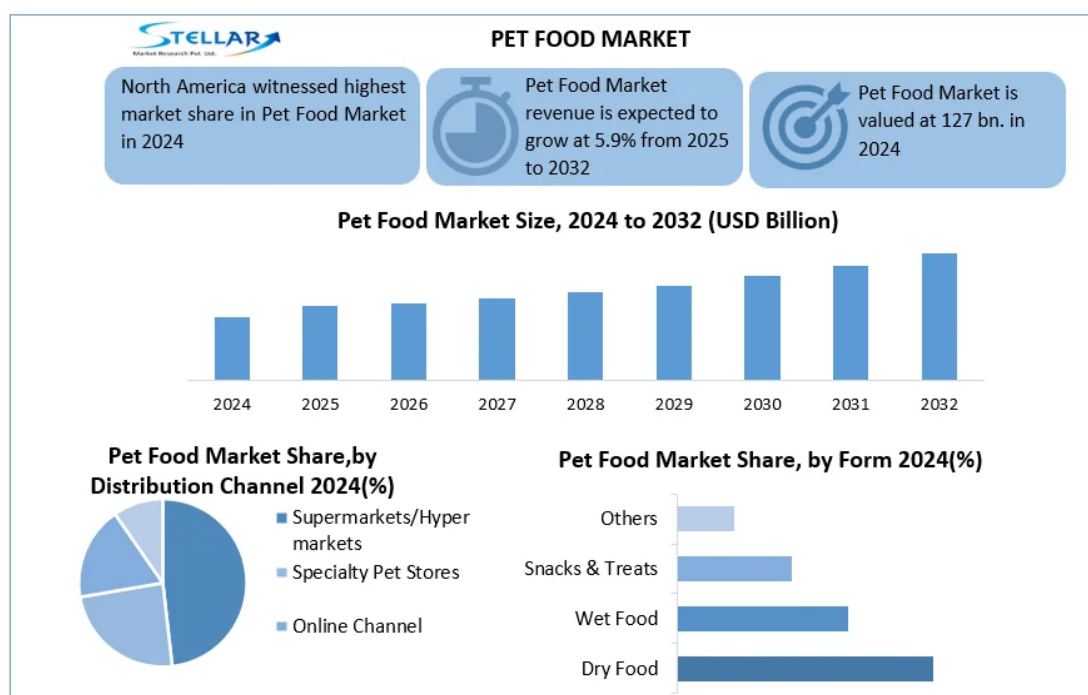
παρακολουθούν συστηματικά τη μόλυνση και αξιολογούν τους κινδύνους για τους καταναλωτές(2,5,17). Ωστόσο ,οι κανονισμοί εστιάζουν κυρίως σε παραγωγικά ζώα και η διαθέσιμη βιβλιογραφία για ζωοτροφές κατοικίδιων , ειδικά για παραδείγματα πολλαπλών μολύνσεων, είναι σαφώς περιορισμένη (4,18–20). Για την κάλυψη αυτού του κενού , αναδεικνύεται η σημασία προηγμένων τεχνικών , όπως η φασματομετρία μαζών υψηλής ανάλυσης (HRMS) , σε συνδυασμό με suspect screen workflows(21). Η HRMS , ιδίως οι αναλυτές Orbitrap, προσφέρουν υψηλή ακρίβεια μάζας και δυνατότητες διαλεύκανσης της δομής μέσω MS/MS(22–24). Παράλληλα ,οι τεχνικές προετοιμασίας δειγμάτων όπως η QuEChERS ,(Quick, Easy ,Cheap, Effective ,Rugged, Safe), έχουν βελτιώσει σημαντικά την ανάλυση πολλαπλών υπολειμμάτων , μειώνοντας τον χρόνο και τον όγκο των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται(25,26).

1. ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Οι ζωοτροφές ζώων συντροφιάς αποτελούν έναν θεμελιώδη παράγοντα για την υγεία και την ευζωία των κατοικίδιων αλλά και της δημόσιας υγείας καθώς η ποιότητα και η ασφάλεια τους επηρεάζονται από πολυάριθμους παράγοντες όπως τα συστατικά, η παραγωγική διαδικασία και οι πηγές επιμολυντών (1). Ως ζωοτροφή ορίζεται κάθε ύλη φυτικής, ζωικής και ανόργανης προέλευσης, η οποία επιτρέπεται να χορηγηθεί προς κατανάλωση στα ζώα ,είτε με τα πρωταρχικά φυσικοχημικά της χαρακτηριστικά ,είτε κατόπιν βιομηχανικής επεξεργασίας , με σκοπό να συμβάλει στη θρέψη των ζώων , χωρίς ωστόσο να προκαλεί βλάβη στην υγεία τους (27)Παράλληλα ,οι ζωοτροφές κατοικίδιων θεωρούνται πλέον, ένα από τα πιο σημαντικά αγαθά στην κατηγορία των κινούμενων , καταναλωτικών αγαθών(28). Τόσο ζωοτροφές που προορίζονται για σκύλους όσο και για γάτες αντιπροσωπεύουν το μεγαλύτερο ποσοστό στην αγορά τροφών για ζώα συντροφιάς με παγκόσμιες πωλήσεις ετησίως γύρω στα 5 δισεκατομμύρια λίρες. Στο ΣΧΗΜΑ 1 παρουσιάζονται τα βασικά στοιχεία για το μέγεθος και την αγορά

ζωοτροφών κατοικίδιων σε παγκόσμιο επίπεδο για την περίοδο 2024-2032 , τη γεωγραφική κυριαρχία της Β. Αμερικής καθώς και την κατανομή της αγοράς ανά κανάλι διανομής ανάλογα με τη μορφή προϊόντος. Οι πλήρεις και ισορροπημένες τροφές των κατοικίδιων έχουν σχεδιαστεί με σκοπό να αποτελούν την βασική αν όχι την αποκλειστική πηγή θρεπτικών συστατικών για τα ζώα συντροφιάς, σε όλα τα στάδια της ζωής τους και διατίθενται στη λιανική αγορά πληρώντας ορισμένα κριτήρια ποιότητας όπως η γεύση, η υφή, η οσμή και η εμφάνιση(29). Ωστόσο λόγω της συνεχούς ανάπτυξης της βιομηχανίας αυτής , υποδεικνύεται η ανάγκη δημιουργίας καινοτόμων , ταχέων και αξιόπιστων μεθόδων ελέγχου της ποιότητας και της ασφάλειας των ζωοτροφών για ζώα συντροφιάς(29). Οι ζωοτροφές είτε πρόκειται για ζώα παραγωγής είτε για ζώα συντροφιάς ενσωματώνουν μια ποικιλία πρώτων υλών όπως δημητριακά ,φρούτα και πρωτεϊνικά συστατικά φυτικής ή ζωικής προέλευσης(30,31). Η πολυπλοκότητα αυτή στα συστατικά των ζωοτροφών ωστόσο αυξάνει την πιθανότητα επιμόλυνσης αυτών , από διάφορους τύπους επιβλαβών επιμολυντών όπως μυκοτοξίνες, φυτοφαρμάκων, αντιβιοτικών, φυτικών μεταβολιτών (30,32).

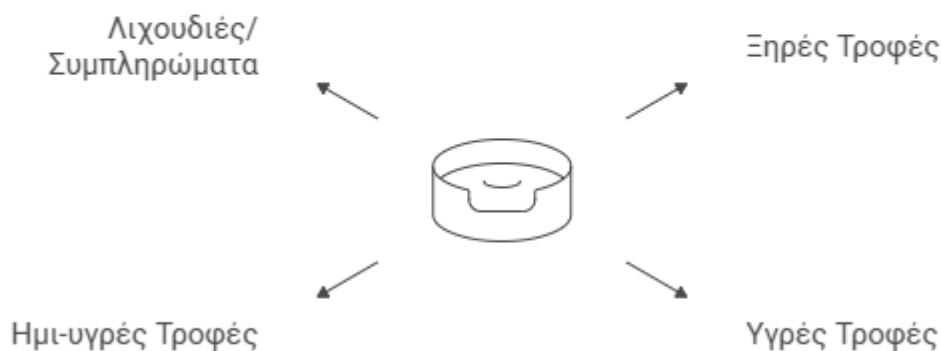


ΣΧΗΜΑ 1: ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΑΙ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΠΑΓΚΟΣΜΙΑΣ ΑΓΟΡΑΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ (2024-2032) (32)

1.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ

Η κατηγοριοποίηση των ζωοτροφών ζώων συντροφιάς αποτελεί πλέον έναν πολύπλοκο και δυναμικό τομέα, ανάλογα με τις μεταβαλλόμενες προτιμήσεις των καταναλωτών, την αυξανόμενη ανθρωπιστική προσέγγιση όσον αφορά τα κατοικίδια και την εξέλιξη της επιστήμης αναφορικά με την ασφάλεια και την ποιότητα των ζωοτροφών(33,34). Οι ζωοτροφές ζώων συντροφιάς κατηγοριοποιούνται κυρίως, την περιεκτικότητά τους σε υγρασία και τη μέθοδο επεξεργασίας τους σε είναι οι ξηρές τροφές(κροκέτες), οι υγρές τροφές (κονσερβοποιημένες), οι ημι-υγρές τροφές και οι λιχουδιές/συμπληρώματα (35–38), όπως φαίνεται στο ΣΧΗΜΑ 2.

Τύποι Τροφών για Κατοικίδια



ΣΧΗΜΑ 2: ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟ ΠΟΣΟΣΤΟ ΥΓΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗ ΜΕΘΟΔΟ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑΣ

- **ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ**

Οι ξηρές ζωοτροφές αποτελούν την πιο διαδεδομένη κατηγορία ζωοτροφών. Συνήθως περιέχουν ποσοστά υγρασίας μέχρι 20% ,εκτός της Ευρωπαϊκής ένωσης, που τα ποσοστά υγρασίας δεν ξεπερνούν το 14%(39). Συμβάλλουν

επιπλέον στην καλύτερη στοματική υγιεινή των κατοικίδιων λόγω της τραγανής τους υφής ενώ είναι πιο βολικά για την σίτιση και την αποθήκευση. Ωστόσο θεωρούνται λιγότερο γευστικές από τις υγρές τροφές (29,36). Οι ξηρές τροφές παράγονται με εξώθηση (θερμομηχανική μαγειρική, διαστολή, ξήρανση, επικάλυψη) , η οποία συμβάλει στη διατήρηση του τρόφιμου για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Παρόλα αυτά μπορεί να οδηγήσει σε μεταβολών πολλών θρεπτικών συστατικών όπως πρωτεΐνες, λιπίδια, βιταμίνες , λόγω της θερμικής επεξεργασίας(35,37). Τα συστατικά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ξηρών τροφών για ζώα συντροφιάς είναι κυρίως συστατικά ζωικής και φυτικής προέλευσης. Ωστόσο όσον αφορά την αποθήκευση αυτής , δεν συσκευάζεται σε αεροστεγείς περιέκτες οπότε είναι πιθανό η τροφή να εκτεθεί τόσο σε υγρασία όσο και σε οξυγόνο. Για τον λόγο αυτό προστίθενται συνήθως φυσικά ή τεχνητά συντηρητικά και αντιοξειδωτικά , με βάση πάντα τους κανονισμούς της ΕΕ, με σκοπό τη διατήρηση της ποιότητάς τους και την αποφυγή ανάπτυξης μούχλας ή βακτηρίων(40).

- **ΥΓΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ**

Οι υγρές κονσερβοποιημένες τροφές περιέχουν ποσοστά υγρασίας 70-80%. Στις υγρές ζωοτροφές χρησιμοποιούνται συστατικά ζωικής και φυτικής προέλευσης ενώ συσκευάζονται σε αεροστεγής κονσέρβες, δίσκους ή σακουλάκια. Μετά την σφράγιση των συσκευασιών τα προϊόντα υποβάλλονται σε αποστείρωση .Λόγω της αποστείρωσης έχουν μεγαλύτερη διάρκεια ζωής και δεν προστίθεται σε αυτά πρόσθετα συντηρητικά(40). Έχουν μικρότερη διάρκεια ζωής μετά το άνοιγμα , αλλά είναι πολύ γευστικές και έχουν καλύτερη βιοδιαθεσιμότητα θρεπτικών συστατικών(35,40,41).

- **ΗΜΙ-ΥΓΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ**

Οι ημι-υγρές τροφές περιέχουν ποσοστά υγρασίας μεταξύ 20-70%(συνήθως 25-35%)(42). Συνδυάζουν χαρακτηριστικά τόσο των υγρών όσο και των ξηρών τροφών. Έχουν πιο μαλακή υφή από την ξηρά τροφή αλλά είναι πιο σταθερή στην υφή από την υγρή τροφή. Παράγονται χρησιμοποιώντας υγραντικά, ενώσεις που αναστέλλουν την ανάπτυξη βακτηρίων-μούχλας και διατηρούν την υγρασία. Ταυτόχρονα χρησιμοποιούνται και μέσα όξυνσης που ρυθμίζουν το pH . Λόγω του μην ευνοϊκού περιβάλλοντος δεν αναπτύσσονται βακτήρια και σταθεροποιείται η τροφή. Η διαδικασία παραγωγής αυτών είναι παρόμοια με αυτή των ξηρών τροφών, απλά διατηρείται υψηλότερο ποσοστό υγρασίας(42). Ωστόσο επειδή ορισμένες συνταγές περιέχουν υψηλότερες ποσότητες ζάχαρης και αλατιού και επιπλέον πρόσθετα συντηρητικά για την διατήρηση της υφής και της γεύσης ,προτείνεται να καταναλώνονται πιο περιστασιακά(29,38).

- **ΛΙΧΟΥΔΙΕΣ-ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΑ**

Τόσο οι λιχουδιές όσο και τα συμπληρώματα αποτελούν συμπληρωματική τροφή είτε για επιβράβευση του κατοικίδιου είτε για στοχευμένες λειτουργίες. Για το λόγο αυτό δεν πρέπει να αντικαθιστούν την πλήρη μερίδα τροφής για ένα κατοικίδιο(43). Περιλαμβάνουν συνήθως σνακ με υψηλή ενεργειακή πυκνότητα και λειτουργικά συμπληρώματα όπως γλυκοζαμίνες και προβιοτικά(44).

1.3. ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

Για να εξασφαλιστεί μια ισορροπημένη διατροφή για τα κατοικίδια ζώα , πρέπει η τροφή τους να περιέχει πρωτεΐνες, λίπη , υδατάνθρακες, βιταμίνες, μέταλλα και νερό. Οι πρωτεΐνες είναι απαραίτητες για την διατήρηση και την ανάπτυξη των μυών , τα λίπη παρέχουν ενέργεια και βοηθούν στην καλύτερη υγεία του δέρματος ενώ οι βιταμίνες και τα μέταλλα βοηθούν στις μεταβολικές διεργασίες(45). Η Ευρωπαϊκή ομοσπονδία Βιομηχανιών Τροφών για Κατοικίδια ζώα [FEDIAF],

δημοσίευσε την έκδοση για το 2025 των διατροφικών οδηγιών για Πλήρεις και Συμπληρωματικές Τροφές για Γάτες και Σκύλους , αναγνωρισμένες από ρυθμιστικές αρχές ,κτηνιάτρους και ειδικούς διατροφολόγους. Οι οδηγίες αυτές αποτελούν οριστικό σημείο αναφοράς για ασφαλείς και διατροφικά ισορροπημένες τροφές για κατοικίδια σε όλη την Ευρώπη(46). Οι σύγχρονες συνταγές ζωοτροφών για σκύλους και γάτες βασίζονται σε πολυπαραγοντικά μίγματα τόσο οργανικών όσο και ανόργανων συστατικών όπως πρωτεΐνες φυτικής ή ζωικής προέλευσης, λίπη , φυτικής προέλευσης συστατικά όπως δημητριακά , παραπροϊόντα άλεσης ,φυτικές πρωτεΐνες ή έλαια. Επιπλέον το μίγμα αυτό μπορεί να περιέχει φρούτα/λαχανικά, ζωμούς ,νερό και πρόσθετα που επιτρέπονται από την νομοθεσία(βιταμίνες ,μέταλλα, συντηρητικά, αμινοξέα, χρωστικές και αρωματικές ύλες)(47–49). Στο ΣΧΗΜΑ 3 , φαίνονται τα συστατικά για μια ισορροπημένη διατροφή των κατοικίδιων. Πρόσφατα δεδομένα της Ένωσης Αμερικανών Αξιωματούχων Ελέγχου Ζωοτροφών [AAFCO] , κατατάσσουν τα συστατικά των ζωοτροφών και τα ορίσουν βάσει προτύπων , ενώ με φθίνουσα σειρά βάρους κατατάσσονται αυτά στην ετικέτα του προϊόντος(50). Ουσιαστικά τα συστατικά που περιέχονται στις ζωοτροφές που περιέχονται σε μεγαλύτερη αναλογία θα βρίσκονται πρώτα στη λίστα , ενώ πρόσθετα συστατικά όπως βιταμίνες , μέταλλα κτλ. , θα καταγράφονται στο τέλος στην ετικέτα ενός προϊόντος ζωοτροφής(48,50). Η FEDIAF , επιπλέον ορίζει παρόμοια πρότυπα και στην Ευρώπη , ενώ επιπλέον καθορίζονται και οι ελάχιστες και μέγιστες απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά για γάτες και σκύλους με σκοπό την ισορροπημένη διατροφή των κατοικίδιων αυτών(46). Έκθεση του 2025 , «Pet Food Production and Ingredient Analysis 2025» , κατέγραψε δεδομένα από την αμερικανική αγορά , στην οποία αναφέρεται ότι πάνω από 9,2 εκατομμύρια τόνοι πρώτων υλών καταναλώνονται ετησίως για την παραγωγή ζωοτροφών. Ενώ το 44,5 % προέρχεται από προϊόντα φυτικής προέλευσης. Το 26,5% από προϊόντα κρέατος και πουλερικών και το 16,9% από ζωικά λίπη και ιχθυάλευρα. Ωστόσο το 44% αυτών των συστατικών προέρχεται από «ανακυκλωμένες» πρώτες ύλες , οπότε μπορεί να προκύψουν ζητήματα ποιοτικού ελέγχου ή επιμόλυνσης(47).

Συστατικά για Ισορροπημένη Διατροφή Κατοικίδιων



ΣΧΗΜΑ 3: ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΙΣΟΡΡΟΠΗΜΕΝΗΣ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ

Τα κυριότερα συστατικά των ζωοτροφών κατατάσσονται σε τέσσερις βασικές κατηγορίες :

- **Πρωτεϊνούχα συστατικά:** ζωικής κυρίως προέλευσης (κρέας, ψάρι, υποπροϊόντα σφαγής , αποξηραμένα γεύματα). Παρέχουν βιοδιαθέσιμα απαραίτητα αμινοξέα όπως η λυσίνη , η τρυπτοφάνη και η μεθειονίνη , βιταμινών και ιχνοστοιχείων(47,50). Ωστόσο δυνητικά , μπορούν να αποτελέσουν πηγή οργανικών ρύπων(35,38).
- **Υδατάνθρακες:** συστατικά όπως ρύζι , καλαμπόκι ,σόγια, σιτάρι, αρακάς , πατάτα. Τα συστατικά παρέχουν ενέργεια στο κατοικίδιο. Παράλληλα προσφέρουν ίνες και λειτουργούν σαν δομικά υλικά στην συνεκτικότητα της κροκέτας(43,48,51).
- **Λιπαρά συστατικά:** περιέχουν ζωικά λίπη και φυτικά έλαια. Βελτιώνουν την γευστικότητα της ζωοτροφής , προσφέρουν ενέργεια και βοηθούν στην μεταφορά λιποδιαλυτών βιταμινών(38).
- **Πρόσθετα:** βιταμίνες, αμινοξέα, ανόργανα συστατικά, αντιοξειδωτικά και συντηρητικά. Συμβάλλουν στην ισορροπία και σταθερότητα του τελικού προϊόντος(49,50).

1.4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ , ΚΙΝΔΥΝΟΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΠΗΓΕΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ

Η παραγωγή ζωοτροφών για κατοικίδια ζώα , είναι μια πολύπλοκη βιομηχανική διαδικασία η οποία πρώτα περιλαμβάνει την επιλογή πρώτων υλών. Επιπλέον περιέχει πολλαπλά στάδια επεξεργασίας και αποθήκευσης τόσο των πρώτων υλών αλλά και του τελικού προϊόντος. Ωστόσο καθένα από τα στάδια παραγωγής , εμπεριέχει κινδύνους επιμόλυνσης των υλικών των ζωοτροφών(52). Λόγω των διακυμάνσεων στα πρότυπα μόλυνσης λόγω της κλιματικής αλλαγής και των παγκοσμιοποιήσεων των αλυσίδων εφοδιασμού καθώς και της συνεχούς εμφάνισης νέων οργανικών ρύπων , η σύγχρονη παραγωγή ζωοτροφών αντιμετωπίζει πολλαπλές προκλήσεις που αφορούν άμεσα την ασφάλεια των ζωοτροφών και κατ' επέκταση την υγεία των ζώων όσο και τη δημόσια υγεία(53). Στο ΣΧΗΜΑ 4 , παρουσιάζονται τα βασικά στοιχεία για την ασφάλεια των ζωοτροφών. Πλέον οι ζωοτροφές για κατοικίδια , περιλαμβάνουν πολλά διαφορετικά συστατικά φυτικά ή ζωικά. Με αποτέλεσμα να αυξάνεται η πιθανότητα επιμόλυνσης του τελικού προϊόντος με διαφορετικής κατηγορίας επιμολυντές (54). Όσον αφορά την ροή εργασίας παραγωγής των ζωοτροφών και τα κρίσιμα σημεία ελέγχου της παραγωγής , ακολουθείται μια τυποποιημένη πορεία εργασίας η οποία περιέχει διαδοχικές λειτουργίες. Αρχικά προμήθεια και αξιολόγηση της ποιότητας των πρώτων υλών (δημητριακά , όσπρια , κρέατα , άλευρα, φυτικά υποπροϊόντα). Στη συνέχεια μηχανική επεξεργασία (άλωση, ανάμιξη, ομογενοποίηση) , θερμική επεξεργασία (εξώθηση ,σφαιροποίηση, αποστείρωση), ενσωμάτωση λειτουργικών προσθέτων (συντηρητικά , συμπληρώματα διατροφής ,ενισχυτικά γεύσης) και ελεγχόμενη αποθήκευση(52,53). Σε κάθε στάδιο μπορεί να εισέλθουν ή να συγκεντρωθούν επιμολυντές μέσω βιολογικών, χημικών ή περιβαλλοντικών οδών(55). Η επιμόλυνση συνήθως προκύπτει κατά την μεταφορά από το χωράφι ή την αποθήκευση των πρώτων υλών. Λόγω της παραγωγής μυκοτοξινών από μύκητες που μπορεί να αναπτυχθούν σε δημητριακά ή όσπρια. Παράλληλα η επεξεργασία και η εξώθηση μπορούν να μεταβάλλουν τα χημικά προφίλ των ουσιών αυτών με

δημιουργία προϊόντων αποικοδόμησης ή μεταβολιτών μετασχηματισμού(25). Υπολείμματα φυτοφαρμάκων ή κτηνιατρικών φαρμακευτικών προϊόντων μπορούν να εισαχθούν κατά την διάρκεια της ανάμειξης/σύνθεσης ή προσθήκης συστατικών ή πρόσθετων κατώτερων ποιοτικά(56). Τέλος με την μη σωστή αποθήκευση των τελικών προϊόντων , ιδιαίτερα σε συνθήκες υψηλής υγρασίας , ευνοείται ο πολλαπλασιασμός των μυκήτων και η συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών όπως οι αφλατοξίνες ή η ωχρατοξίνη A (55). Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν ότι ακόμη και προηγμένες αλυσίδες ζωοτροφών παρουσιάζουν μετρήσιμη μόλυνση από πολλαπλές χημικές κατηγορίες. Τα σύνθετα προφίλ ρύπων σε σύνθετες τροφές περιλαμβάνουν μυκοτοξίνες, μεταβολίτες φυτών και υπολείμματα φυτοφαρμάκων(12,57). Για παράδειγμα στο καλαμπόκι μπορεί να βρεθεί *Fusarium spp.* ,από τον οποίο μύκητα μπορεί να παραχθεί Δεσοξυνιβαλενόλη (DON) και Φουμονισίνες (FUMs) , ενώ επιπλέον αναφέρεται ότι σε δείγματα ζυμωμένων προϊόντων και καλαμποκιού ανιχνεύτηκαν έως 68 διαφορετικές μυκοτοξίνες σε ένα μόνο δείγμα και ήταν συχνή η συν-εμφάνιση τριών ή περισσότερων ρυθμιζόμενων μυκοτοξινών έως στο 90% των δειγμάτων (12). Παράλληλα κατά την διαδικασία της επεξεργασίας οι συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας ευνοούν τον πολλαπλασιασμό του *Aspergillus spp.* και *Penicillium spp.* Το αποτέλεσμα είναι η ατμοσφαιρική επιμόλυνση και ο σχηματισμός αφλατοξινών και ωχρατοξίνης A(57). Οι αναδυόμενες μυκοτοξίνες , μπορεί να σχηματιστούν είτε στο χωράφι ή κατά την αποθήκευση. Ενώ είναι πιθανό να διαφύγουν των απλών αναλυτικών τεχνικών ,αυξάνοντας έτσι την συνολική τοξικότητα του τελικού προϊόντος (58). Ταυτόχρονα η διασταυρούμενη επιμόλυνση με υπολείμματα φυτοφαρμάκων είναι συχνή. Ο λόγος που συμβαίνει αυτό είναι διότι τα δημητριακά εκτίθενται σε μυκητοκτόνα και εντομοκτόνα. Ορισμένες μελέτες στην Ιταλία έδειξαν ότι η χρήση αυτών υπερέβαινε τα MRLs στο 15% των δειγμάτων των ζωοτροφών για το chlorpyrifos και cypermethrin , ενώ λόγω της μη σωστής διαχείρισης απομονωμένα του κάθε φυτοφαρμάκου μπορεί να υπάρξει συσσωρευμένη επιμόλυνση με περισσότερα από ένα φυτοφάρμακα σε ένα δείγμα (37,59).



ΣΧΗΜΑ 4: ΚΥΡΙΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΑΣΦΑΛΕΙΑΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ (60)

1.5. ΠΑΡΑΚΟΛΟΥΘΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ: ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΑΣΕΙΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Διάφοροι διεθνείς οργανισμοί μεταξύ των οποίων η Ευρωπαϊκή επιτροπή (ΕΕ) , η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων Πολιτειών(FDA) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO) έχουν θεσπίσει ρυθμιστικά όρια που αφορούν τα επιτρεπόμενα επίπεδα μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές, λόγω της σημαντικής επίδρασης αυτών(60–62). Παράλληλα τακτικά παρακολουθείται η μόλυνση των τροφίμων και ζωοτροφών και αξιολογούνται πιθανοί κίνδυνοι ,οι οποίοι μπορούν να απειλήσουν την υγεία των καταναλωτών σε Ευρωπαϊκό επίπεδο , από την Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) και το Σύστημα Ταχείας Ειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις ζωοτροφές (RASFF)(6,31,63–66). Παρόλη την ύπαρξη ρυθμιστικών πλαισίων επί δεκαετίες , η παρουσία μυκοτοξινών στις καλλιέργειες και σε όλη την αλυσίδα παραγωγής τροφίμων αποτελεί μια «επίμονη» πρόκληση για την ασφάλεια των

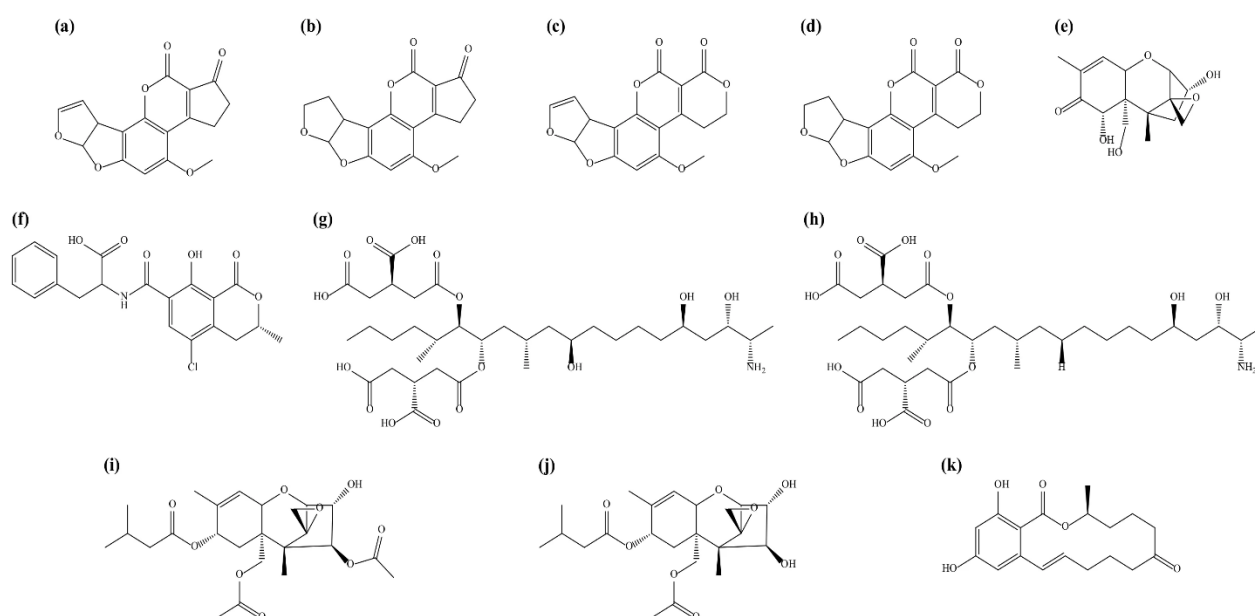
τροφίμων , ειδικότερα λόγω της συχνής συνύπαρξης πολλαπλών μυκοτοξινών σε μεμονωμένα προϊόντα(64). Ωστόσο αν και υπάρχει συστηματική παρακολούθηση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα , οι πληροφορίες σχετικά με την παρουσία αυτών στις ζωοτροφές είναι περιορισμένες(67,68). Ενώ η πλειονότητα των ερευνών που έχουν πραγματοποιηθεί στις ζωοτροφές, αποτελούν ζωοτροφές κτηνοτροφικής χρήσης , λίγες έχουν αναφερθεί στην παρουσία των μυκοτοξινών στις ζωοτροφές κατοικίδιων (67,69–75). Επιπλέον ακόμη λιγότερη αποτελεί η έρευνα για την ταυτόχρονη παρουσία φυτοφαρμάκων , φαρμακευτικών προϊόντων και δευτερογενών μεταβολιτών φυτών που υπάρχουν στις δίαιτες των κατοικίδιων παρά την πιθανή τοξική τους επίδραση. Οπότε η εφαρμογή σάρωσης για ύποπτες ενώσεις είναι υψίστης σημασίας , διότι συμβάλλει στην ενίσχυση της ασφάλειας των ζωοτροφών και παρέχει πληροφορίες σχετικά με τα μοτίβα επιμόλυνσης και υποστηρίζοντας την ανάπτυξη ρυθμιστικών πλαισίων που να αφορά την ταυτόχρονη ύπαρξη αυτών στις ζωοτροφές και κυρίως αυτές που αφορούν τα κατοικίδια ζώα. Όσον αφορά τους οργανικούς ρύπους , μεταξύ αυτών οι μυκοτοξίνες και τα προϊόντα μετασχηματισμού τους (TPs) οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας έχουν κυρίαρχο ρόλο στην ανάπτυξη της ταυτόχρονης ανάλυσης πολλαπλών ρύπων-επιμολυντών(67). Η φασματομετρία υψηλής ανάλυσης (HRMS), σε συνδυασμό με ροές εργασίας σάρωσης ύποπτων ενώσεων , επιτρέπει την ανίχνευση τόσο στοχευμένων όσο και μη στοχευμένων ρύπων ακόμη και αν δεν υπάρχουν συγκεκριμένα πρότυπα ανάλυσης. Προσφέροντας έτσι ευρύτερη χημική κάλυψη(76,77). Οι αναλυτές HRMS , έχουν εξαιρετική ειδικότητα και υψηλή ευκρίνεια , λόγω της υψηλής ακρίβειας μάζας και στην ικανότητα ταυτοποίησης της δομής των ενώσεων που παρέχει η απόκτηση MS/MS(30,67,78–81). Πέρα από την οργανολογία και τις εξελίξεις σε αυτό το κομμάτι , ο ρόλος των μεθόδων εκχύλισης παραμένει κρίσιμος. Διότι η αποτελεσματική απομόνωση των αναλυτών αποτελεί βασικό στάδιο της αναλυτικής διαδικασίας. Οι γενικής χρήσης τεχνικές εκχύλισης όπως η QuEChERS (Quick ,Easy ,Cheap, Effective, Rugged, and Safe) έχουν κεντρίσει το ενδιαφέρον λόγω της αποδοτικότητας , της απλότητας και των ελάχιστων απαιτήσεων προετοιμασίας δείγματος(18,30,80,82–84).

2. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΚΑΙ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ

2.1. ΚΥΡΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ

Οι μυκοτοξίνες αποτελούν μια χημικά ποικιλόμορφη ομάδα δευτερογενών μεταβολιτών χαμηλού μοριακού βάρους. Παράγονται από μύκητες κυρίως από εκείνους που ανήκουν στα γένη *Aspergillus*, *Fusarium*, *Alternaria* και *Penicillium* και *Claviceps*, αποτελώντας συχνό παράγοντα επιμόλυνσης των τροφών όσο και των ζωοτροφών αφού μπορούν να βρεθούν στις πρώτες ύλες παραγωγής αυτών, όπως τα δημητριακά(67,70,85,86). Οι πιο σημαντικές ομάδες μυκοτοξινών που βρίσκονται στα τρόφιμα είναι αρχικά οι αφλατοξίνες που παράγονται από είδη *Aspergillus*, η ωχρατοξίνη A(OTA) που παράγεται τόσο από *Aspergillus* όσο και από *Penicillium*, τα τριχοθηκένια (Τύπος A: τοξίνη HT-2 και T-2 & Τύπος B:δεοξυνιβαλενόλη), η ζεαραλενόνη, οι φουμονισίνες B1 & B2 και οι αναδύομενες μυκοτοξίνες που παράγονται κυρίως από τα είδη *Fusarium*, μυκοτοξίνες που παράγονται από είδη *Claviceps* και αλουτένιο, αλτερναριόλη, μεθυλ-αιθερική αλτερναριόλη, αλτεροξίνη και τενουαζονικό οξύ που παράγονται από είδη *Alternaria*(31,87,88). Λόγω της δομικής ποικιλομορφίας τους, οι μυκοτοξίνες παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα επιβλαβών επιπτώσεων εκ των οποίων είναι καρκινογόνες, ηπατοτοξικές, νεφροτοξικές, τερατογόνες, αιματοτοξικές, ανοσοτοξικές, ορμονικές ή αναπαραγωγικές επιδράσεις αυτών(67,89,90). Οι κύριες μυκοτοξίνες που βρίσκεται να ανιχνεύονται σε ζωοτροφές κατοικίδιων κυρίως περιέχουν τις αφλατοξίνες (AFs), την ωχρατοξίνη A (OTA), την ζεαραλενόνη (ZEA), τις μυκοτοξίνες του γένους *Fusarium* (FUMs) και τα τριχοθηκένια. Οι δομές των μυκοτοξινών αυτών παρουσιάζονται στο ΣΧΗΜΑ 5. Διαφέρουν μεταξύ τους ωστόσο, ως προς τις τοξικές επιδράσεις αυτών στα ζώα συντροφιάς και μπορούν να εισέλθουν στις ζωοτροφές μέσω των σταδίων παραγωγής αυτών, αν οι πρώτες ύλες για τις ζωοτροφές έχουν επιμολυνθεί(4,70,91). Υπάρχουν πάνω από 400 γνωστά είδη μυκοτοξινών που μπορούν να προκαλέσουν διάφορες ασθένειες στα ζώα (μυκοτοξίκωση) (70).Τα

κλινικά συμπτώματα διαφέρουν όπως αναφέρθηκε ανάλογα με τον τύπο της μυκοτοξίνης όπως επίσης την συγκέντρωση και την διάρκεια της έκθεσης των κατοικίδιων σε αυτές , τον τύπο του κατοικίδιου , το γένος και την ηλικία αυτών(70). Παρακάτω αναλύονται οι κύριες μυκοτοξίνες που βρίσκονται σε ζωοτροφές κατοικίδιων , ενώ στον ΠΙΝΑΚΑ 1 συνοψίζονται οι κύριες κατηγορίες μυκοτοξινών στις ζωοτροφές κατοικίδιων , τα είδος από το οποίο προέρχονται και τη συμπτωματολογία που προκαλούν στα ζώα.



ΣΧΗΜΑ 5: ΧΗΜΙΚΕΣ ΔΟΜΕΣ ΤΩΝ 11 ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ: (Α) ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β1, (Β) ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ Β2, (C) ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ G1, (D) ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗ G2, (Ε) ΔΕΟΞΥΝΙΒΑΛΕΝΟΛΗ, (F) ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α, (G) ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΗ Β1, (H) ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΗ Β2, (Ι) ΤΟΞΙΝΗ Τ-2, (J) ΤΟΞΙΝΗ ΗΤ-2, (Κ) ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ.

ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΕΣ

Οι αφλατοξίνες (AFs) αποτελούν μια ομάδα μυκοτοξινών που παράγονται από τα είδη *Aspergillus* κυριότερα από το γένος *A. Parasiticus* και *A. flavus* και σε κάποιες περιπτώσεις από το γένος *A. nomius* και ανήκουν στην ομάδα των διφουρανοκουμαρινών (63,92,93). Οι αφλατοξίνες είναι από τα πιο γνωστά είδη μυκοτοξινών λόγω των σοβαρών επιπτώσεων που έχουν στην υγεία τόσο των ανθρώπων όσο και των ζώων. Μπορούν να παραχθούν τόσο κατά την καλλιέργεια , όσο και κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης σε θερμότερα κλίματα(94). Οι πιο

μελετημένες μυκοτοξίνες είναι οι Αφλατοξίνη Β1(AFB1), η Β2(AFB2),η G1(AFG1) και η G2(AFG2)(63). Οι Β αφλατοξίνες παράγονται από τον *A.flavus* που είναι πιο διαδεδομένος στη φύση , αποικίζοντας στα εναέρια μέρη των φυτών. Ο *A.parasiticus* παράγει αφλατοξίνες Β και G και εμφανίζει μια ευρεία παγκόσμια εξάπλωση σε εδαφικά περιβάλλοντα θερμών και τροπικών κλιμάτων, έχοντας όμως πιο περιορισμένη εδαφική εξάπλωση(95). Οι ξηροί καρποί είναι η κύρια τροφή που συναντώνται , ωστόσο μπορούν να βρεθούν και σε πολλά είδη ζωοτροφών(4) .Οι αφλατοξίνες Β1 , Β2 ,G1 ,G2 αποτελούν φυσικά παραγόμενα συστατικά , με την Β1 η πιο διαδεδομένη , άφθονη και πιο τοξική μεταξύ των υπολοίπων και εύρος τοξικότητας μεταξύ αυτών να είναι Β1>G1>Β2>G2(63,96,97). Παράλληλα, μπορεί να θεωρηθεί ως ισχυρό φυσικό καρκινογόνο , ενώ έχει κατηγοριοποιηθεί ως καρκινογόνος παράγοντας κατηγορίας 1 από τη Διεθνή Υπηρεσία Έρευνας για τον καρκίνο (IARC) (4,93,98–100). Μεταβολικά προϊόντα που προκύπτουν από τις αφλατοξίνες Β1 και Β2 είναι η αφλατοξίνη Μ₁ και η αφλατοξίνη Μ₂ , που αναφέρονται επιπλέον ως τοξικά προϊόντα(101–103). Ο ρυθμός και ο βαθμός μόλυνσης από μυκοτοξίνες είναι πολυπαραγοντική διεργασία που εξαρτάται από τη θερμοκρασία, την υδατική δραστηριότητα, η ταυτόχρονη μυκοβιοτική , η φυσική φθορά και άλλες συνθήκες αποθήκευσης(31,95). Οι αφλατοξίνες συνδέονται με διάφορες ασθένειες όπως η αφλατοξίκωση σε ζώα ,κατοικίδια και ανθρώπους παγκοσμίως. Θεωρούνται ιδιαίτερα επιβλαβείς αφού έχουν καρκινογόνες, μεταλλαξιγόνες ,τερατογόνες και ανοσοκατασταλτικές επιπτώσεις(63). Ο κύριος στόχος της τοξικότητας της αφλατοξίνης είναι το ήπαρ , οπότε μακροχρόνια έκθεση των ζώων σε τοξικά επίπεδα αφλατοξινών μπορούν να έχουν ως αποτέλεσμα ηπατικές βλάβες ή και όγκους. Όπως αναφέρθηκε οι αφλατοξίνες είναι ηπατοτοξικές και καρκινογενείς. Σκύλοι που εκτίθενται σε 0.5-1mg αφλατοξίνης/κίλο σωματικού βάρους συνήθως πεθαίνουν σε διάστημα ημερών με συμπτώματα εμετού . κατάθλιψη, πολυδιψία ,πολυουρία και ηπατίτιδα , ενώ συμπτώματα ανορεξίας ,λήθαργου, ίκτερου, διάχυτης ενδοαγγειακής πήξης και θανάτου έχουν παρατηρηθεί σε σκύλους που εκτέθηκαν σε 0,05-0,3 mg αφλατοξίνης/κίλο τροφής σε διάστημα 6-8 εβδομάδων. Οι περισσότερες δηλητηριάσεις σκύλων έχουν συσχετιστεί γενικά με αφλατοξίνες γιατί έχουν υψηλή τοξικότητα σε αυτό το είδος(4,104). Παράλληλα έχει

παρατηρηθεί ότι ευνοείται η ανάπτυξη του γένους *Aspergillus* σε εμπορικές τροφές κατοικίδιων με ποσοστά υγρασίας 20-25% μετά από 4 εβδομάδες επώαση(105). Τέλος οι αφλατοξίνες αποτελούν πολύ σταθερές ενώσεις και είναι ανθεκτικές σε διεργασίες όπως το ψήσιμο, η εξώθηση , το φουρνάρισμα και το μαγείρεμα , οπότε αποτελούν πρόβλημα σε επεξεργασμένα τρόφιμα όπως και οι ζωοτροφές(31).

ΩΧΡΑΤΟΞΙΝΗ Α (ΟΤΑ)

Οι ωχρατοξίνες (OTs) παράγονται από μύκητες του γένους *Aspergillus* και *Penicillium* κυριότερα από τα είδη *A. ochraceus* ,*A. carbonarius*, *A. Verrucosum* και *P. nordicum*(86,101–103,106). Μπορεί να επιμολύνει πολλά είδη τροφίμων όπως καλαμπόκι , βρόμη ,σιτάρι καθώς και προϊόντα ζωικής προέλευσης(κρέας και γάλα)(107–111). Η χημική δομή της ωχρατοξίνης Α (ΟΤΑ) αποτελείται από μια L-β-φαινυλαλανίνη που συνδέεται μέσω αμιδικού δεσμού με μια χλωριωμένη διϋδροϊσοκουμαρίνη , ενώ η ωχρατοξίνη α αποτελεί προϊόν υδρόλυσης της ωχρατοξίνης Α λόγω της έλλειψης φαινυλαλανίνης (31). Το όνομα της προέρχεται από το μύκητα *Aspergillus ochraceus* , από τον οποίο απομονώθηκε πρώτη φορά(112). Η ΟΤΑ αποτελεί το πιο τοξικό είδος ωχρατοξίνης , λόγω της δομικής ομοιότητας με το αμινοξύ φαινυλαλανίνη, αφού επιτρέπει στην τοξίνη να δρα ως ανταγωνιστικός αναστολέας σε ένζυμα που χρησιμοποιούν τη φαινυλαλανίνη ως υπόστρωμα , όπως την Phe-tRNA συνθετάση , οδηγώντας τελικά σε αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης. Η ωχρατοξίνη Α , μπορεί να προκαλέσει μιτοχονδριακή βλάβη, οξειδωτική έκκριση, υπεροξειδωση λιπιδίων και μπορεί να παρέμβει στην οξειδωτική φωσφορλίωση(31). Παράλληλα κύριος στόχος της είναι το ήπαρ ενώ ταυτόχρονα ,μπορεί να προκαλέσει ανοσοκαταστολή ,νεφροτοξικότητα , ηπατοτοξικότητα, νευροτοξικότητα , καρκινογένεση και αναπτυξιακή-αναπαραγωγική τοξικότητα σε διάφορα είδη ζώων (93,96,113–115). Δεν καταστρέφεται από τις συνήθεις διαδικασίες επεξεργασίας των τροφίμων , με θερμοκρασία μεγαλύτερη των 250 °C για αρκετά λεπτά για μείωση της συγκέντρωσης της ΟΤΑ(116). Κυρίως βρίσκεται όταν υπάρχει ανεπαρκής ξήρανση ή η ακατάλληλη αποθήκευση των προϊόντων. Σε εύκρατες περιοχές η μόλυνση οφείλεται κυρίως σε *Penicillium verrucosum* είδη μυκήτων ενώ σε θερμότερες

περιοχές οφείλει την παρουσία της σε είδη *Aspergillus* (*A. carbonarius*). Αναφορικά με τα συστατικά των ζωοτροφών, η ΟΤΑ μπορεί να βρεθεί συχνότερα σε δημητριακά. Αν λάβουμε υπόψιν ότι οι μύκητες αναπτύσσονται σε τοπικά σημεία, για παράδειγμα όπου είναι αυξημένη η υγρασία, στα σιτηρά και επομένως στις ζωοτροφές, η διασπορά αυτής στις ζωοτροφές είναι σε μεγάλο βαθμό ετερογενής, πράγμα που πρέπει να λαμβάνεται υπόψιν κατά τον έλεγχο δειγμάτων για επιμόλυνση από ΟΤΑ(96). Οι τοξικές επιπτώσεις της ΟΤΑ, έχουν μελετηθεί σε πολλά κατοικίδια, ζώα συντροφιάς, πειραματόζωα. Ωστόσο έχει φανεί ότι τα πιο ευαίσθητα ζώα είναι οι χοίροι με κύριο στόχο τα νεφρά, ενώ η τοξικότητα αυτής επηρεάζεται από το είδος, το φύλο και τον τρόπο εισαγωγής στον οργανισμό. Όσον αφορά την οξεία τοξικότητα της ΟΤΑ οι σκύλοι, οι χοίροι και τα κοτόπουλα είναι πιο ευαίσθητα είδη (117).

ΤΡΙΧΟΘΗΚΕΝΙΑ

Τα τριχοθηκένια αποτελούν μια από τις πιο σημαντικές κατηγορίες μυκοτοξινών που βρίσκονται σε ζωοτροφές κατοικίδιων, λόγω της παρουσίας αυτών σε δημητριακά και φυτικά συστατικά που αποτελούν πρώτες ύλες στην παραγωγή των τροφών για κατοικίδια όπως ο σκύλος και η γάτα. Αποτελούν μια ομάδα από δομικά συγγενής ενώσεις (>200), οι οποίες χωρίζονται χημικά σε τέσσερις διαφορετικούς τύπους (Α έως D) και παράγονται κυρίως από τα γένη *Fusarium*, ενώ μπορούν να παραχθούν επιπλέον και από τα γένη *Cephalosporium*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Spicellum*, *Tricothecium* (12,31,86,101,118). Τα τριχοθηκένια αποτελούν αλκοόλες ή εστέρες σεσκιτερπενίου και φέρουν ένα εποξειδικό δακτύλιο στη θέση 12,13 ο οποίος είναι απαραίτητος για την βιολογική και τοξική τους δράση(118,119). Τα τύπου Α και Β τριχοθηκένια αποτελούν τις πιο σημαντικές από τοξικολογική άποψη ενώ διαχωρίζονται ανάλογα με τους υποκαταστάτες στην θέση C-8. Διακρίνονται σε τύπου Α, όπου υπάρχει μια πλευρική αλυσίδα τύπου υδρογόνου ή εστέρα στη θέση αυτή, και οι τύπου Β που υπάρχει στη θέση C-8 μια ομάδα κετόνης(86,118). Οι τοξίνες τύπου Α κυρίως περιλαμβάνουν τις HT-2 και T-2, είναι πιο τοξικές και εμφανίζουν μεγαλύτερη κυτταροτοξική και ανοσοκατασταλτική δράση και προκαλούν μειωμένη πρόσληψη τροφής και αύξηση βάρους, αιματηρή διάρροια,

στοματικές αλλοιώσεις και σε κάποιες περιπτώσεις και θάνατο. Από την άλλη τα τριχοθηκένια τύπου Β που περιλαμβάνουν τη δεσοξυνιβαλενόλη (DON) και τα παράγωγά της και τη νιβαλενόλη (NIV), προκαλούν συνήθως εμετογόνα και ανορεξική δράση(12,86,93,119). Γενικότερα τα τριχοθηκένια είναι πολύ σταθερές ενώσεις τόσο κατά την αποθήκευση/άλεση/επεξεργασία και μαγείρεμα των τροφίμων και με χρήση υψηλής θερμοκρασίας δεν αποδομούνται(31,120). Στις ζωοτροφές κατοικίδιων, η παρουσία τριχοθηκενίων συνδέεται συνήθως με τις ξηρές τροφές, όπου το ποσοστό δημητριακών και φυτικών ινών είναι περισσότερο αυξημένο, συγκριτικά με τις υγρές τροφές. Πρόσφατες μελέτες κατέδειξαν ότι σημαντικό ποσοστό εμπορικών τροφών για σκύλους και για γάτες εμφανίζει επιμόλυνση από μυκοτοξίνες με τις T-2 και HT-2 να είναι από τα πιο συχνά ανιχνεύσιμες τριχοθηκένια(121). Η χρόνια έκθεση σκύλων και γατών ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις τριχοθηκενίων έχει συσχετιστεί με μειωμένη πρόσληψη τροφής, γαστρεντερικές διαταραχές, βλάβες του εντερικού επιθηλίου και καταστολή της ανοσολογικής απόκρισης(111).

ΖΕΑΡΑΛΕΝΟΝΗ

Η ζεαραλενόνη αποτελεί μια από τις πιο διαδομένες μυκοτοξίνες που παράγονται από τα είδη *Fusarium*. Συναντάται κυρίως σε πίτουρο σιταριού και καλαμποκιού και σε χαμηλότερα επίπεδα σε σιτάρι, κριθάρι, σόργο, βρόμη, σανό, ρύζι, σίκαλη, βύνη και σόγια(122,123). Μπορεί να σχηματιστεί είτε κατά την συγκομιδή, είτε κατά την αποθήκευση, ιδιαίτερα όταν αυτή γίνεται σε υψηλή υγρασία και με κυμαινόμενες θερμοκρασίες, ευνοείται η παραγωγή της σε υψηλή υγρασία και χαμηλή θερμοκρασία, ενώ μπορεί να επιβιώσει από τη επεξεργασία των πρώτων υλών και να συγκεντρωθεί σε παραπροϊόντα(123). Ωστόσο με εξώθηση έχει φανεί ότι μειώνεται ελαφρώς η συγκέντρωση της ZEA(124). Αποτελεί μια μακροκυκλική β-ρεσοκυκλική οξική λακτόνη. Παρουσιάζει επιπλέον μεγάλη δομική ομοιότητα με τα φυσικά οιστρογόνα, οπότε μπορεί να περιγραφεί και ως οιστρογονική μυκοτοξίνη(6,125). Τα συμπτώματα που μπορεί να προκαλέσει στα ζώα έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις οιστρογόνων είναι παρόμοια με αυτά που προκαλεί η έκθεση σε ζεαραλενόνη. Ουσιαστικά η ZEA και τα παράγωγα αυτής δρουν μετατοπίζοντας την οιστραδιόλη από την πρωτεΐνη σύνδεσης με τη

υπόστρωμα(6,126). Με χορήγηση αυτής σε σκυλιά , παρατηρήθηκαν επιδράσεις στη υπόστρωμα και τις ωοθήκες , όπως εκφύλιση, ατροφία, υπερδομικές αλλαγές και ορμονικές επιδράσεις , σε δοσολογία ίση με 25 ή 75mg/kgBW/ΗΜΕΡΑ ΓΙΑ 42-100 ημέρες(123,127,128). Παράλληλα δημοσιεύσεις αναφέρουν σαν μέση-μέγιστη συγκέντρωση σε ζωοτροφές κατοικίδιων τα 300ppb ενώ στη νότια Αφρική η μέση συγκέντρωση που είχε ανιχνευτεί σε πλήθος 60 δειγμάτων ήταν 354ppb ενώ ορισμένα δείγματα η συγκέντρωση ήταν εκτός των επιτρεπόμενων ορίων για αυτή την χώρα (1000ppb)(70,123,129–131) .Τέλος, από τον IARC η ZEA κατηγοριοποιείται ως καρκινογόνος ουσία ομάδας 3 (6).

ΦΟΥΜΟΝΙΣΙΝΕΣ

Οι φουμονισίνες αποτελούν μια ομάδα μυκοτοξινών που παράγονται επίσης από είδη *Fusarium* , με τα είδη *F. verticillioides* και *F. proliferatum* να τις παράγουν σε μεγάλες ποσότητες ενώ ταυτόχρονα έχει φανεί ότι ο *Aspergillus niger* επίσης παράγει τις φουμονισίνες B1,B2,B4,B6 (132–136). Παράλληλα έχουν ταυτοποιηθεί τουλάχιστον 18 φουμονισίνες και κατηγοριοποιούνται σε 4 κατηγορίες: A,B,C και P , ανάλογα με τη χημική τους δομή(123). Έχουν δομική ομοιότητα με τη σφιγγανίνη που αποτελεί πρόδρομη ένωση των σφιγγολιπιδίων. Αποτελούν υδρόφιλα μόρια Η δράση των μυκοτοξινών αυτής της ομάδας έγκειται στην αναστολή του ενζύμου κεραμιδική συνθάση (CER) , το οποίο καταλύει την ακυλίωση της σφιγγανίνης(Sa) και την ανακύκλωση της σφιγγοσίνης(So). Με την αναστολή του ενζύμου που αναφέρθηκε αυξάνεται η ενδοκυτταρική Sa και άλλες σφιγγοειδής βάσεις , που αποτελούν τοξικές ενώσεις για το κύτταρο. Λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης αυτών των ενώσεων οι φουμονισίνες έχουν τοξική δράση και ενδεχομένως και καρκινική δράση(31,137). Η κατηγορία B της ομάδας των φουμοσινών (FB) , ιδιαίτερα η FB1 αποτελούν την πιο σημαντική ομάδα όσον αφορά την τοξικότητα αυτών. Ιδιαίτερα η FB1 φαίνεται να έχει περισσότερη δράση όσον αφορά την αναστολή του ενζύμου που αναφέρθηκε προηγουμένως. Όσο αναφορά την παρουσία αυτών στις ζωοτροφές κατοικίδιων , η παρουσία αυτών είναι συχνή στις πρώτες ύλες των ζωοτροφών. Οι φουμονισίνες της ομάδας B, βρίσκονται στο καλαμπόκι πριν , κατά τη διάρκεια ,μετά την συγκομιδή ή κατά το πρώτο στάδιο αποθήκευσης αυτού. Σε καλαμπόκι ή ρύζι , η φουμονισίνη

B1 , αποτελεί την κύρια μορφή φουμονισινών , αντιπροσωπεύοντας το 70%. Ακολουθεί η φουμονισίνη σε ποσοστό 15-25% και η φουμονισίνη B3 σε ποσοστό 3-8% (138). Μπορούν επίσης να βρεθούν σε σόργο, σιτάρι, κριθάρι, σόγια, σπαρράγγια, σύκα, μαύρο τσάι και φαρμακευτικά φυτά(6,100,125). Σε θερμότερες περιοχές μπορεί να παρατηρηθεί μεταβολή καθώς τα είδη *F. verticillioides* και *F. proliferatum* αναπτύσσονται σε ευρύ φάσμα θερμοκρασιών και σε υψηλές δραστηριότητες νερού. Κατά την αποθήκευση γενικά η συγκέντρωση των φουμοσινών δε φαίνεται να αυξάνεται παρά μόνο σε ακραίες συνθήκες(31,123) . Φαίνεται να είναι θερμοσταθερές και η συγκέντρωση αυτών να μειώνεται μόνο σε διεργασίες που η θερμοκρασία ξεπερνά τους 150°C.Ενώ η διεργασία της ζύμωσης φαίνεται να αποικοδομεί τις φουμονισίνες(133). Τα συμπτώματα που φαίνεται να προκαλεί η κατανάλωση ζωοτροφών μολυσμένων με φουμονισίνες είναι η μειωμένη όρεξη και δραστηριότητα (12). Ωστόσο χαρακτηρίζονται από χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα από του στόματος ενώ δεν βιοσυσσωρεύονται σε μεγάλο βαθμό στους ιστούς. Παρόλα αυτά η χρόνια κατανάλωση τροφής μολυσμένης με φουμονισίνες μπορεί να οδηγήσει σε ηπατοτοξικότητα και άλλες βιοχημικές επιδράσεις(139). Τέλος ταξινομούνται στη 2B κατηγορία από τον IARC , ως πιθανώς καρκινογενής ουσίες για τον άνθρωπο(6).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: ΚΥΡΙΕΣ ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ(140)

ΤΥΠΟΙ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ	ΕΙΔΗ ΜΥΚΗΤΩΝ ΠΟΥ ΤΙΣ ΠΑΡΑΓΟΥΝ	ΣΕ ΤΙ ΠΡΩΤΕΣ ΥΛΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΒΡΕΘΟΥΝ	
		ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΜΠΟΡΟΥΝ ΝΑ ΒΡΕΘΟΥΝ	ΕΠΙΠΤΩΣΕΙΣ ΣΤΑ ΖΩΑ
Αφλατοξίνες (AFB1,AFB2,AFG1, AFG2)	<i>Aspergillus</i> sp. (<i>Aspergillus</i> <i>Flavus</i> , <i>Aspergillus</i> <i>parasiticus</i>)	Καλαμπόκι,σιτάρι,ρύζι, γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα, αυγά ,κρέας	Ηπατοτοξικότητα , ανοσοκαταστολή,νεφροτοξικότητα, καρκινογένεση

Ωχρατοξίνες (ΟΤΑ,ΟΤΒ ,ΟΤC)	Aspergillus sp. Penicillium Verrucosum	Δημητριακά , κριθάρι,σιτάρι,βρώμη, σίκαλη	Ηπατοτοξικότητα , ανοσοκαταστολή,νεφροτοξικ ότητα, καρκινογένεση,αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης
Τριχοθηκένια (Τ- 2/HT-2/DON)	Fusarium sp. Cephalosporium sp. Trichoderma sp.	Δημητριακά, προϊόντα δημητριακών	Κυτταροτοξικότητα,ανοσοκα ταστολή,μεταλλαξιγένεση, νεφροτοξικότητα,ανορεξία και διάρροια , απώλεια βάρους ,λευκοκυττάρωση, αιμορραγία , στοματικές αλλοιώσεις
Φουμονισίνες (FB1 ,FB2,FB3)	Fusarium sp. (Fusarium verticillioides Fusarium proliferatum)	Καλαμπόκι και τα παράγωγά του ,ρύζι, σόρκο,γάλα	Ηπατοτοξικότητα , ανοσοκαταστολή , καρκινογένεση, απόπτωση των κυττάρων , πνευμονικό οίδημα,ανοσοτοξικότητα
ΖΕΑ	Fusarium sp. (Fusarium graminearum, Fusarium culmorum)	Κριθάρι, βρώμη, ρύζι σίτου,σόρκο , σουσάμι, σόγια , προϊόντα δημητριακών	Αλλαγές στο αναπαραγωγικό σύστημα , γενετοξικότητα , αναπαραγωγική και αναπτυξιακή τοξικότητα , κολπική πρόπτωση , αποβολή

2.2. ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ

2.2.1. ΡΥΘΜΙΖΟΜΕΝΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Οι μυκοτοξίνες που συνήθως ονομάζονται «ρυθμιζόμενες» αφορούν αυτές που υπάγονται σε κάποιο νομοθετικό πλαίσιο , δηλαδή είναι μυκοτοξίνες με κάποια ενδεικτικά επίπεδα συγκέντρωσης. Η κατηγορία αυτή μυκοτοξινών αφορά τις αφλατοξίνες , κάποιες μυκοτοξίνες που περιλαμβάνονται στα τριχοθηκένια (Α και

B) , την ζεαραλενόνη , την ωχρατοξίνη A και τις φουμονισίνες. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις αυτών στην νομοθεσία αναφέρονται συνήθως είτε τα μέγιστα επιτρεπτά όρια είτε καθοδηγητικές τιμές συγκεντρώσεων.

2.2.2. ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Ο όρος «τροποποιημένες» χρησιμοποιείται για να περιγράψει όλες τις μορφές μυκοτοξινών που έχουν υποστεί βιολογική ή χημική τροποποίηση συγκριτικά με το μητρικό μόριο. Αυτό γίνεται είτε μέσω φυτικών και μικροβιακών μηχανισμών είτε κατά την τεχνολογική επεξεργασία των πρώτων υλών και των ζωοτροφών (141,142). Στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται οι συγκαλυμμένες μυκοτοξίνες ή αλλιώς βιολογικά τροποποιημένες , τα θερμικά ή χημικά παράγωγα επεξεργασίας καθώς και μορφές που σχετίζονται σε αλληλεπιδράσεις με τη υπόστρωμα της τροφής(141,143).Οι τροποποιημένες μυκοτοξίνες μπορούν να σχηματιστούν μέσω φυτικών μηχανισμών άμυνας έναντι μυκητιακών προσβολών , μέσω μυκητιακής βιοσύνθεσης ή ως αποτέλεσμα αβιοτικών αντιδράσεων μεταξύ της αρχικής μυκοτοξίνης και της υποστρώματος των ζωοτροφών κατά την επεξεργασία τους όπως η θερμική επεξεργασία ή η εξώθηση(8,142). Για την ασφάλεια των ζωοτροφών , οι τροποποιημένες μυκοτοξίνες του γένους *Fusarium* φέρουν αρκετά σημαντικό ρόλο , εφόσον οι μύκητες αυτού του γένους αναπτύσσονται κυρίως στο χωράφι , και άρα και στις πρώτες ύλες από τις οποίες παράγονται οι ζωοτροφές. Παραδείγματα τροποποιημένων μορφών μυκοτοξινών αποτελούν η deoxynivalenol-3-glucoside , οι γλυκοζυλιωμένες και θειϊκές μορφές της ZEA , καθώς και τροποποιημένες μορφές των φουμονισινών (8,142). Αν και πολλές τροποποιημένες μορφές εμφανίζουν χαμηλότερη εγγενή τοξικότητα σε σύγκριση με τις μητρικές ενώσεις , μπορούν να υδρολυθούν στο γαστρεντερικό σωλήνα , οπότε μπορεί με χρόνια έκθεση του ζώου σε μια μολυσμένη ζωοτροφή να είναι επιβαρυντική για τα ζώα(8,143). Ιδιαίτερα για κατοικίδια όπως ο σκύλος και η γάτα που τρέφονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα με την ίδια τροφή. Η EFSA έχει επισημάνει ότι λόγω έλλειψης επαρκών τοξικολογικών δεδομένων , οι τροποποιημένες μυκοτοξίνες πρέπει να συνεκτιμώνται μαζί με τις μητρικές μορφές τους (144).

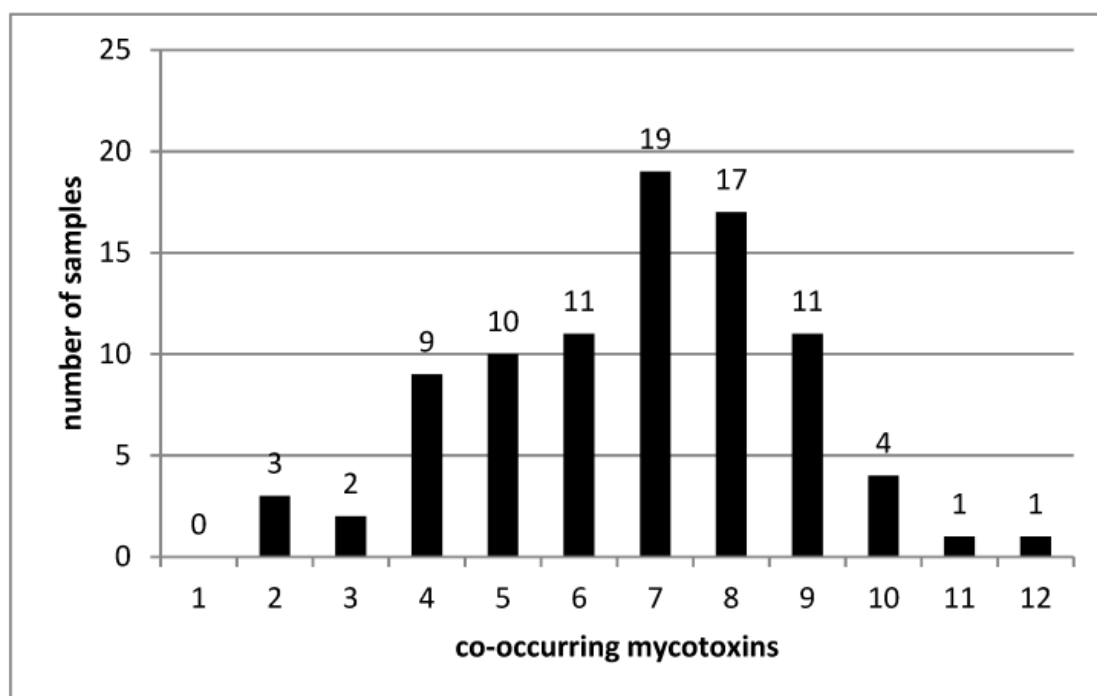
2.2.3. ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΕΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

Οι αναδυόμενες μυκοτοξίνες μπορούν να οριστούν ως , ενώσεις που δεν προσδιορίζονται συστηματικά , ούτε ρυθμίζονται από τη νομοθεσία. Ωστόσο , αρκετές πρόσφατες δημοσιεύσεις έχουν επισημάνει την τοξικότητά τους και την υψηλή συχνότητα συνύπαρξής τους(145,146). Οι αναδυόμενες μυκοτοξίνες που ανιχνεύονται πιο συχνά παγκοσμίως περιλαμβάνουν το φουσαρικό οξύ (FUS), τις εννιατίνες (ENNs) , την κουλμορίνη , την απικιδίνη , την βουτενολίδη , την φουσαπρολιφερίνη, τις τοξίνες του είδους αλτερνάρια , το αουροφουσαρίνη , η εμοντίνη , η νιβαλενόλη (NIV) , η μποβερικίνη (BEA) , η διακετοξυσιπενόλη (DAS), η πατουλίνη (PAT), η μονιλιφορμίνη(MON) και η στεριγματοκουστίνη (STG)(12,145). Η ομάδα αυτή μυκοτοξινών θεωρείται λιγότερο σημαντική όσον αφορά την παρουσία αυτών στα τρόφιμα και στις ζωοτροφές , πιο συγκεκριμένα τα επίπεδα αυτών ενώ ταυτόχρονα λιγότερο σημαντική θεωρείται και η τοξικές επιδράσεις τους στον άνθρωπο και στα ζώα(145,147). Παρόλα αυτά , από έρευνες μεγάλης κλίμακας , φάνηκε ότι οι αναδυόμενες μυκοτοξίνες αποτελούν συχνό μολυσματικό παράγοντα των ζωοτροφών με τις καιρικές συνθήκες, την γεωγραφική θέση και τις γεωργικές πρακτικές, να επηρεάζουν άμεσα την εμφάνιση και τη συγκέντρωση αυτών(145). Ενώ *in vitro* και *in vivo* έρευνες έχουν δείξει ότι κατανάλωση ζωοτροφών μολυσμένων με αυτό το είδος οργανικού ρύπου μπορεί να έχει επιβλαβείς συνέπειες στην εντερική μορφολογία , το ανοσοποιητικό , το αναπαραγωγικό σύστημα αλλά και στην πρόσληψη τροφής και βάρους. Επιπρόσθετα , από έρευνες φαίνεται οι αναδυόμενες μυκοτοξίνες να συνυπάρχουν συχνά με ρυθμιζόμενες μυκοτοξίνες , όπως FUM,DON,AF,ZEA,T-2/HT-2 OTA , τόσο σε καλλιέργειες όσο και σε ζωοτροφές(12,145). Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι οι αναδυόμενες μυκοτοξίνες παράγονται επίσης από γένη μυκήτων που παράγουν και τις ρυθμιζόμενες μυκοτοξίνες , όπως *Aspergillus* , *Penicillium* ,*Fusarium*. Όσον αφορά την νομοθεσία , ο Καναδάς και το Ισραήλ έχουν θεσπίσει νομοθετικά όρια για το DAS στις ζωοτροφές , ενώ στην Ευρωπαϊκή Ένωση δεν υπάρχουν θεσπισμένα όρια για τις αναδυόμενες μυκοτοξίνες(145,148).

2.3. ΣΥΝΥΠΑΡΞΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ

Λαμβάνοντας υπόψιν ότι οι μύκητες είναι ικανοί συνήθως να παράγουν περισσότερες από μια μυκοτοξίνες ενώ ταυτόχρονα οι πρώτες ύλες των ζωοτροφών είναι μολυσμένες με διαφορετικά είδη μυκήτων και οι ζωοτροφές περιέχουν μείγμα πρώτων υλών , η μελέτη παρουσίας μια μεμονωμένης μυκοτοξίνης παρέχει ελλιπείς πληροφορίες όσον αφορά το τοξικολογικό προφίλ και τον κίνδυνο που ενέχει η εκάστοτε ζωοτροφή(72,86,93,149,150). Ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις η παρουσία περισσότερων από μια μυκοτοξινών στο ίδιο προϊόν μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα για την υγεία των ζώων , λόγω πιθανών επιδράσεων που προκαλούνται συνεργιστικά , αθροιστικά ή ανταγωνιστικά. Οπότε σημαντική κρίνεται η ανάλυση μια σειράς μυκοτοξινών προκειμένου να προσδιοριστεί με ακρίβεια η ποιότητα και η ασφάλεια των ζωοτροφών(93,149).Η συνύπαρξη μυκοτοξινών σε τροφές κατοικίδιων έχει επισημανθεί στο παρελθόν. Κυρίως φαίνεται να αφορά τις μυκοτοξίνες του είδους *Fusarium* , κυριότερα το DON και τις φουμονισίνες (129). Σε μελέτη που αφορούσε 60 δείγματα ζωοτροφών για σκύλους στη Νότια Αφρική το 2011, λόγω επιδημίας αφλατοξίκωσης σκυλιών ,το 75% των δειγμάτων ήταν θετικό σε παρουσία αφλατοξινών. Ταυτόχρονα φάνηκε και σημαντική παρουσία FUMs,OTA,ZEA σε συγκεντρώσεις πάνω από τα αποδεκτά από τη νομοθεσία όρια. Πιθανό ενδέχεται η αιτιολογία να ήταν πολυμυκοτοξικολογική λόγω πρόσθετων και συνεργιστικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μυκοτοξινών , με αποτέλεσμα να επηρεαστεί η κλινική εικόνα των σκύλων(2,151). Παράλληλα μεταγενέστερες μελέτες σε πλήθος δειγμάτων ζωοτροφών για σκύλους , έχουν δείξει ξανά τη συνύπαρξη μυκοτοξίνες του είδους *Fusarium* , κυριότερα ξανά DON-FB1/FB2 , ενώ κάποια δείγματα περιείχαν και ZEA (2). Επιπλέον σε μελέτη που αφορούσε τις ξηρές τροφές γατών , έδειξε ότι το 80% των δειγμάτων που αναλύθηκαν περιείχαν τουλάχιστον δύο είδη μυκοτοξινών σε ποσοτικοποιήσιμες συγκεντρώσεις .Πιο αναλυτικά το 28% ήταν επιμολυσμένα με δύο είδη μυκοτοξινών (DON+FUMs) , το 42% είχε επιμολυνθεί με από 3 διαφορετικά είδη μυκοτοξινών (ZEA+DON+FUMs), το 8% από 4 μυκοτοξίνες και το 2% από 5 διαφορετικές μυκοτοξίνες(152). Στην

ίδια μελέτη αναφέρεται ότι ένας μεγάλος σχετικά αριθμός δειγμάτων φαίνεται να ξεπερνά και τις νομοθετικά επιτρεπόμενες τιμές συγκεντρώσεων για τις μυκοτοξίνες , ενώ σε ένα δείγμα φάνηκε ταυτόχρονα δύο μυκοτοξίνες να ξεπερνούν το νομοθετικό όριο(152) .Τα δεδομένα αυτά υποδηλώνουν ότι η έκθεση των κατοικίδιων σε μυκοτοξίνες δεν είναι μεμονωμένη αλλά πολυπαραγοντική ,γεγονός που μπορεί να τροποποιήσει το τοξικολογικό τους προφίλ συγκριτικά με την έκθεση σε μια μόνο μυκοτοξίνη. Στο ΣΧΗΜΑ 6 , που προέρχεται από ανάλυση πολλαπλών μυκοτοξινών από τους Castaldo et. al. ,2019 (67) , φαίνεται ο αριθμός των δειγμάτων που έχουν μολυνθεί από συγκεκριμένο αριθμό μυκοτοξινών. Επιπρόσθετα ,παραδοσιακά τα κατοικίδια τρέφονται με τον ίδιο τύπο τροφής για μεγάλα διαστήματα , επομένως η επιστημονική κοινότητα θα πρέπει να είναι ενήμερη για την πιθανή χρόνια έκθεση των σκύλων και γατών ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα διάφορων μυκοτοξινών αλλά και για τις επιπτώσεις που αυτές φέρουν στην υγεία τους(152). Ωστόσο, οι παγκόσμιες νομοθετικές διατάξεις αναφέρονται συνήθως σε μεμονωμένες μυκοτοξίνες χωρίς να λαμβάνουν υπόψιν τις πιθανές αθροιστικές ή συνεργιστικές επιδράσεις που προκύπτουν όπως αναφέρθηκε από την ύπαρξη περισσότερων από μια μυκοτοξινών στην ίδια ζωοτροφή.



**ΣΧΗΜΑ 5: ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΜΟΛΥΝΘΕΙ ΑΠΟ ΣΥΓΚΕΚΡΙΜΕΝΟ ΑΡΙΘΜΟ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ
(ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΑΝΕΛΥΜΕΝΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ=89) (68)**

2.4. ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΣΚΥΛΟΥ ΚΑΙ ΓΑΤΑΣ

Η ευρεία χρήση φυτικής προέλευσης πρώτων υλών στις εμπορικές ζωοτροφές σκύλου και γάτας συνδυαστικά με τις συνθήκες παραγωγής και αποθήκευσης καθιστά όπως έχει αναφερθεί πιθανή την παρουσία μυκοτοξινών στο τελικό προϊόν. Οπότε η αξιολόγηση της συχνότητας εμφάνισης μυκοτοξινών σε εμπορικές τροφές κατοικίδιων αποτελεί βασικό στοιχείο για την εκτίμηση της έκθεσης και του δυνητικού κινδύνου για την υγεία των ζώων. Στον ΠΙΝΑΚΑ 2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από μια ανασκόπηση διαθέσιμων μελετών σχετικά με την παρουσία μυκοτοξινών σε δείγματα τροφών για κατοικίδια.

ΠΙΝΑΚΑΣ 2: ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΔΙΑΘΕΣΙΜΩΝ ΜΕΛΕΤΩΝ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΡΟΦΩΝ ΓΙΑ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΑ

ΑΝΑΛΥΘΕΝΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ (n)	ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ(%)	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
29	DON	83	(129)
22	ZEA	68	
3	FUM	67	
49	DON	100	(70)
	ZEA	100	
	FBs	4.1	
	AFB1	8.2	
	OTA	47	
	T-2	87.8	
	HT-2	83,7	
48	DON	0	(2)
	AFB1	33	
	AFB2	54	
	AFG1	17	
	AFG2	38	
	FB1	15	
	FB2	19	

	OTA		17		
	ZEA		35		
100	AFLs		68	(69)	
	ZEA		95		
	FB1		68		
	FB2		35		
32	AFB1		47.7	(153)	
	AFG1		13.9		
	OTA		15.1-17.3		
	ZEA		14.5-389.2		
	DON		22.8-421.3		
	T-2		15.4		
	BEA		0.2-153.4		
	FB1		6.6-191.9		
87	AFs		83	(73)	
	ZEA		25		
	FBs		70.8		
64	LOD < mycotoxin < LOQ	LOD < mycotoxin < LOQ		(152)	
	ZEA		33		
	DON		11		
	AFB1		16		
	AFB2		0		
	AFG1		0		
	AFG2		0		
	FB1		3		
	FB2		5		
	OTA		8		
	T-2		20		
	HT-2		11		
	mycotoxin ≥ LOQ	mycotoxin ≥ LOQ			
	ZEA		42		
	ZEA		80		
	AFB1		13		
	AFB2		0		
	AFG1		0		
	AFG2		0		
	FB1		95		
	FB2		94		
	OTA		3		
	T-2		8		
HT-2		0			
	AFB1		25.8	(67)	
	AFB2		5.6		
	AFG1		1.1		
	AFG2		5.6		
	OTA		2.2		
	ZEA		91.0		
			87.6		

89	$\Sigma_{\alpha+\beta}$ -ZEL		79.8	
			30.3	
	$\Sigma_{\alpha+\beta}$ -ZAL		5.6	
	DON		32.6	
	Σ_{3+15} -AcDON		47.2	
	HT-2		86.5	
	T-2		10.1	
	BEA		22.5	
	ENNA		93.3	
	ENNA1		58.4	
	ENNB		82.0	
	ENNB1		84.3	
	AOH		66.3	
	AME		52.8	
	FB1			
FB2				
	AFB1		93.3	(91)
	AFB2		26.7	
	AFG1		53.3	
	AFG2		3.3	
	OTA		73.3	
	HT-2		100	
	T-2		96.7	
	ZEA		93.3	
	DON		100	
	FB1		100	
	FB2		100	
DOG FEED	AFB1		100	
CAT FEED	AFB2		58.1	
	AFG1		77.4	
	AFG2		0	
	OTA		83.9	
	HT-2		96.6	
	T-2		96.6	
	ZEA		77.4	
	DON		100	
	FB1		100	
	FB2		100	

2.5. ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΕ ΑΛΛΟΥΣ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΟΥΣ ΡΥΠΟΥΣ

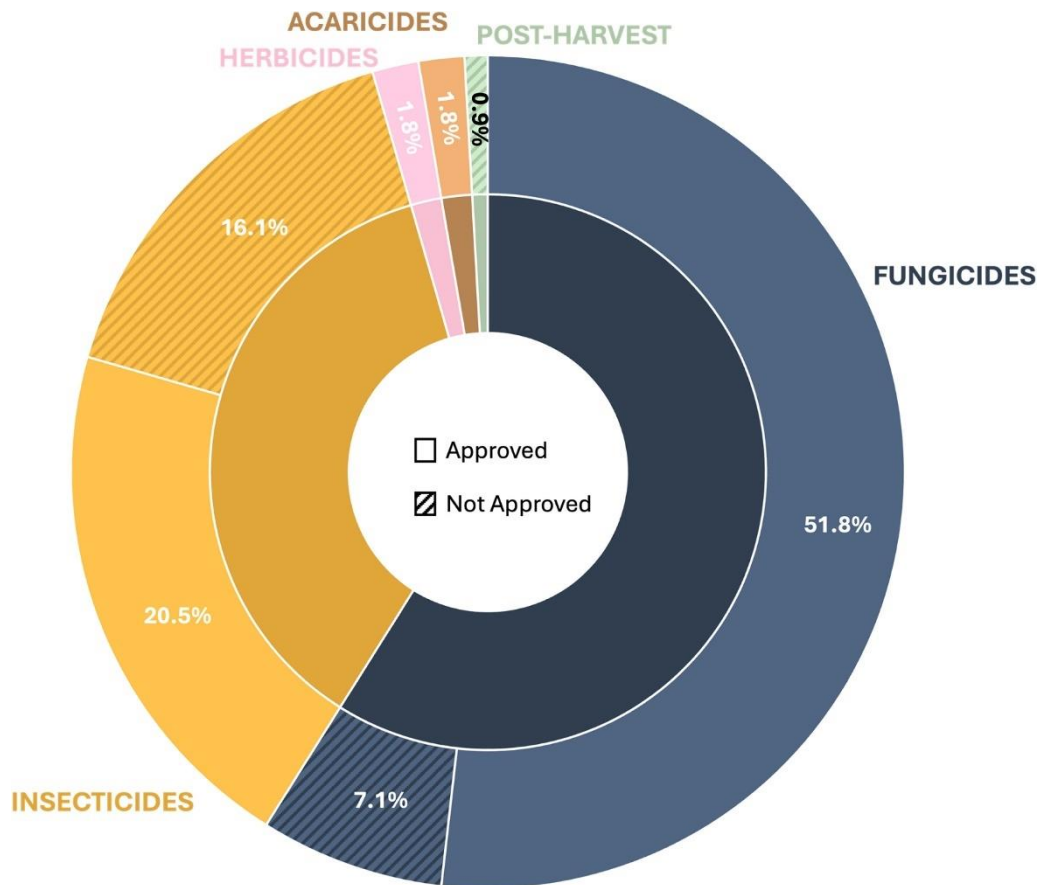
Οι ουσίες που μπορεί να επιμολύνουν τις ζωοτροφές μπορεί να είναι βιοτικής προέλευσης με πιο συνηθισμένες τις μυκητιακές και βακτηριακές τοξίνες. Μπορεί

όμως να επιμολυνθούν και από αβιοτικές ουσίες όπως υπολείμματα φυτοφαρμάκων και κτηνιατρικών φαρμάκων(154).

2.5.1. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Οι σύγχρονες συνταγές τροφών για κατοικίδια περιέχουν μια ευρεία γκάμα φυτικών συστατικών όπως δημητριακά και διάφορα λαχανικά , τα οποία παρέχουν ενέργεια, πρωτεΐνες ,φυτικές ίνες και απαραίτητα μικροθρεπτικά συστατικά(46). Ωστόσο η αυξανόμενη χρήση φυτικών συστατικών στις συνταγές των ζωοτροφών , προκαλεί ανησυχία, όσον αφορά την παρουσία ρύπων σε αυτές όπως τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων. Τα φυτοφάρμακα είναι πολυάριθμες και ποικίλες ομάδες χημικών ενώσεων ή ουσιών που χρησιμοποιούνται στη γεωργία για την αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών και τον έλεγχο της φθοράς κατά την συγκομιδή(155,156). Για τον έλεγχο ανεπιθύμητων μυκήτων , εντόμων ή ζιζανίων κατά τη διάρκεια της γεωργικής καλλιέργειας και της αποθήκευσης μετά τη συγκομιδή , υπάρχουν πάνω από 1100 δραστικά συστατικά φυτοφαρμάκων(155,157). Τα φυτοφάρμακα που μπορεί να μολύνουν τις ζωοτροφές προέρχονται κυρίως από τις πιο κοινές ομάδες αυτών όπως, τα οργανοχλωριωμένα ,τα οργανοφωσφορικά και τα πυρεθροειδή(158). Οι ενώσεις αυτές μπορούν να εισέλθουν στην αλυσίδα παραγωγής των ζωοτροφών είτε μέσω φυτικών πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές , είτε μέσω ζωικών πρωτεϊνών ,αφού στους ιστούς των ζώων μπορεί να περιέχονται υπολείμματα φυτοφαρμάκων (159,160). Στον ορό ,τα μαλλιά και τα ούρα των γατών και των σκυλιών έχουν βρεθεί υπολείμματα φυτοφαρμάκων , οπότε φανερά είναι πιθανή η έκθεση των ζώων αυτών μέσω περιβαλλοντικών ή διατροφικών πηγών(159,161). Η έκθεση των κατοικίδιων σε αυτές τις ουσίες έχει συσχετιστεί με προβλήματα υγείας όπως λέμφωμα, καρκίνος της ουροδόχου κύστης και όγκοι του μαστού σε σκύλους και υπερθυρεοειδισμός στις γάτες , ωστόσο δεν υπάρχουν συγκεκριμένοι κανονισμοί για τα υπολείμματα των φυτοφαρμάκων στις ζωοτροφές των ζώων συντροφιάς στην ΕΕ. Συχνά ως κατευθυντήρια γραμμή χρησιμοποιείται ο κανονισμός (ΕΚ) αριθμ. 369/2005 της ΕΕ(159,162–164). Σε πρόσφατη μελέτη από την Macías-Montes et. al. ,2025 (159), ταυτοποιήθηκαν 112 ανιχνεύσεις από 39 διαφορετικά φυτοφάρμακα .Τα

κυριότερα φυτοφάρμακα που ανιχνεύθηκαν ήταν μυκητοκτόνα(21 ενώσεις)- εντομοκτόνα (14 ενώσεις) , ακαρεοκτόνα (2 ενώσεις) , ζιζανιοκτόνο (1 ένωση) και ένα φυτοφάρμακο μετά τη συγκομιδή , ενώ 12 εξ' αυτών δεν είχαν έγκριση από την ευρωπαϊκή ένωση. Από την μελέτη αυτή βλέπουμε στο ΣΧΗΜΑ 7 την κατανομή των υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων που ανιχνεύθηκαν στα αναλυθέντα δείγματα τροφών για γάτες και σκύλους, ανάλογα με τη χρήση τους και το νομικό καθεστώς τους στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Ταυτόχρονα τροφή για σκύλους με βάση τα λαχανικά ήταν το δείγμα που περιείχε τις περισσότερες ανιχνεύσεις ανάμεσα στα δείγματα. Η τεβουκοναζόλη ήταν το φυτοφάρμακο με το μεγαλύτερο ποσοστό ανίχνευσης (6 τροφές για σκύλους και 3 τροφές γατών) ενώ ταυτόχρονα το χλωροπυρίφος , που είναι μη εγκεκριμένο φυτοφάρμακο βρέθηκε στο μισό πληθυσμό των δειγμάτων , ενώ το φυτοφάρμακο με το υψηλότερο επίπεδο συγκέντρωσης που βρέθηκε ήταν το pirimiphos methyl. Αυτά τα ευρήματα υπογραμμίζουν την ανάγκη για συνεχή παρακολούθηση και ρυθμιστική εποπτεία με σκοπό την διασφάλιση της υγείας των κατοικίδιων. . Ωστόσο λόγω των μεταβολικών διαφορών μεταξύ των ειδών , επηρεάζεται η βιοσυσσώρευση των φυτοφαρμάκων. Οι γάτες φαίνεται να παρουσιάζουν υψηλότερα φορτία οργανικών ρύπων και υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων συγκριτικά με τους σκύλους(165). Παρατηρείται επιπλέον, ότι λίγες έρευνες έχουν γίνει σχετικά με τη μόλυνση των τροφών για ζώα συντροφιάς συγκριτικά με τα παραγωγικά ζώα , αφήνοντας ένα κενό στην κατανόηση της χρόνιας διατροφικής έκθεσης σε αυτό το είδος ζώων(165). Γενικά, αυτές οι δύο κατηγορίες ρύπων , φυτοφάρμακα και μυκοτοξίνες , αποτελούν οι κύριες που υποβάλλονται σε κοινοποιήσεις στο Ευρωπαϊκό Σύστημα Ταχείας Ειδοποίησης για Τρόφιμα και Ζωοτροφές(RASFF)(25).



ΣΧΗΜΑ 6: ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΤΩΝ ΥΠΟΛΕΙΜΜΑΤΩΝ ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΣΤΑ ΑΝΑΛΥΘΕΝΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΤΡΟΦΩΝ ΓΙΑ ΓΑΤΕΣ ΚΑΙ ΣΚΥΛΟΥΣ, ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΤΟΥΣ ΚΑΙ ΤΟ ΝΟΜΙΚΟ ΚΑΘΕΣΤΩΣ ΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΈΝΩΣΗ (158)

2.5.2. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Τα φαρμακευτικά προϊόντα, που μπορεί να αφορούν αντιβιοτικά ή κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα, αποτελούν άλλη μια κατηγορία οργανικών ρύπων που μπορεί να βρεθούν στις ζωοτροφές. Χρησιμοποιούνται για την διαχείριση ή τη θεραπεία διατροφικών ανεπαρειών στα ζώα, τη θεραπεία ή την πρόληψη διαφόρων ασθενειών σε αυτά και την αποκατάσταση/επιδιόρθωση ή τροποποίηση, σωματικών/βιολογικών ή ψυχικών διεργασιών τους. Κατέχουν σημαντικό ρόλο στη διασφάλιση της υγείας και της ευημερίας των ζώων σε ένα ευρύ φάσμα περιβαλλόντων (166). Η χρήση κτηνιατρικών φαρμάκων είναι συνήθης πρακτική. Για παράδειγμα τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στην κτηνοτροφία και την πτηνοτροφία παγκοσμίως (167). Παράλληλα σημαντικές ποσότητες υπολειμμάτων φαρμακευτικών

προϊόντων που προέρχονται από άμεση ή έμμεση μόλυνση μπορούν να ανιχνευθούν στην κοπριά των παραγωγικών ζώων , η οποία συχνά χρησιμοποιείται ως λίπασμα στη γεωργία. Με αποτέλεσμα τα υπολείμματα αυτά να συσσωρεύονται στους ιστούς των καλλιεργειών και να εισέλθουν στην τροφική αλυσίδα που τροφοδοτεί τα ζώα και τους ανθρώπους(168). Η μεταφορά των φαρμάκων συμβαίνει γενικά όταν ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται στην παρασκευή μια φαρμακευτικής τροφής , για την οποία το φάρμακο έχει εγκριθεί και περιλαμβάνεται κατά λάθος σε μια επόμενη παρτίδα μια μη φαρμακευτικής τροφής , διαφορετικής φαρμακευτικής τροφής για την οποία δεν έχει εγκριθεί το συγκεκριμένο σκεύασμα ή τέλος φαρμακευτικής τροφής που να περιέχει το ίδιο φάρμακο με αποτέλεσμα στο τελικό προϊόν να υπάρχει μεγαλύτερη συγκέντρωση φαρμάκου, από αυτό που αναγράφεται στην ετικέτα. Η μεταφορά αυτή μπορεί να συμβεί είτε λόγω χρήσης του ίδιου εξοπλισμού παρασκευής ζωοτροφών , ο ανεπαρκής έλεγχος σκόνης σε ένα μύλο ζωοτροφών , ανεπαρκείς πρακτικές καθαρισμού του εξοπλισμού παρασκευής και διανομής μεταξύ διαδοχικών παρτίδων ζωοτροφών ή τέλος ύπαρξη ανθρώπινου λάθους(169–171). Σε μελέτη από τους Na et. al. ,2022 , που αφορούσε ανάλυση πολλαπλών ρύπων σε δείγματα ζωοτροφών , ανιχνεύτηκαν κτηνιατρικά φάρμακα 8 φορές σε πέντε δείγματα ζωοτροφών με τη φλορφενικόλη και τη φαινακετίνη να ανιχνεύονται περισσότερες από δύο φορές το κάθε ένα(58). Επιπρόσθετα οι Kumar et. al.,2020 , ανίχνευσαν σε δείγματα ζωοτροφών 4 κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία ήταν το Salinomycin, tiamulin, sparfloxacin και norfloxacin(172). Ωστόσο δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα που να αφορούν ζωοτροφές κατοικίδιων.

2.5.3. ΦΥΤΙΚΕΣ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

Όπως οι μύκητες μπορούν να επιμολύνουν τις πρώτες ύλες των ζωοτροφών , παράγοντας τοξικούς δευτερογενείς μεταβολίτες , έτσι και τα ίδια τα φυτά που μπορεί να περιέχονται στις πρώτες ύλες των ζωοτροφών μπορούν να παράγουν μια σειρά από δευτερογενείς μεταβολίτες , πολλοί από τους οποίους μπορούν να γίνουν ανεπιθύμητοι ρύποι στην αλυσίδα των ζωοτροφών(173). Τα περισσότερα φυτικά υλικά που χρησιμοποιούνται ως ζωοτροφές μπορούν να περιέχουν αυτές τις φυσικές ουσίες που μπορούν να είναι τοξικές για τα ζώα

υπό ορισμένες συνθήκες (174). Οι φυτικές τοξίνες παρουσιάζουν οξεία ή χρόνια τοξικότητα ή έχουν μη θρεπτικές επιδράσεις. Λειτουργούν ως άμυνα για την προστασία του φυτού από φυτοφάγα ζώα ,βακτήρια και μύκητες(175). Παραδείγματα φυτικών τοξινών σε τρόφιμα και ζωοτροφές είναι τα γλυκαλοειδή στις πατάτες, οι κυανογλυκοσίδες στην μανιόκα και τα γλυκοσινολικά σε είδη της οικογένειας Brassicaceae. Ταυτόχρονα τα αρωματικά φυτά που χρησιμοποιούνται ως πρόσθετα συστατικά των ζωοτροφών όπως μπαχαρικά ή χρησιμοποιούνται παραδοσιακά ως φυτικά φαρμακευτικά προϊόντα, αποτελούν προϊόντα τα οποία μπορεί να περιέχουν μεγάλες ποσότητες φυτοτοξινών(176–178). Όσον αφορά τα φυτικά φάρμακα οι φυτοτοξίνες μπορεί να έχουν και οφέλη για την υγεία , ωστόσο ανάλογα με την χορηγούμενη δόση μπορεί να έχουν και αρνητικές συνέπειες(175). Δεδομένα ωστόσο που να αφορούν την τοξικότητα και τα επιτρεπόμενα όρια στις ζωοτροφές των κατοικιδίων δεν έχουν βρεθεί. Μερικές από τις κατηγορίες τοξινών που παράγονται από τα φυτά είναι :

- **Πυρρολιζιδινικά αλκαλοειδή (PA)** : αποτελούν μονο-, δι- ή μακροκυκλικοί διεστέρες των βάσεων της νεκίνης ή οτονεκίνης. Μπορούν να εμφανιστούν και ως N-οξείδια. Υπάρχουν πάνω από 350 είδη PA σε περισσότερα από 6000 είδη φυτών. Για τα ζώα μπορούν να είναι τοξικά για το ήπαρ , πιθανά καρκινογόνα και γενοτοξικά(179–181)
- **Σαπωνίνες:** ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που βρίσκονται σε περισσότερες από 100 οικογένειες φυτών. Μπορούν να έχουν αντιθρεπτικές δράσεις , τοξικές επιδράσεις ένα είναι παρούσες σε τρόφιμα ή ζωοτροφές. Ωστόσο μπορούν να έχουν και ευεργετικές δράσεις. Μπορούν να βρεθούν σε σημαντικές συγκεντρώσεις σε φυτά που χρησιμοποιούνται στις ζωοτροφές όπως τα είδη *Madhuca* , τη σόγια , την κινόα και τη ζαχαρότευτλα(179).
- **Γλυκοσινολάτες:** αποτελούν εστέρες αλκυλ-αλδοξίμης -ο-θειικού άλατος με β-θειγλυκοπυρανοσίδη. Ανήκουν στην οικογένεια των Brassicaceae. Πολλά λαχανικά όπως το μπρόκολο , τα λαχανάκια βρυξελλών , το λάχανο και το κουνουπίδι ανήκουν σε αυτά τα είδη(182). Όταν τα φυτά του είδους αυτού υποστούν καταστροφή , όπως μέσω της

μάσησης , οι μυροσινάσες απελευθερώνονται και μετατρέπουν την γλυκοσινολάτες σε παράγωγα όπως τα θειοκυανικά , νιτριλικά ή ισοθειοκυανικά(182). Οι βιολογικές επιδράσεις των γλυκοσινολατών στα θηλαστικά είδη σχετίζονται κυρίως με τα προϊόντα διάσπασης. Μπορεί οι επιδράσεις αυτές να είναι τοξικές , όπως να επηρεάσουν την λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος, αντιθρεπτικές ιδιότητες. Βέβαια ανάλογα με τη δομή τους μπορεί να έχουν και ευεργετικές ιδιότητες(179).

- **Κυανογλυκοσίδες** : περιλαμβάνουν ενώσεις όπως η αμυγδαλίνη , δουρίνη ,λιναμαρίνη, λιναστατίνη, λοταυστατίνη ,νεολιναστατίνη, προυνασίνη και σαμπουινγκρίνη. Το υδροκυάνιο (HCN) , μπορεί να είναι παράγωγο αυτών των ενώσεων. Η απελευθέρωση αυτού με ενζυμική υδρόλυση. Μπορεί να συμβεί μέσω διαδικασιών επεξεργασίας των τροφίμων , μέσω καταστροφής αυτών , όπως η μάσηση γιατί απελευθερώνεται το ένζυμο που καταλύει την παραγωγή υδροκυανίου ή στο γαστρεντερικό σωλήνα με επίδραση μικροοργανισμών. Η υδρόλυση αυτή πέρα από το HCN , έχει επιπλέον ως παραπροϊόντα γλυκόζη ,κετόνες ή βενζαλδεΐδη (182).Μπορούν να βρεθούν φυσικά σε πολλά κοινά συστατικά ζωοτροφών όπως το σόργο , η μανιόκα , ο λιναρόσπορος και σε διάφορα όσπρια. Όσον αφορά τις αρνητικές επιδράσεις που μπορεί να έχουν , η απελευθέρωση του υδροκυανίου ή του ανιόντος κυανίου , μπορεί να οδηγήσει σε οξεία θανατηφόρα δηλητηρίαση σε όλα τα είδη ζώων. Ωστόσο συχνότερα παρατηρούνται χρόνιες δηλητηριάσεις με χαρακτηριστικά όπως καθυστέρηση της ανάπτυξης και νευρολογικά συμπτώματα(179).
- **Γλυκοαλκαλοειδή (GA)** : βιοσυντίθενται από φυτά της οικογένειας Solanaceae λειτουργώντας κυρίως αμυντικά απέναντι στα φυτοφάγα έντομα. Η πατάτα που περιέχει α-χακονίνη & α-σολανίνη , η μελιτζάνα που παράγει α-σολαμαργίνη και η ντομάτα που παράγει α-τοματίνη αποτελούν τα πιο σημαντικά μέλη αυτής της κατηγορίας(183). Η α-χακονίνη μπορεί να προκαλέσει κυτταρική διαταραχή, βλάβη σε όργανα και τερατογόνες επιδράσεις στα έμβρυα(181).

2.6. ΝΟΜΟΘΕΤΙΚΑ ΠΛΑΙΣΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΣΤΙΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ

Λόγω της σημαντικής επίδρασης των μυκοτοξινών ,διάφοροι διεθνείς οργανισμοί μεταξύ των οποίων η Ευρωπαϊκή επιτροπή (ΕΕ)(184) , η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων των Ηνωμένων πολιτειών (FDA)(185) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO)(186) , έχουν θεσπίσει ρυθμιστικά όρια για τα επιτρεπόμενα επίπεδα μυκοτοξινών στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές (121). Η Ευρωπαϊκή αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA) και το Σύστημα Ταχείας Ειδοποίησης για τα Τρόφιμα και τις Ζωοτροφές (RASFF) , παρακολουθούν τακτικά την μόλυνση των τροφίμων και των ζωοτροφών σε ευρωπαϊκό επίπεδο , αξιολογώντας τους πιθανούς κινδύνους που θα μπορούσαν να απειλήσουν την υγεία των καταναλωτών (6,31,63–66,121). Σε αντίθεση με τα ζώα εκτροφής , στις περισσότερες περιπτώσεις δεν υπάρχει ξεχωριστή κατηγορία για τις πλήρεις ζωοτροφές κατοικίδιων , οπότε αυτές συμμορφώνονται γενικά με τα πρότυπα όρια για τις πλήρεις ζωοτροφές. Όσον αφορά τις μυκοτοξίνες και τον έλεγχο αυτών στην ΕΕ , μόνο η AFB1 , υπάγεται στο νομοθετικό πλαίσιο της οδηγίας 2002/32/EC που αφορά τις ανεπιθύμητες ουσίες στις ζωοτροφές. Η Οδηγία δεν προβλέπει ξεχωριστή κατηγορία για τις τροφές κατοικίδιων· οι σκύλοι και γάτες εμπίπτουν στη γενική κατηγορία «συμπληρωματικές και πλήρεις ζωοτροφές», για την οποία θεσπίζεται μέγιστο επίπεδο 0,01 mg/kg (σε ζωοτροφή με υγρασία 12%). Όσον αφορά τις DON ,ZEA, FUMs και OTA , υπάρχει νομοθετική δέσμευση ωστόσο αντιμετωπίζονται μέσω συστάσεων. Οι συστάσεις που υπάρχουν έως σήμερα είναι σύσταση της επιτροπής 2006/576/EK , σχετικά με την παρουσία δεσοξυनिβαλενόλης, ζεαραλενόνης, ωχρατοξίνης Α ,T-2/HT-2 και φουμονισινών σε προϊόντα που προορίζονται για ζωοτροφές. Μετέπειτα το 2013 τροποποιήθηκε η υπάρχουσα σύσταση , στην σύσταση 2013/637/EE σχετικά με τις τοξίνες T-2/HT-2 σε σύνθετες τροφές για γάτες. Ταυτόχρονα η σύσταση του 2006 ξανά τροποποιήθηκε το 2016 , και δημιουργήθηκε η σύσταση 2016/1319/EE , όσο αφορά την παρουσία δεσοξυनिβαλενόλης, ζεαραλενόνης, ωχρατοξίνης Α σε ζωοτροφές για ζώα συντροφιάς (187–190). Όσον αφορά τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων , όπως αναφέρθηκε ο κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 396/2005(191).

Βέβαια, ο κανονισμός αυτός ορίζει τα ανώτατα όρια για ζωοτροφές που προορίζονται για παραγωγικά ζώα , ενώ οι συνθέσεις των ζωοτροφών για κατοικίδια διαφέρουν σημαντικά. Τέλος στην οδηγία 2002/32/EC , αναφέρονται όρια που αφορούν όλες τις ζωοτροφές για σπόρους ζιζανίων και μη αλεσμένα ή θραυσμένα σπέρματα που περιέχουν αλκαλοειδή, γλυκοζίτες ή άλλες τοξικές ουσίες, μεμονωμένα. Παρά τις δεκαετίες ρύθμισης, η εμφάνιση μυκοτοξινών στις καλλιέργειες και σε όλη την αλυσίδα παραγωγής τροφίμων παραμένει μια επίμονη πρόκληση για την ασφάλεια των τροφίμων , κυριότερα λόγω της συχνής συνύπαρξης πολλαπλών μυκοτοξινών σε μεμονωμένα προϊόντα. Ωστόσο τα νομοθετικά πλαίσια , αφορούν τον έλεγχο μεμονωμένων των τοξινών χωρίς να ληφθεί υπόψιν ότι συνύπαρξη μυκοτοξινών ακόμη και σε χαμηλές συγκεντρώσεις μπορεί να αποτελέσει πρόβλημα στην υγεία των ζώων , λόγω προσθετικών , συνεργιστικών ή ανταγωνιστικών δράσεων μεταξύ των μυκοτοξινών(149,192). Στον παρακάτω ΠΙΝΑΚΑ 3 , φαίνονται συγκεντρωτικά οι τιμές των ορίων για τις μυκοτοξίνες στις ζωοτροφές σκύλου γάτας , οι οποίες προκύπτουν από τις οδηγίες της ΕΕ

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΤΙΚΟΣ ΠΙΝΑΚΑΣ ΤΙΜΩΝ ΔΡΑΣΕΩΝ ΤΩΝ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΑΠΟ ΤΗΝ ΕΕ

	DON(ρ ρμ)	ΖΕΑ(ρ ρμ)	ΟΤs(ρ ρμ)	T-2/HT- 2(ρρμ)	Aflat oxin B1	FU Ms
Σύνθετες ζωοτροφές για γάτες-εκτός αναπαραγωγής	5	0.2	0.01	0.05	0.01	5
Σύνθετες ζωοτροφές για γάτες-για αναπαραγωγή	5	0.1	0.01	0.05	0.01	5
Σύνθετες ζωοτροφές για γάτες-γατάκια	5	0.1	0,01	0.05	0.01	5
Σύνθετες ζωοτροφές για σκύλους-εκτός αναπαραγωγής	2	0.2	0.01	-	0.01	5
Σύνθετες ζωοτροφές για σκύλους-για αναπαραγωγή	2	0.1	0.01	-	0.01	5
Σύνθετες ζωοτροφές για σκύλους-κουτάβια	2	0.1	0.01	-	0.01	5

3. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΡΥΠΩΝ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ

3.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ ΣΤΗΝ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ΚΑΙ ΑΛΛΩΝ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΡΥΠΩΝ

Παρόλη τη συστηματική παρακολούθηση των μυκοτοξινών στα τρόφιμα , περιορισμένες παραμένουν οι πληροφορίες σχετικά με την παρουσία τους στις ζωοτροφές , ενώ η πληθώρα των μελετών που έχει πραγματοποιηθεί αφορά ζωοτροφές για την κτηνοτροφία (67,68,72). Ταυτόχρονα ακόμη λιγότερες έρευνες έχουν εξετάσει διεξοδικά την ταυτόχρονη παρουσία φυτοφαρμάκων, φαρμακευτικών προϊόντων και δευτερογενών μεταβολιτών στις τροφές ζώων συντροφιάς. Γενικά οι τεχνικές φασματομετρίας μάζας σε συνδυασμό με Αέρια Χρωματογραφία (GC) ή Υγρή Χρωματογραφία (LC) κατέχουν κυρίαρχο ρόλο στην προώθηση της ανάλυσης πολλαπλών υπολειμμάτων(67). Με την ανακάλυψη των πρώτων μυκοτοξινών , έχουν δοκιμαστεί πολλές διαφορετικές μέθοδοι ανάλυσης που αφορούν την παρουσία μυκοτοξινών σε ζωοτροφές. Κυρίαρχες είναι οι χρωματογραφικές τεχνικές , κυριότερα γιατί μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολλοί διαφορετικοί τύποι χρωματογραφίας όπως Χρωματογραφία Λεπτής Στιβάδας (TLC), Αέρια Χρωματογραφία (GC) ή Υγρή Χρωματογραφία (LC) σε συνδυασμό με διάφορους ανιχνευτές(193–195). Επιπλέον , χρήσιμες τεχνικές είναι οι μέθοδοι ανοσοδοκιμασίας (ELISA ή LFIA) και οι βιοαισθητήρες , αν κριθεί αναγκαία η ταχεία ανάλυση μυκοτοξινών (196–198). Τις τελευταίες δεκαετίες έχουν βελτιωθεί οι αναλυτικές μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση μυκοτοξινών , ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα ng/g σε ευρεία γκάμα τροφίμων(67,199.) Όσον αφορά την υγρή χρωματογραφία , τα τελευταία χρόνια σημειώνονται βελτιώσεις σχετικά με την τεχνική της. Οι βελτιώσεις αφορούν αρχικά την ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (UHPLC) , με την οποία υπάρχουν μεγαλύτερες αποδόσεις στις κορυφές και μικρότερο χρόνο χρωματογραφικής ανάλυσης. Επιπλέον η χρήση φασματομετρίας μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS) ,

όπως οι αναλυτές μάζας Orbitrap είναι αυξανόμενη στον τομέα της τοξικολογίας των τροφίμων. Οι αναλυτές HRMS παρουσιάζουν εξαιρετική ειδικότητα και υψηλή ανάλυση, η οποία αποδίδεται στην υψηλή ακρίβεια μάζας και στις δυνατότητες διασαφήνισης της δομής που παρέχει η απόκτηση MS/MS (67,169,200,201). Οπότε η χρήση αναλυτικών τεχνικών που επιτρέπουν την ταυτόχρονη ανίχνευση εκατοντάδων ρύπων διαφορετικών κατηγοριών, μπορεί να παρέχει περισσότερες πληροφορίες για την αξιολόγηση της συμμόρφωσης με τους ισχύοντες κανονισμούς καθώς και τη διασφάλιση της ασφάλειας των τροφίμων, ιδίως όταν η έκθεση στους ρύπους είναι μακροχρόνια. Οι αναλυτικές τεχνικές που βασίζονται στην υγρή χρωματογραφία και την φασματομετρία μάζας (LC-MS/MS) φτάνουν σε ένα εύρος 300-400 αναλυτών/μέθοδο. Οπότε η χρήση της υγρής χρωματογραφίας υψηλής ανάλυσης φασματομετρίας μάζας (LC-HRMS), με σκοπό τη διαλογή ενός ευρέος φάσματος ενώσεων, αποτελεί βασική επιλογή έναντι στις παραδοσιακές μεθόδους LC-MS/MS. Επιπλέον, λόγω της υψηλής ανάλυσης αυτής της τεχνικής με ακρίβεια στον υπολογισμό της μάζας, είναι πιο εύκολο να ταυτοποιηθούν ενώσεις παρόμοιου μοριακού βάρους ή ισοβαρικών προϊόντων που μπορεί να υπάρχουν το ίδιο εκχύλισμα. Στη μελέτη αυτή, εφαρμόστηκε μια διαδικασία σάρωσης ύποπτων ουσιών με LC-HRMS σε εμπορικά διαθέσιμες τροφές κατοικιδίων (σκύλου και γάτας), με σκοπό τον εντοπισμό και τον χαρακτηρισμό μια πληθώρας οργανικών ρύπων.

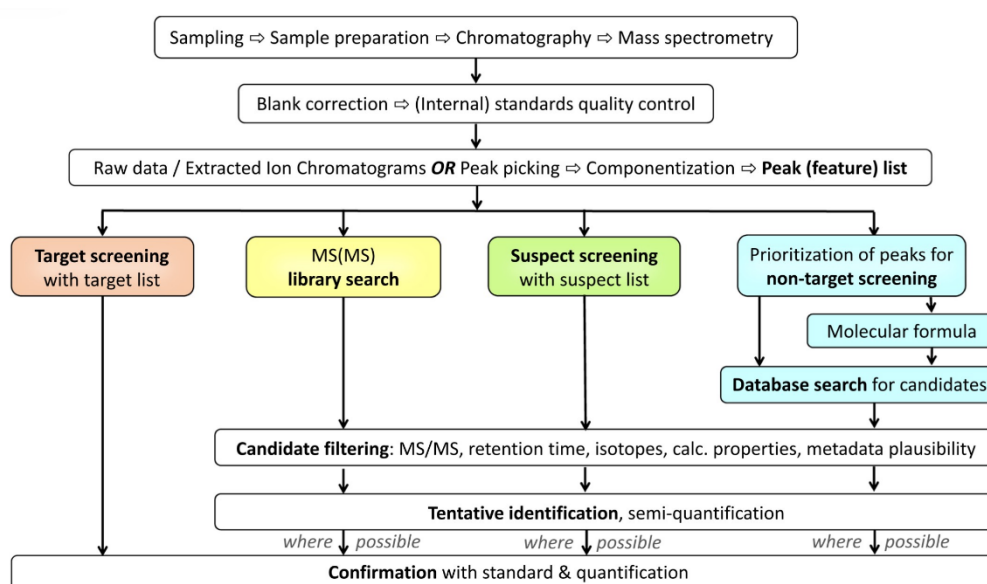
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΠΟΚΤΗΣΗΣ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΥΨΗΛΗΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ (HRMS) -ΒΑΣΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΣΑΡΩΣΗΣ ΥΠΟΠΤΩΝ ΚΑΙ ΜΗ-ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (NTS)

Οι τρέχουσες μέθοδοι παρακολούθησης είναι σε θέση να ανιχνεύσουν μόνο ένα μικρό σύνολο από τις χημικές ουσίες που προυπάρχουν ή παράγονται εκ νέου, ενώ συχνά καθορίζονται από απαιτήσεις παρακολούθησης που σχετίζονται με ρυθμιστικά πλαίσια ή άλλες μεθόδους διαχείρισης χημικών ουσιών. Βελτιώσεις όσον αφορά την ευαισθησία, την επιλεκτικότητα και τη λειτουργία των

αναλυτικών οργάνων συνδυαστικά με πρόσφατες εξελίξεις στην ανάπτυξη λογισμικού με σκοπό την επεξεργασία και την αξιολόγηση δεδομένων έχουν δώσει το χώρο για την ανάπτυξη μεθόδων σάρωσης ύποπτων και μη στοχευμένων ενώσεων (NTS), οπότε και πληθώρα οργανικών ενώσεων και προϊόντων μετασχηματισμού τους (TPs) καθώς και ορισμένων οργανομεταλλικών ενώσεων. Προσφέροντας έτσι τον αναδρομικό έλεγχο και την έγκαιρη προειδοποίηση για την ύπαρξη αναδυόμενων ρύπων χωρίς την ανάγκη χρήσης προτύπων ενώσεων ή την επιλογή των ενώσεων προς διερεύνηση (202). Η φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS) χρησιμοποιείται ευρέως όσον αφορά την ανίχνευση και ταυτοποίηση πολύπλοκων οργανικών ρύπων σε σύνθετες μήτρες καθιστώντας την πλέον βασικό εργαλείο στην ανάλυση πολλαπλών οργανικών ρύπων. Η HRMS , επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση ιόντων σε λειτουργία πλήρους σάρωσης με υψηλή ανάλυση μάζας με αναλογία μάζας/διαφορά μάζας ≥ 20.000 και υψηλή ακρίβεια μάζας με απόκλιση μάζας $\leq 5\text{ppm}$. Με αύξηση της ανάλυσης επιτρέπεται ο διαχωρισμός των παρεμβολών και ορισμένες φορές μειώνεται η ανάγκη προετοιμασίας δειγμάτων , ενώ η αύξηση της ακρίβειας μάζας μειώνει τον αριθμό των πιθανών υποψήφιων για μια μάζα που παρουσιάζει ενδιαφέρον. Για την αποσαφήνιση των δομών άγνωστων ενώσεων δύο σύνολα φασματομετρικών οργάνων είναι κατάλληλα όπως οι αναλυτές μάζας TOF και Orbitrap και υβριδικοί αναλυτές μάζας , συμπεριλαμβανομένων οργάνων τετραπολικού TOF και γραμμικής παγίδας ιόντων (LTQ-Orbitrap) ή τετραπολικού Orbitrap (Q-Exactive)(202,203). Έτσι καλύπτεται ένα μεγάλο εύρος φάσματος χημικών ενώσεων και γίνεται έγκαιρα η ανίχνευση πιθανών αναδυόμενων ρύπων με αξιοπιστία(203). Οι μέθοδοι NTS είναι πιο γενικές και συνήθως περιλαμβάνουν περιορισμένη επεξεργασία δειγμάτων και διαχωρισμό σε ένα ευρύ φάσμα υδροφοβικότητας με σκοπό την εξασφάλιση της απόδοσης και την συλλογή όσο δυνατό περισσότερων ενώσεων. Για στερεά δείγματα , όπως και οι ζωοτροφές συνίσταται η εκχύλιση συνήθως με οργανικούς διαλύτες όπως η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο για την υγρή χρωματογραφία. Γενικά στις μεθόδους NTS είναι απαραίτητο να υπάρχει καλή εικόνα σχετικά με την κάλυψη του πεδίου των ενώσεων. Στο πλαίσιο αυτών των τεχνικών , η NORMAN κοινότητα προτείνει κατευθυντήριες οδηγίες που

περιγράφουν την δομημένη εφαρμογή ροών εργασίας σάρωσης ύποπτων και μη στοχευμένων ενώσεων (suspect και non-target screening , NTS), για οργανικούς ρύπους δίνοντας προσοχή στην ορθή χρήση λιστών ύποπτων ενώσεων , στην ερμηνεία των φασματικών δεδομένων και στη διαχείριση της ποιότητας των αποτελεσμάτων με σκοπό την εξασφάλιση της αξιοπιστίας στην ταυτοποίηση των ενώσεων(202,204). Τα μέλη της NORMAN κοινότητας που ασχολούνται με δραστηριότητες NTS έχουν εκπονήσει έγγραφο καθοδήγησης που να αφορά τις NTS τεχνικές με σκοπό την υποστήριξη επιστημονικών, εμπορικών και κυβερνητικών εργαστηρίων για τη διεξαγωγή της υψηλής ποιότητας μελετών NTS. Η γενική ροή των εργασιών για τον έλεγχο στόχων ,βιβλιοθηκών ,υπόπτων και μη στόχων των δεδομένων φασματομετρίας μάζας που αποκτήθηκαν με τη χρήση μεθόδων τεχνικών σάρωσης υπόπτων και μη-στοχευμένων ενώσεων φαίνεται στο ΣΧΗΜΑ 8. Επιπλέον για την ερμηνεία και ιεράρχηση των αποτελεσμάτων , η σύγχρονη βιβλιογραφία προτείνει την εφαρμογή συστημάτων βαθμίδων εμπιστοσύνης ταυτοποίησης , όπως το σύστημα Schymanski , το οποίο επιτρέπει την διαβάθμιση των αποτελεσμάτων από απλή μοριακή πρόταση σε επιβεβαιωμένη ταυτοποίηση με πρότυπο αναφοράς(203,205). Η προσέγγιση αυτή σε ροές εργασίας σάρωσης ύποπτων και μη στοχευμένων ενώσεων είναι πολύτιμη αφού δεν είναι πάντα δυνατό να επιβεβαιωθούν όλες οι ενώσεις (202,205). Στη διεθνή βιβλιογραφία οι ροές εργασίας σάρωσης ύποπτων και μη στοχευμένων ενώσεων περιγράφονται ως το «τελευταίο σύνορο» στην περιβαλλοντική ανάλυση και ανάλυση τροφίμων με σκοπό την ανακάλυψη , δομική ερμηνεία και ιεράρχηση νέων ή αναδυόμενων ρύπων(203). LC-HRMS μελέτες με συνδυαστική χρήση QuEChERS εκχύλισης και χρήση ροών εργασίας σάρωσης ύποπτων ενώσεων σε πολύπλοκες μήτρες ζωοτροφών και τροφίμων, έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα αποτελεσματική για ανάλυση πολλαπλών υπολειμμάτων στα αναλυόμενα δείγματα(206,207). Σε ζωοτροφές ιχθυοκαλλιέργειας , η εφαρμογή του συνδυασμού στοχευμένης ανάλυσης και σάρωσης ύποπτων ενώσεων με χρήση της UHPLC-HRMS επέτρεψε τον ταυτόχρονο προσδιορισμό μυκοτοξινών και πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων. Αναδεικνύοντας έτσι, τη χρησιμότητα των HRMS-βασισμένων ροών εργασίας για την πολυπαραμετρική επιτήρηση ζωοτροφών(169,208). Αντίστοιχα μελέτες σε

τρόφιμα ανέδειξαν ότι η χρήση UHPLC-Q-Orbitrap HRMS , επιτρέπει στο ίδιο σύνολο δεδομένων στη στοχευμένη ποσοτική ανάλυση και την διερεύνηση πρόσθετων ρύπων και μεταβολιτών (206). Συνεπώς , η ολοκληρωμένη επεξεργασία και ερμηνεία δεδομένων HRMS αποτελεί κρίσιμο στάδιο των ρών εργασίας σάρωσης ύποπτων και μη στοχευμένων ενώσεων , ενισχύοντας τον ρόλο της HRMS , ως εργαλείο χαρτογράφησης του χημικού προφίλ διαφόρων δειγμάτων(202,204).



ΣΧΗΜΑ 7: ΓΕΝΙΚΗ ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΛΕΓΧΟ ΣΤΟΧΩΝ, ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΩΝ, ΥΠΟΠΤΩΝ ΚΑΙ ΜΗ ΣΤΟΧΩΝ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΑΣ ΠΟΥ ΑΠΟΚΤΗΘΗΚΑΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΜΗ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ(201)

3.3. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ

Η υγρή χρωματογραφία (LC) ,αποτελεί μια τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού πολικών , μη πτητικών ή θερμικά ασταθών ενώσεων που δεν είναι εφικτό να αναλυθούν απευθείας με αέρια χρωματογραφία(209). Στην τεχνική αυτή ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται λόγω της συνάφειας των ουσιών σε μια στατική φάση και σε μια υγρή κινητή φάση. Οι ενώσεις δηλαδή, κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων και μετακινούνται(κινητή φάση) με διαφορετικές

ταχύτητες. Οπότε ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται χάρη στον διαφορετικό χρόνο έκλυσης, ανάλογα με την αλληλεπίδραση του κάθε συστατικού με την κινητή φάση. Η αλληλεπίδραση αυτή επηρεάζεται από το σχήμα, το μέγεθος και την πυκνότητα του φορτίου των σωματιδίων στο διάλυμα. Η έκλυση των ενώσεων προς ανάλυση μπορεί να είναι ισοκρατική ή βαθμωτή. Κατά την ισοκρατική έκλυση είναι σταθερή η σύσταση της κινητής φάσης κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Συγκριτικά με τη βαθμωτή, είναι δυνατή η ανάλυση μεγάλου αριθμού δειγμάτων σε χαμηλότερο κόστος. Ωστόσο με την ισοκρατική έκλυση δεν εξασφαλίζεται ο διαχωρισμός ενώσεων με παρόμοια δομή και ιδιότητες οπότε δεν είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική για δείγματα με πολλούς αναλύτες(210). Αντίθετα στη βαθμωτή έκλυση αναμιγνύεται ένας ασθενής διαλύτης με έναν ισχυρό σε αναλογία που αλλάζει παροδικά με το χρόνο, με σκοπό να επιτευχθεί καλύτερος διαχωρισμός(210,211). Ωστόσο επιλέγεται διαλύτης για την κινητή φάση με πολικότητα διαφορετική από την στατική.

Τα κυριότερα είδη χρωματογραφίας ανάλογα με την αρχή στην οποία στηρίζονται είναι :

- Χρωματογραφία κατανομής (Partition chromatography)
- Χρωματογραφία προσρόφησης (Adsorption Chromatography)
- Χρωματογραφία ιονανταλλαγής (Ion exchange chromatography)
- Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους ή Διάχυσης Πηκτής (Size Exclusion, SEC ή Gel Permeation Chromatography, GPC)

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), αποτελεί τη σημαντικότερη εξέλιξη της χρωματογραφικής ανάλυσης(210)Κ. Πλεονεκτήματα αυτής αποτελούν η ταχύτητα, η εξειδίκευση, η μεγάλη ευαισθησία και η ικανότητα ανίχνευσης χαμηλών συγκεντρώσεων, ενώ η λειτουργία της σε χαμηλές θερμοκρασίες καθιστά εφικτή την ανάλυση θερμικά ασταθών ουσιών όπως πρωτεΐνες και νουκλεοτίδια (210,212).Ο συνδυασμός της υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας σε σειρά (MS/MS) ή αναλυτή μάζας υψηλής ανάλυσης(HRMS), όπως ο TOF ή Orbitrap αποτελεί την πιο συνηθισμένη τεχνική σύζευξης στην ρουτίνα ανάλυσης(213).

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΤΗΛΕΣ

Οι στήλες που χρησιμοποιούνται στην υγρή χρωματογραφία είναι κατασκευασμένες από σωλήνες ανοξείδωτου χάλυβα , μικρής διαμέτρου (4-10mm) ευθύγραμμες με μήκος 5-150cm και το πληρωτικό υλικό έχει μέγεθος σωματιδίων ίσο με 5 ή 10 μm. Τα υλικά πληρώσεως μπορεί να είναι σφαιροειδή ή πορώδη και στην επιφάνεια αυτών εναποτίθεται ένα λεπτό πορώδες στρώμα από αλούμινα , διοξείδιο του πυριτίου και συνθετική ή ιοντοανταλλακτική ρητίνη (211). Η επιλογή της αναλυτικής στήλης είναι σημαντικό κομμάτι , για τον επιτυχή διαχωρισμό των ενώσεων. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιλογή της στήλης είναι οι εξής:

- Το μέγεθος των μορίων του υλικού πληρώσεως
- Τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά της στήλης
- Η φύση του υποστρώματος
- Η εκλεκτικότητα της στατικής φάσης
- Η διάμετρος των πόρων του πληρωτικού υλικού
- Η περιεκτικότητα της στήλης σε ελεύθερα σιλανολικά υδροξύλια

Τέλος οι στήλες μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ανάλογα με την εσωτερική διάμετρο τους , σε συμβατικές στήλες , στήλες στενού διαμετρήματος και τριχοειδής στήλες(210).

ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ

Ο διαχωρισμός , ταυτοποίηση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυόμενων οργανικών μικρο-ρύπων που προηγουμένως έχουν απομονωθεί από ένα υπόστρωμα επιτυγχάνεται συνήθως με τεχνικές υγρής ή αέριας χρωματογραφίας , σε συνδυασμό με τη χρήση ειδικών ανιχνευτών . Οι ανιχνευτές αυτοί είναι τοποθετημένοι στο τέλος της στήλης , από την οποία εξέρχονται οι προς ανάλυση ενώσεις. Ωστόσο οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται θα πρέπει να πληρούν τις παρακάτω προϋποθέσεις:

- Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής

- Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής
- Χαμηλό επίπεδο θορύβου
- Μικρός χρόνος απόκρισης
- Μικρός νεκρός όγκος
- Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων
- Ευελιξία στις μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης
- Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση
- Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος

Ο συνδυασμός ωστόσο της υγρής χρωματογραφίας με την χρήση αναλυτών φάσματος μάζας αποτελεί την πιο εξελιγμένη τεχνική διαχωρισμού και προσδιορισμού για την ανάλυση οργανικών ρύπων.

3.4. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ

Η ικανότητα της υγρής χρωματογραφίας να διαχωρίζει τα συστατικά ενός μείγματος και η ικανότητα της φασματομετρίας μάζας να τα ταυτοποιεί συνδυάζονται με αποτέλεσμα τη σύζευξη της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας (LC-MS)(214). Λόγω του μεγάλου αριθμού ενώσεων με παρόμοιους χρόνους κατακράτησης αλλά και ορισμένες φορές του παρόμοιου μοριακού βάρους αυτού είναι δύσκολη η ταυτοποίηση με ακρίβεια ορισμένων ενώσεων με χρήση ανιχνευτών απορρόφησης ή φθορισμού. Παράλληλα η LC, σε πολύπλοκα υποστρώματα μπορεί να μη διαχωρίσει πλήρως τα συστατικά οπότε ο ποσοτικός προσδιορισμός να μην είναι αξιόπιστος λόγω αλληλοεπικάλυψης των σημάτων στο χρωματογράφημα. Την λύση για να ταυτοποιηθούν ενώσεις με αξιοπιστία δίνει η φασματομετρία μάζας, αφού για κάθε ένωση το φάσμα μάζας της είναι μοναδικό. Ωστόσο πριν ανάλυση με χρήση φάσματος μάζας πρέπει να προηγηθεί διαχωρισμός των συστατικών. Έτσι διευκολύνεται η ανάλυση, καθώς χωρίς να έχουν διαχωριστεί τα συστατικά ενός δείγματος μπορεί στο φάσμα να περιέχονται και ιόντα από τα υπόλοιπα συστατικά και να είναι δυσκολότερη η ανάλυση. Ειδικότερα αν οι προς ποσοτικοποίηση συγκεντρώσεις είναι πολύ

χαμηλές , τότε χωρίς διαχωρισμό ο προσδιορισμός είναι αδύνατος(214). Ως εκ τούτου η σύζευξη δύο τεχνικών επιτρέπει την απευθείας εισαγωγή των χρωματογραφικά διαχωρισμένων συστατικών ενός μίγματος στο φασματομέτρο μάζας εξασφαλίζοντας αξιόπιστη και επιλεκτική ταυτοποίηση ακόμη και σε περιπτώσεις που δεν έχει γίνει πλήρως ο διαχωρισμός, δεδομένου ότι οι ενώσεις με διαφορετικούς χρόνους κατακράτησης αποδίδουν διακριτά φάσματα μάζας. Επιπροσθέτως η αυξημένη εκλεκτικότητα και αναλυτική ακρίβεια που επιτυγχάνεται μέσω της παρακολούθησης χαρακτηριστικών ιόντων SIM ή επιλεγμένων ιόντων SRM και MRM σε εφαρμογές φασματομετρίας μάζας διπλού σταδίου (MS/MS) ενισχύει την αξιοπιστία και την ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού.

3.4.1. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΙΟΝΙΣΜΟΥ

Ανεξάρτητα από το όργανο που χρησιμοποιείται , το πρώτο βήμα στη φασματομετρία μάζας είναι η δημιουργία ιόντων(215). Αποτελεί καθοριστικό βήμα για τη μέτρηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Οι τεχνικές ιοντισμού που χρησιμοποιούνται στη μοριακή φασματομετρία μαζών διακρίνονται στις πηγές αέριας φάσης και τις πηγές εκρόφησης. Στην πρώτη κατηγορία το δείγμα που αναλύεται πρώτα εξαερώνεται και έπειτα ιοντίζεται ενώ στη δεύτερη το δείγμα απορροφά ενέργεια από μια πηγή και τα μόρια εκροφώνται και μετατρέπονται απευθείας σε ιόντα που βρίσκονται σε αέρια φάση. Οι τεχνικές ιοντισμού επιπλέον, χωρίζονται σε μαλακές και σκληρές , και η μορφή του φάσματος που λαμβάνεται εξαρτάται από αυτές. Στις σκληρές τεχνικές μεταδίδεται μεγάλη ποσότητα ενέργειας στα μόρια του αναλύτη , οπότε βρίσκονται σε διεγερμένη κατάσταση. Με αποδιέγερση αυτών σπάνε οι δεσμοί και δημιουργούνται θυγατρικά ιόντα με λόγο m/z μικρότερο από το μοριακό ιόν. Στις μαλακές τεχνικές ο ιοντισμός επιτυγχάνεται με πιο ήπιες συνθήκες οπότε υπάρχει περιορισμένη θραύση των μορίων του αναλύτη. Στο παραγόμενο φάσμα παρατηρείται μια κύρια κορυφή , του μοριακού ιόντος, και ένα μικρό πλήθος επιπλέον κορυφών που αντιστοιχούν σε προϊόντα θραύσης. Στο φάσμα που προέρχεται από σκληρή τεχνική ιοντισμού παρέχει πολλές κορυφές , παρέχοντας χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τα είδη των δραστικών ομάδων και επομένως

για τη δομή του αναλύτη. Από την άλλη πλευρά ένα φάσμα μαλακού ιοντισμού παρέχει ακριβείς πληροφορίες ως προς το μοριακό βάρος των μορίων του αναλύτη(216).

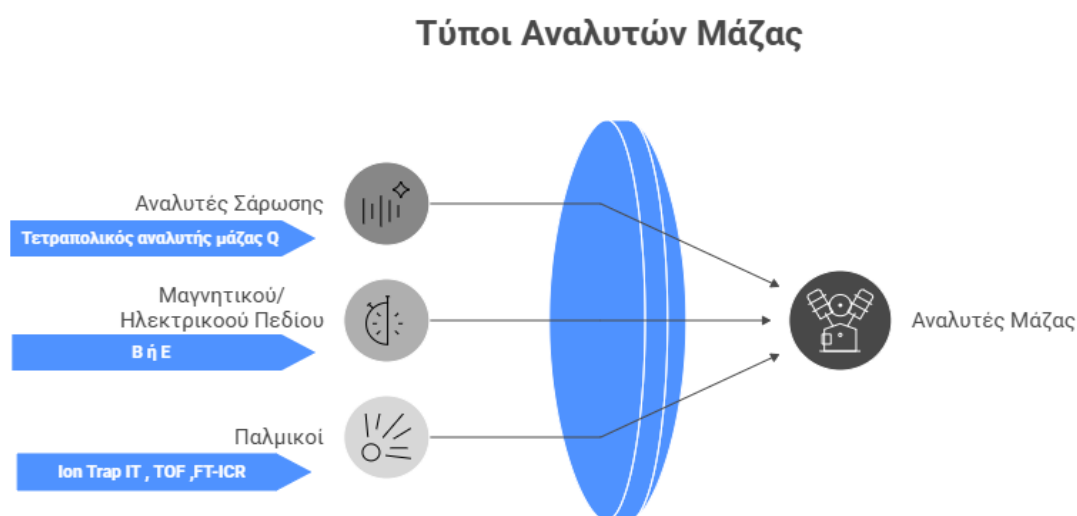
ΙΟΝΤΙΣΜΟΣ ΜΕ ΗΛΕΚΤΡΟΨΕΚΑΣΜΟ

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό εισήχθη πρώτη φορά από τους Fenn et. al. το 1984. Χρησιμοποιείται για ενώσεις μέσης πολικότητας έως πολικές που κυμαίνονται από μικρά έως και μεγάλα μόρια άνω των 100.000 Da. Η τεχνική ESI αποτελεί τεχνική ήπιου ιοντισμού, παρέχοντας παραγωγή άθικτων ιόντων σε αέρια φάση από ένα υγρό δείγμα. Επιτρέπεται έτσι η σύνδεση LC με όργανα MS. Η ESI, βασίζεται στη μεταφορά ιόντων, δηλαδή τα ιόντα πρέπει να υπάρχουν από πριν στο διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα ένα ηλεκτροστατικά φορτισμένο αεροζόλ σχηματίζεται στην κινητή φάση. Λόγω της ταχείας εξάτμισης του διαλύτη, το μέγεθος μειώνεται έως ότου τα ιόντα απελευθερωθούν στην αέρια φάση. Τα πλεονεκτήματα αυτής είναι ότι μπορεί να λειτουργεί τόσο σε αρνητικό όσο και σε θετικό ιοντισμό, παράγοντας με αυτόν τον τρόπο θετικά ή αρνητικά φορτισμένα ιόντα που στη συνέχεια επιταχύνονται στο MS. Παράλληλα με την ESI μπορεί να παρατηρηθεί ο σχηματισμός επιπλέον ιόντων ανάλογα με τη υπόστρωμα του δείγματος, οπότε να διευκολυνθεί η ταυτοποίηση αν σχηματιστούν περισσότερο απλό ένα είδη ιόντων από το φυσικό μόριο, αφού παρέχονται επιπλέον πληροφορίες, όσον αφορά τον προσδιορισμό της μάζας. Τέλος η ένταση στην ESI κατανέμεται σε διάφορα m/z , οδηγώντας σε χαμηλότερα όρια ποσοτικοποίησης(202). Ο ιοντισμός με θετικό ή αρνητικό ηλεκτροψεκασμό σε συνδυασμό με LC-HRMS/MS αποτελεί μια από τις πιο κοινές επιλογές, όσον αφορά τις μεθόδους NTS(203).

3.4.2. ΑΝΑΛΥΤΕΣ ΜΑΖΑΣ- ΥΒΡΙΔΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ORBITRAP

Η βασική λειτουργία ενός φασματομέτρου μάζας είναι να διαχωρίζει τα ιόντα με βάση το m/z . Η διαχωριστική ικανότητα του οργάνου (resolution) εξαρτάται από

τον αναλυτή μάζας και ορίζεται ως το πηλίκο της μάζας της πρώτης κορυφής ως προς τη διαφορά μάζας δύο διαδοχικών κορυφών (Εξίσωση 1). Οι αναλυτές μάζας διακρίνονται σε υψηλής διακριτικής ικανότητας ($10^4 < R < 10^6$), όπου μπορούν να διαχωριστούν ιόντα με ίδια ονομαστική μάζα αλλά διαφορετικές ακριβείς μάζες στο 3^ο-4^ο δεκαδικό ψηφία και χαμηλής ($100 < R < 1000$), όπου η διάκριση των ιόντων γίνεται με βάση την τιμή που αντιστοιχεί στην πιο κοντινή με την ακέραιη τιμή προς την μοριακή. Υπάρχουν διάφοροι τύποι αναλυτών μάζας, ενώ η φύση του δείγματος και οι ανάγκες της ανάλυσης καταδεικνύουν την επιλογή του κατάλληλου ανιχνευτή(210). Οι ανιχνευτές μάζας ανάλογα με τον τρόπο λειτουργίας του παρουσιάζονται στο ΣΧΗΜΑ 9.



ΣΧΗΜΑ 8: ΤΥΠΟΙ ΑΝΑΛΥΤΩΝ ΜΑΖΑΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΡΟΠΟ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ

Επιπλέον κύρια χαρακτηριστικά των αναλυτών μάζας είναι η ευαισθησία, που χαρακτηρίζει το κατώτερο όριο μέτρησης και εκφράζεται από τον λόγο σήμα/θόρυβο. Η γραμμικότητα, που αφορά την περιοχή όπου το σήμα των ιόντων μεταβάλλεται γραμμικά με τη συγκέντρωση του αναλύτη και εξαρτάται κυρίως από το είδος του αναλυτή και την μέθοδο ιοντισμού, την αποδοτικότητα, που εκφράζει το ποσοστό των ιόντων που τελικά αναλύονται μετά τον ιοντισμό, το εύρος μέτρησης των μαζών, δηλαδή το εύρος περιοχής m/z που μπορεί να αναλύσει ένας αναλυτής μαζών και τέλος την ταχύτητα που εκφράζει την χρονική

διάρκεια που απαιτείται για τη λήψη συγκεκριμένων φασμάτων στη μονάδα του χρόνου και δίνεται σε Hz.

(Εξίσωση 1)

$$R = \frac{M}{\Delta M}$$

ΣΥΖΕΥΓΜΕΝΗ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΑΣ (MS/MS)

Η τεχνική αυτή αποτελεί κυρίαρχη τεχνική για τον δομικό χαρακτηρισμό και την ταυτοποίηση ενώσεων. Σημαντικά χαρακτηριστικά αυτής της τεχνικής είναι η υψηλή εκλεκτικότητα, η ικανότητα να μετρά πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις αναλυτών και η ικανότητα να πολλαπλασιάζει τη μέτρηση πολλαπλών αναλυτών σε μια μόνο μέθοδο. Ταυτόχρονα, αν η MS/MS συνδυάζεται με χρωματογραφικό διαχωρισμό η ευαισθησία της σε παρεμβολές είναι συνήθως πολύ χαμηλή(212). Δύο ή περισσότερα επίπεδα φασματομετρικής ανάλυσης περιλαμβάνονται σε αυτή την τεχνική. Μεταξύ των επιπέδων MS τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες, όπως σύγκρουση με αδρανή ή δραστικά αέρια, ηλεκτρόνια ή άλλα ιόντα, επιτάχυνση, επιβράδυνση, σταθεροποίηση κα (214). Το πρώτο φίλτρο χρησιμοποιεί για την επιλογή ενός ιόντος πρόδρομου συγκεκριμένου m/z. Το ιόν πρόδρομος κατευθύνεται στο κύτταρο σύγκρουσης, όπου τα ιόντα συγκρούονται με μόρια αερίου υποβάθρου και διασπώνται σε μικρότερα ιόντα προϊόντος. Το δεύτερο φίλτρο μάζας αποκτά το φάσμα μάζας των ιόντων από το προϊόν που προέκυψε μετά τη σύγκρουση. Τα υβριδικά φασματομέτρα μάζας περιλαμβάνουν ένα συνδυασμό δύο διαφορετικών τύπων φασματομέτρων μάζας σε συζευγμένη διάταξη. Από τα πρώτα όργανα αυτού του τύπου ήταν ο συνδυασμός φασματομέτρου μάζας μαγνητικού τομέα με ένα φασματομέτρο μάζας τετράπολου(212). Η δυνατότητα εκτέλεσης MS/MS είναι εγγενής στο σχεδιασμό των περισσότερων φασματομέτρων μάζας παγίδευσης, ενώ απαιτείται ελάχιστο ή καθόλου πρόσθετο υλικό, και η δυνατότητα σύζευξης παρέχεται μέσω λογισμικού. Εξάιρεση αποτελεί ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap, ο οποίος παρέχει το τελικό στάδιο του MS, και μόνος του δεν είναι συμβατός με MS/MS και μπορεί να ενσωματωθεί σε υβριδικό όργανο με διαφορετικό τύπο φασματομέτρου μάζας που να παρέχει το πρώτο στάδιο του MS(212).

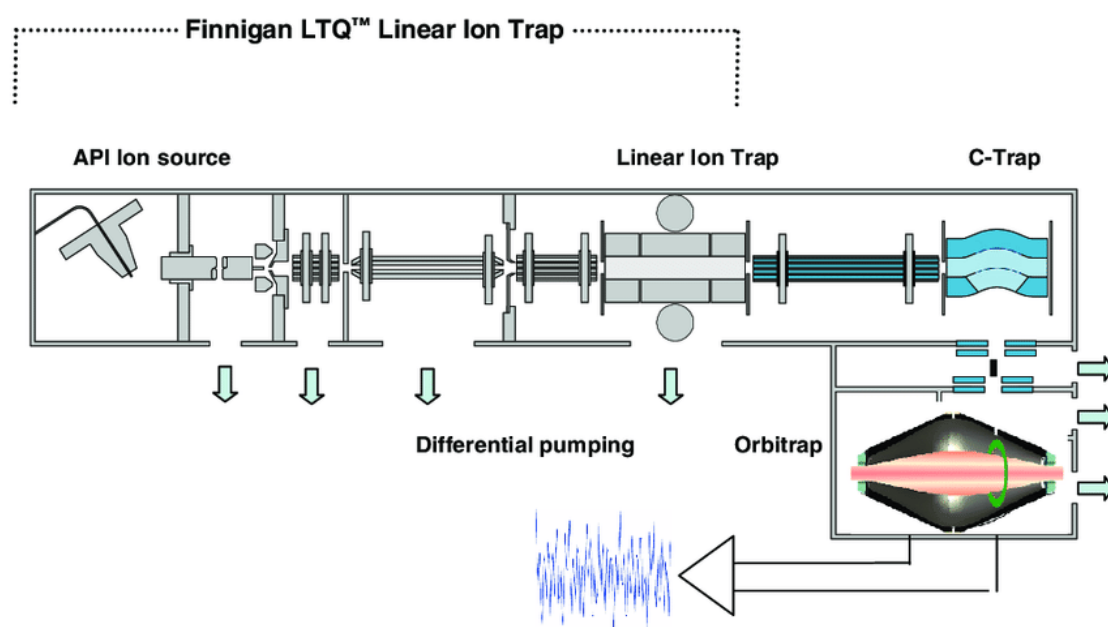
Στην φασματομετρία MS/MS υπάρχει η δυνατότητα εφαρμογής διάφορων πειραμάτων σάρωσης όπως(210):

- Πλήρης σάρωση (full scan)
- Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (Single Ion Monitoring, SIM)
- Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (Multiple Reaction Monitoring, MRM)
- Σάρωση θυγατρικών ιόντων (Product Ion Scanning)
- Σάρωση μητρικού ιόντος (Parent Ion Scanning).

ΥΒΡΙΔΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ORBITRAP

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτική ικανότητας, έχει αποδειχθεί ένας αποτελεσματικός και αξιόπιστος τρόπος για τον προσδιορισμό πολλών οργανικών ρύπων στο περιβάλλον(210). Ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap, επιτρέπει την ανίχνευση μεγάλου εύρους μάζας (4 δεκαδικά ψηφία) και σε δυναμική περιοχή μεγαλύτερη των 4000 / ανά σάρωση. Η ακρίβεια μάζας που εμφανίζει είναι μέχρι και τα 3ppm, αποτελώντας έναν ανιχνευτή με μεγάλη αξιοπιστία ταυτοποίησης ενώ αποτελεί συνδυασμό γραμμικής και ηλεκτροστατικής παγίδας ιόντων(210,217). Στα συστήματα LC-Orbitrap MS, τα συστατικά του δείγματος διαχωρίζονται αρχικά χρωματογραφικά και στη συνέχεια ιοντίζονται, συνήθως με τεχνικές ήπιου ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση, όπως ο ηλεκτροψεκασμός ESI. Ο αναλυτής Orbitrap χρησιμοποιεί τον μετασχηματισμό Fourier για να αποκτήσει τα φάσματα μάζας και αποτελείται από δύο εξωτερικά ηλεκτρόδια και ένα κεντρικό, το οποίο επιτρέπει να ενεργεί τόσο ως αναλυτής όσο και ως ανιχνευτής(218). Τα παραγόμενα ιόντα στην πηγή ιοντισμού παγιδεύονται στον αναλυτή μαζών(LTQ) και μπορούν να αναλυθούν με μεθόδους σάρωσης MS έως και MSⁿ (n=1-10) και στη συνέχεια επιταχύνονται ευθύγραμμα και συλλέγονται στην παγίδα ιόντων σχήματος C(C-Trap), απ' όπου στη συνέχεια εισάγονται στο Orbitrap και αιχμαλωτίζονται με απότομη άνοδο του δυναμικού στο κεντρικό ηλεκτρόδιο. Τα ιόντα που έχουν παγιδευτεί κινούνται σε κυκλική τροχιά γύρω από

αυτό και γίνεται ανίχνευση των αξονικών ταλαντώσεων κατά μήκος του κεντρικού ηλεκτροδίου. Διαφορετικά ιόντα ταλαντώνονται σε διαφορετικές συχνότητες με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους (210). Η συχνότητα των ταλαντώσεων αυτών εξαρτάται μόνο από τον λόγο m/z και η ανίχνευση γίνεται με μη καταστροφικό τρόπο. Μέσω του μετασχηματισμού Fourier, το σήμα μετατρέπεται σε φάσμα μάζας εξαιρετικά υψηλής ανάλυσης και ακρίβειας. Η απεικόνιση του υβριδικού αναλυτή LTQ Orbitrap φαίνεται στο ΣΧΗΜΑ 10.



ΣΧΗΜΑ 9: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΟΥ ΥΒΡΙΔΙΚΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ LTQ-ORBITRAP (212)

3.5. ΜΕΘΟΔΟΙ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Παρά τη μεγάλη τεχνολογική πρόοδο, οι περισσότερες ενόργανες διατάξεις που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση, αδυνατούν να αναλύσουν απευθείας την υπόστρωμα των δειγμάτων και έτσι ένα επιπλέον στάδιο, αυτό της προκατεργασίας του δείγματος, είναι απαραίτητο(210). Οπότε για την εξασφάλιση της υψηλής απόδοσης των σύγχρονων αναλυτικών τεχνικών LC-MS, προϋπόθεση αποτελεί η κατάλληλη προετοιμασία του δείγματος. Για τον σκοπό αυτό, πριν από την χρωματογραφική ανάλυση εφαρμόζονται τεχνικές επεξεργασίας των δειγμάτων με σκοπό τη διασφάλιση της απομόνωσης των αναλυτών και τη μείωση

των παρεμβολών της υποστρώματος(193). Ο προσδιορισμός των μυκοτοξινών αλλά και άλλων οργανικών ρύπων σε δείγματα τροφίμων προηγείται από διάφορα στάδια όπως η δειγματοληψία και όπως αναφέρθηκε η προετοιμασία δειγμάτων με εκχύλιση και καθαρισμό. Η εκχύλιση από μολυσμένα δείγματα τροφίμων και ζωοτροφών έχει ως στόχο την απομάκρυνση των μυκοτοξινών από το δείγμα με τη χρήση διαλυτών. Οι διαφορετικές στρατηγικές προετοιμασίας δειγμάτων επηρεάζουν ουσιαστικά τα χαρακτηριστικά απόδοσης της LC-MS/MS. Η επιλογή των μεθόδων προετοιμασίας δειγμάτων πρέπει να είναι κατάλληλη από την άποψη των αναλυτών, των υποστρωμάτων δειγμάτων και των σκοπών της μελέτης(155). Η εκχύλιση αποτελεί και το πρώτο στάδιο της προετοιμασίας του δείγματος. Η μέθοδος QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) αναπτύχθηκε αρχικά για την ανάλυση φυτοφαρμάκων, ωστόσο διευκολύνει την ταυτόχρονη ανίχνευση διαφορετικών ομάδων μυκοτοξινών δε πληθώρα υποστρωμάτων δειγμάτων(86,193). Η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE), αποτελεί ακόμη μια μέθοδο εκχύλισης που βασίζεται στην διαφορετική διαλυτότητα της τοξίνης σε υδατική φάση και σε μια μη αναμείξιμη οργανική φάση. Η εκχύλιση πραγματοποιείται σε ένα διαλύτη, αφήνοντας το υπόλοιπο της υποστρώματος στον άλλο. Ακόμη η εκχύλιση υγρού-στερεού (SLE) αποτελεί μια απλή μέθοδο για την εκχύλιση μυκοτοξινών από στερεές μήτρες, όπως οι ζωοτροφές. Βασίζεται στη ζύγιση του ομογενοποιημένου δείγματος και στην προσθήκη διαλύτη εκχύλισης και χρήση αναδευτήρα. Ακόμη μια εκχυλιστική μέθοδος αποτελεί η εκχύλιση με υπερκρίσιμο υγρό (SFE), με την οποία με χρήση υπερκρίσιμου υγρού μπορεί να αποφευχθεί η χρήση οργανικού διαλύτη και χρησιμοποιείται κυρίως για την εκχύλιση μη πολικών μορίων(193). Για τη μη στοχευμένη ανάλυση οργανικών ρύπων, μια ολοκληρωμένη μέθοδος εκχύλισης, που να εξασφαλίζει την εκχύλιση πολλαπλών ενώσεων με μειωμένη συν-εκχύλιση παρεμβολών αποτελεί ιδανική μέθοδο προετοιμασίας των δειγμάτων(219). Ιδιαίτερα για τις ζωοτροφές σκύλου και γάτας που περιέχουν διάφορα συστατικά όπως πρωτεΐνες, λίπη, πεπτιδία, προϊόντα οξειδωσης λιπιδίων κτλ., τα οποία μπορεί να έχουν μεγάλες παρεμβολές στη υπόστρωμα(220). Επιπλέον για τη μείωση των παρεμβολών της υποστρώματος, μετά την εκχύλιση ακολουθούν μέθοδοι καθαρισμού των δειγμάτων, με υλικά όπως δευτεροταγείς αμίνες (PSA) ή

οκταδεκυλο-τροποποιημένη σίλικα (C18)(26,221). Στην παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόστηκε η μέθοδος QuEChERS για την εκχύλιση πολλαπλών οργανικών ρύπων σε δείγματα ζωοτροφών κατοικιδίων.

3.5.1. ΕΚΧΥΛΙΣΗ QUECHERS (QUICK , EASY, CHEAP , EFFECTIVE , RUGGED AND SAFE)

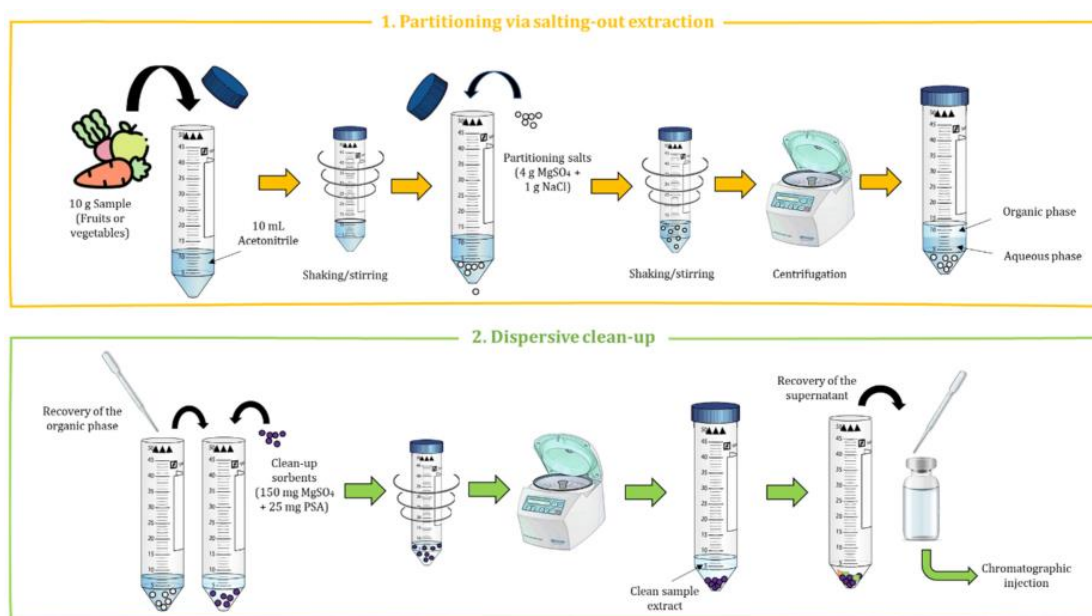
Αρκετές νέες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την εκχύλιση ενώσεων από στερεά , ημιστερεά και δείγματα με υψηλό ιξώδες. Η πολύπλοκη φύση των υποστρωμάτων όπως οι ζωοτροφές δυσχεραίνουν την επεξεργασία και την ανάλυσή τους. Ωστόσο οι κλασικές τεχνικές προ κατεργασίας στερεών δειγμάτων περιορίζονται στην εκχύλιση οργανικών ενώσεων με συγκεκριμένα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά. Η τεχνική QuEChERS , καλύπτει ένα ευρύ φάσμα αναλυτών με επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η μέθοδος αυτή αναπτύχθηκε από τον Αναστασιάδη το 2003, στην ερευνητική ομάδα του Steven Lehotay(222). Η αρχική ανάπτυξή του αφορούσε προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά (210). Η μέθοδος αυτή μπορεί να δεχτεί πολλές τροποποιήσεις όσον αφορά την ποσότητα και το είδος των αλάτων που προστίθενται , τα οποία χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση και τον καθαρισμό. Επιπλέον είναι ευέλικτη στην επιλογή του οργανικό διαλύτη , οπότε μπορεί να εφαρμοστεί και σε δείγματα με ποσοστά υγρασίας μικρότερο του 20% , όπως οι ξηρές τροφές κατοικιδίων που συνήθως περιέχουν ποσοστά υγρασίας της τάξεως των 8-10% και όχι μόνο σε φρούτα-λαχανικά που είχαν ποσοστό υγρασίας μεγαλύτερο του 75%(222). Η μέθοδος αυτή συνδυάζει βήματα προ κατεργασίας δειγμάτων ενώ έχει ευρύ φάσμα όσον αφορά τις ενώσεις προς ανάλυση συγκριτικά με παλαιότερες μεθόδους. Πλέον η QuEChERS, χρησιμοποιείται και για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων όπως φαρμακευτικά, φυτοπροστατευτικά υπολείμματα , μυκοτοξίνες, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες σε διάφορες μήτρες τροφίμων (83,210). Η QuEChERS σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία συνδυασμένη με αναλυτή μάζας έχει αποκτήσει ευρεία χρήση για την εκχύλιση υπολειμμάτων μυκοτοξινών από ζωοτροφές , προσφέροντας μια αποδοτική και αποτελεσματική προσέγγιση

για την ανίχνευση αυτών των ρύπων παρουσιάζοντας καλά αποτελέσματα και με χαμηλά όρια ανίχνευσης σε διάφορα είδη ζωοτροφών(169,220). Η μέθοδος αυτή βασίζεται στη διασπορά αλάτων για την εξαγωγή και απομόνωση μια ποικιλίας αναλυτών αλλά και στον επακόλουθο καθαρισμό του εκχυλίσματος που έχει προέλθει από το αναλυόμενο δείγμα. Οπότε στην διαδικασία αυτή υπάρχουν δύο βήματα(223):

1. Στάδιο εκχύλισης υγρού-υγρού με βάση τον διαχωρισμό μέσω εκχύλισης με τη χρήση αλάτων (salting-out) για την ισορροπία μεταξύ οργανικής-υδατικής φάσης
2. Στάδιο καθαρισμού , που πραγματοποιείται με εκχύλιση διασποράς στερεής φάσης (dSPE) , χρησιμοποιώντας απορροφητικά υλικά και άλατα για την απομάκρυνση παρεμβολών της υποστρώματος

Πιο αναλυτικά τα δείγματα που πρόκειται να αναλυθούν ομογενοποιούνται και η ποσότητα αυτών ζυγίζεται σε πλαστικούς φυγοκεντρικούς σωλήνες από πολυαιθυλένιο. Έπειτα γίνεται έγχυση με χρήση οργανικού διαλύτη [π.χ. ακετονιτρίλιο] και προσθήκη άνυδρου θειϊκού μαγνησίου και χλωριούχου νατρίου ή οξικού νατρίου ή κάποιου ρυθμιστικού διαλύματος όπως κιτρικά άλατα, για τη ρύθμιση του pH , εάν χρειαστεί. Ακολουθεί έντονη ανάδευση , φυγοκέντριση και διαχωρίζονται οι φάσεις. Η υπερκείμενη φάση , καθαρίζεται με dSPE. Στο στάδιο αυτό χρησιμοποιούνται : $MgSO_4$ για την απομάκρυνση του νερού από τον πολικό διαλύτη , πρωτοταγείς-δευτεροταγείς αμίνες (Primary Secondary Amine, PSA), για την απομάκρυνση διάφορων πολικών οργανικών οξέων, πολικών χρωστικών, σακχάρων και λιπαρών οξέων , γραφιτικός Άνθρακας (Graphitised Carbon Black, GCB) για απομάκρυνση στερολών και χρωστικών, όπως η χλωροφύλλη και C_{18} για την απομάκρυνση μη πολικών παρεμποδίσεων, όπως λιπίδια. Για την εξισορρόπηση του pH και τη βελτίωση της σταθερότητας κατά την αποθήκευση των ευαίσθητων στο pH αναλυτών ενίοτε προστίθεται μικρή ποσότητα φορμικού οξέος ή αμμωνίας. Το τελικό εκχύλισμα αν χρειαστεί συμπυκνώνεται και επαναδιαλύεται στον επιθυμητό διαλύτη πριν την έγχυση σε υγρό ή αέριο χρωματογράφο σε σύζευξη με φασματογράφο μάζας (214). Ανάλογα με τη φύση των δειγμάτων, η συγκεκριμένη μέθοδος διαφοροποιείται. Για παράδειγμα, δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (<80%) , απαιτούν την προσθήκη

ύδατος πριν από την αρχική εκχύλιση με σκοπό να περιέχεται η ίδια αναλογία νερού-δείγματος σε τελική ποσότητα δείγματος. Για δείγματα με περιεκτικότητα σε νερό <25% , η ποσότητα του δείγματος ανάλυσης μειώνεται και ακολουθεί συμπλήρωση με νερό , για υπάρχει ένα επιθυμητό ποσοστό υγρασίας (214). Η κλασική μέθοδος QuEChERS περιλαμβάνει τη χρήση 10g δείγματος , 10ml οργανικού διαλύτη (ACN) , 5g αλάτων διαχωρισμού (4 g MgSO₄ and 1 g NaCl) και 175 mg από απορροφητικά υλικά καθαρισμού (25mg πρωτοταγούς δευτεροταγής αμίνης PSA και 150mg MgSO₄). Η προσθήκη των αλάτων αυτών επιτρέπει την μείωση της διαλυτότητας των πολικών ενώσεων στην υδατική φάση και την απομάκρυνση του νερού από την οργανική(223). Στο ΣΧΗΜΑ 11, παρουσιάζονται σχηματικά τα στάδια της QuEChERS ενώ στον ΠΙΝΑΚΑ 4 παρουσιάζονται παραλλαγές αυτής της μεθόδου.



ΣΧΗΜΑ 10: ΣΧΗΜΑΤΙΚΗ ΑΠΕΙΚΟΝΙΣΗ ΤΩΝ ΣΤΑΔΙΩΝ ΤΗΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ QuEChERS (217)

ΠΙΝΑΚΑΣ 4: ΠΑΡΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QUECHERS (224)

ORIGINAL	AOAC	EN 15662
<ul style="list-style-type: none"> ✓ 10g ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ✓ 10ml ACN ✓ 4g MgSO₄+ 1g NaCl ✓ 150mg/ml MgSO₄ + 25mg/ml PSA 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 15g ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ✓ 10ml ACN + 1% HOAc ✓ 6g MgSO₄+ 1.5g NaOAc ✓ 150mg/ml MgSO₄ + 50mg/ml PSA 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ 10g ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ✓ 10ml ACN ✓ 4g MgSO₄+ 1g NaCl +1g Na₃Cit•2H₂O + 0,5 g Na₂Cit•1.5H₂O ✓ 150mg/ml MgSO₄ + 25mg/ml PSA

Η αποτελεσματικότητα της τεχνικής αυτής στην ανάλυση μυκοτοξινών έχει τεκμηριωθεί εκτενώς στη βιβλιογραφία , ιδιαίτερα σε πολύπλοκες μήτρες όπως οι ζωοτροφές. Πλήθος μελετών έχει αναδείξει την ευρεία εφαρμογή της τόσο σε ζωοτροφές κατοικιδίων όσο και σε ζωοτροφές κτηνοτροφικών και άλλων ζώων. Στον ΠΙΝΑΚΑ 5 παρουσιάζονται ενδεικτικά αποτελέσματα από βιβλιογραφικές αναφορές τα οποία καταδεικνύουν την συχνότητα ανίχνευσης μυκοτοξινών σε διαφορετικούς τύπους ζωοτροφών καθώς και τις αντίστοιχες αναλυτικές τεχνικές που εφαρμόστηκαν.

ΠΙΝΑΚΑΣ 5: ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ QUECHERS ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

ΤΥΠΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	ΦΟΡΕΣ ΘΕΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΓΙΑ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	ΤΕΧΝΙΚΗ	ΑΝΑΦΟΡΕΣ						
<table border="1" style="width: 100%;"> <tr> <td style="text-align: center;">Δείγματα Ζωοτροφών Κατοικιδίων</td> <td style="text-align: center;">491 στα 403 δείγματα</td> <td rowspan="2" style="text-align: center;">Quechers-based/ LC-MS/MS</td> <td rowspan="2" style="text-align: center;">(221)</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center;">Δείγματα Ζωοτροφών Άλλων Ζώων</td> <td style="text-align: center;">275 στα 153 δείγματα</td> </tr> </table>	Δείγματα Ζωοτροφών Κατοικιδίων	491 στα 403 δείγματα	Quechers-based/ LC-MS/MS	(221)	Δείγματα Ζωοτροφών Άλλων Ζώων	275 στα 153 δείγματα			
Δείγματα Ζωοτροφών Κατοικιδίων	491 στα 403 δείγματα	Quechers-based/ LC-MS/MS			(221)				
Δείγματα Ζωοτροφών Άλλων Ζώων	275 στα 153 δείγματα								
Δείγματα Ζωοτροφών Κατοικιδίων	62 φορές στα 246 δείγματα	Quechers-based/ LC-MS/MS	(220)						
Δείγματα Ζωοτροφών Άλλων Ζώων	47 φορές στα 54 δείγματα	Quechers/ LC-LTQ/Orbitrap-MS	(169)						
Δείγματα Ζωοτροφών Άλλων Ζώων	550 φορές στα 54 δείγματα	dSPE-Quechers / HPLC-HRMS	(18)						

B. ΣΚΟΠΟΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΟ ΤΟΥ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟΥ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διατριβής είναι η διερεύνηση της παρουσίας και της συνύπαρξης οργανικών ρύπων (μυκοτοξινών, υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων, φαρμακευτικών ενώσεων και φυτικών βιοδραστικών μεταβολιτών), σε εμπορικά διαθέσιμες ζωοτροφές κατοικιδίων ζώων (σκύλου και γάτας), με ιδιαίτερη έμφαση στις μυκοτοξίνες, μέσω ρών εργασίας σάρωσης ύποπτων ενώσεων (suspect screening). Η μελέτη αυτή, έχει διερευνητικό (exploratory) και ποιοτικό (qualitative) χαρακτήρα, εστιάζοντας στη χαρτογράφηση των προτύπων συνύπαρξης των ρύπων και όχι στην πλήρη επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου. Για τον σκοπό αυτό, εφαρμόζεται μια ολοκληρωμένη αναλυτική προσέγγιση βασισμένη στην υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS), σε συνδυασμό με στρατηγικές σάρωσης ύποπτων ενώσεων. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την ευρεία ιχνηλάτηση και τον προκαταρκτικό προσδιορισμό πολλαπλών κατηγοριών ρύπων χωρίς την απαίτηση πρότυπων ουσιών (standard-free), παρέχοντας μια πρώτη ολοκληρωμένη αποτύπωση του προφίλ επιμόλυνσης των δειγμάτων. Ειδικότερα η διατριβή στοχεύει στην συγκριτική αξιολόγηση της μεθόδου QuEChERS με τη μελέτη εναλλακτικών πρωτοκόλλων καθαρισμού για την επεξεργασία πολύπλοκων υποστρωμάτων ξηρών και υγρών ζωοτροφών. Παράλληλα στη διερεύνηση της ικανότητας των σύγχρονων αναλυτών Orbitrap να ανιχνεύσουν και να ταυτοποιούν ταυτόχρονα πολυάριθμες κατηγορίες οργανικών ρύπων στο πλαίσιο ενός ενιαίου αναλυτικού πρωτοκόλλου με απόδοση επιπέδων εμπιστοσύνης κατά Schymanski. Επιπλέον επιδιώκεται η συγκριτική αξιολόγηση του προφίλ επιμόλυνσης μεταξύ ξηρών και υγρών σκευασμάτων, καθώς και μεταξύ ζωοτροφών για σκύλους και γάτες σε συνάρτηση με τη διατροφική τους σύσταση. Τέλος επιδιώκεται η ανάδειξη της HRMS ως εργαλείου έγκαιρης προειδοποίησης (early warning tool), για την ασφάλεια των ζωοτροφών, ιδίως σε πεδία όπου η στοχευμένη ανάλυση παραμένει περιορισμένη, προσφέροντας μια ολοκληρωμένη εικόνα που μπορεί να αποτελέσει τη βάση για μελλοντικές στοχευμένες ποσοτικές μελέτες.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΜΕΡΟΣ

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

4.1. ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Συλλέχθηκαν συνολικά 65 δείγματα ζωοτροφών για κατοικίδια ζώα:

- 33 ζωοτροφές για γάτες (7 ξηρές και 26 υγρές)
- 32 ζωοτροφών για σκύλους (14 ξηρές και 18 υγρές)

Μια μονάδα από κάθε διαφορετικό εμπορικό προϊόν που πληρούσε τα κριτήρια συμπερίληψης αγοράστηκε από μεγάλες αλυσίδες σούπερ μάρκετ και κτηνιατρικά καταστήματα στην περιοχή των Ιωαννίνων (ΒΔ Ελλάδα) . Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τα επίσημα πρωτόκολλα που ορίζονται στον κανονισμό της Επιτροπής 2006/401/ΕΚ , και στην οδηγία της Επιτροπής 2002/63/ΕΚ όπου ισχύουν. Οι επιλεγμένες τροφές ανήκαν σε μεγάλες εταιρείες παραγωγής ζωοτροφών που διατίθενται ευρέως στην Ελλάδα κι σε πολλές περιπτώσεις και σε χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Έτσι , αν και οι αγορές πραγματοποιήθηκαν σε μια μόνο περιοχή , τα προϊόντα αποτελούν αντιπροσωπευτικά δείγματα εμπορικών ζωοτροφών για κατοικίδια που χρησιμοποιούνται συνήθως στην Ελληνική και την Ευρωπαϊκή αγορά. Η δειγματοληψία σχεδιάστηκε ως μια στιγμιαία εικόνα του καλαθιού αγοράς των προϊόντων που ήταν διαθέσιμα τοπικά κατά τη διάρκεια της περιόδου δειγματοληψίας. Ο διαφορετικός αριθμός υγρών και ξηρών ζωοτροφών ανά είδος αντικατοπτρίζει έτσι την πραγματική κατανομή και ποικιλία των προϊόντων που ήταν διαθέσιμα στην Ελληνική αγορά κατά τη στιγμή της δειγματοληψίας και όχι έναν προκαθορισμένο ισορροπημένο πειραματικό σχεδιασμό. Τα δείγματα περιλάμβαναν συνταγές τροφών που προοριζόταν για τη διατροφή γατών και σκύλων. Τα κριτήρια επιλογής έλαβαν υπόψη τον τύπο της τροφής, τη σύνθεση των συστατικών και την εκτιμώμενη συχνότητα κατανάλωσης που σχετίζεται με κάθε προϊόν. Σύμφωνα με τις δηλώσεις της ετικέτας οι ξηρές συνταγές

αντιστοιχούσαν σε τυπικές κροκέτες με βάση τα δημητριακά που συνδύαζαν δημητριακά με κρέας και ζωικά παράγωγα ή/και ψάρι και παράγωγα ψαριού, με δημητριακά να υπάρχουν σε ορισμένα προϊόντα. Όλα τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο κύριες κατηγορίες, είδη ζώων (γάτες και σκύλοι), ακολουθούμενα από μια επακόλουθη κατηγοριοποίηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, λίπη και υγρασία (ΠΙΝΑΚΑΣ 6).

ΠΙΝΑΚΑΣ 6: ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΣΥΝΘΕΣΗ (ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ, ΛΙΠΟΣ ΚΑΙ ΥΓΡΑΣΙΑ) ΕΜΠΟΡΙΚΩΝ ΤΡΟΦΩΝ ΓΙΑ ΣΚΥΛΟΥΣ ΚΑΙ ΓΑΤΕΣ, ΧΩΡΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΞΗΡΕΣ ΚΑΙ ΥΓΡΕΣ ΣΥΝΤΑΓΕΣ

ΔΕΙΓΜΑ	ΖΩΟ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ	ΤΥΠΟΣ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ	ΠΟΣΟΣΤΟ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ %	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΛΙΠΟΣ %	ΠΕΡΙΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ ΣΕ ΥΓΡΑΣΙΑ %
1	Dog	Dry	30	24	8
2	Dog	Wet	8	6	80
3	Dog	Wet	8	6	80
4	Dog	Wet	8	6	80
5	Dog	Wet	8	6	80
6	Dog	Wet	8	6	80
7	Dog	Wet	8	6	80
8	Dog	Wet	8	6	80
9	Dog	Dry	32	14	8
10	Dog	Dry	32	14	8
11	Dog	Wet	10	5	80.5
12	Dog	Wet	10	5	80.5
13	Dog	Wet	8.5	4	82.8
14	Cat	Wet	11	5	81
15	Cat	Wet	11	5	81
16	Cat	Wet	11	5	81
17	Cat	Wet	11	5	81
18	Dog	Dry	30	16	10
19	Dog	Dry	23	9	10
20	Dog	Dry	5	12	7
21	Dog	Dry	22	10	10
22	Cat	Wet	12	3	82
23	Cat	Wet	12	3	82
24	Cat	Dry	31	9	6
25	Cat	Dry	31	9	6
26	Cat	Dry	31	9	6
27	Cat	Wet	7	3	84
28	Cat	Wet	7	3	84
29	Cat	Dry	30	11	8
30	Cat	Wet	7	3	84

31	Cat	Wet	10.5	6.5	77.9
32	Cat	Wet	7	2.9	82
33	Cat	Dry	29.5	13.5	9
34	Dog	Dry	26	16	8
35	Cat	Wet	6.4	4.1	84.5
36	Cat	Wet	6.4	4.1	84.5
37	Cat	Wet	6.4	4.1	84.5
38	Cat	Wet	6.4	4.1	84.5
39	Cat	Wet	6.4	4.1	84.5
40	Cat	Dry	30	11	7
41	Cat	Wet	8	4.5	82
42	Dog	Wet	9	5	82
43	Cat	Wet	8	4.5	82
44	Cat	Wet	8	4.5	82
45	Dog	Wet	9	5	82
46	Dog	Wet	8	6	80
47	Dog	Wet	8	6	80
48	Dog	Wet	8	6	80
49	Dog	Dry	24	13.8	9
50	Dog	Dry	24	13.8	8
51	Dog	Dry	15	6.5	10
52	Dog	Wet	10	4.5	82
53	Dog	Wet	10	4.5	82
54	Cat	Wet	10	5.5	81
55	Cat	Wet	10	5.5	81
56	Cat	Wet	10	5.5	81
57	Dog	Dry	21	11	15
58	Dog	Dry	21	11	15
59	Dog	Dry	21	11	15
60	Dog	Wet	7	3.8	82.5
61	Cat	Wet	10	5	80
62	Cat	Dry	26	22	8
63	Cat	Wet	14	2.6	80.2
64	Cat	Wet	11.7	2.2	84
65	Cat	Wet	7.8	4	84.5

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΕΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Για την προετοιμασία και ανάλυση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν αντιδραστήρια και διαλύτες υψηλής καθαρότητας, κατάλληλοι για εφαρμογές υγρής χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας. Όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην ανάλυση ήταν ποιότητας LC-MS grade και περιλάμβαναν:

- Νερό
- Μεθανόλη
- Ακετονιτρίλιο
- Φορμικό οξύ (FA, καθαρότητας 98–100%)
- Φορμικό αμμώνιο (NH_4FA , $\geq 98\%$)

Το νερό, η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο προμηθεύτηκαν από τον οίκο Fisher Scientific (Waltham, MA, UK). Το φορμικό οξύ και φορμικό αμμώνιο προμηθεύτηκαν από την Merck (Darmstadt, Germany).

Τα άλατα εκχύλισης για την μέθοδο QuEChERS περιλάμβαναν:

- Άνυδρο θειϊκό μαγνήσιο (MgSO_4)
- Διένυδρο κιτρικό τρινάτριο ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
- Οξικό νάτριο (NaOAc)
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl)
- Διβασικό διυδρικό κιτρικό νάτριο ($\text{C}_6\text{H}_6\text{Na}_2\text{O}_7 \cdot 1.5\text{H}_2\text{O}$)
- Προσοφητικό υλικό C18 (LiChroprep RP-18, 40–64 μm)
- Προσοφητικό υλικό με πρωτοταγής και δευτεροταγής αμίνη (PSA, 40 μm)

Τα άλατα εκχύλισης για την μέθοδο QuEChERS που αγοράστηκαν επίσης από τον οίκο Merck περιλάμβαναν το άνυδρο θειϊκό μαγνήσιο, το διένυδρο κιτρικό τρινάτριο και το προσοφητικό υλικό C18. Πρόσθετα αντιδραστήρια όπως οξικό νάτριο (NaOAc) και χλωριούχο νάτριο (NaCl), προμηθεύτηκαν από τον οίκο Riedel-de Haën (Ανόβερο, Γερμανία) ενώ το διβασικό διυδρικό κιτρικό νάτριο

(C₆H₆Na₂O₇·1.5H₂O) αγοράστηκε από την Sigma-Aldrich (Στεϊνχέιμ , Γερμανία). Το προσροφητικό υλικό αμίνης προμηθεύτηκε από την Millipore (Cork, Ireland).

ΥΛΙΚΑ-ΣΚΕΥΗ

Όλα τα στάδια της προετοιμασίας των δειγμάτων πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιώντας τα παρακάτω υλικά και σκεύη :

- Σωλήνας προπυλενίου τύπου Falcon 15ml (17 nm)
- Σωλήνας προπυλενίου τύπου Falcon 15ml (28 nm)
- Φίλτρα μεμβράνης σύριγγας από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (PTFE , 0,22 μm)
- Σύριγγες όγκου 1ml
- Αυτόματες πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου 10-10.000 μL
- Φιαλίδια 32×11,6 mm , clear glass , 2ml
- Σκαφίδια ζύγισης, ποτήρια ζέσεως 100/250 ml , βαθμονομημένα σιφώνια 5/10 ml , μεταλλικές σπάτουλες , ταινίες parafilm , πιπέτες Pasteur

Τα φιαλίδια clear glass προμηθεύτηκαν από τον οίκο Lab Logistics Group GmbH Meckenheim , ενώ οι σωλήνες προπυλενίου προμηθεύτηκαν από τον οίκο Millipore (Cork, Ireland). Οι σύριγγες όγκου 1ml αγοράστηκαν από τον οίκο Softcare laboratory series (Changzhou, Jiangsu, China) ενώ οι αυτόματες πιπέτες είναι του οίκου Eppendorf (Vienna, Austria). Τέλος τα φίλτρα μεμβράνης προμηθεύτηκαν από τον οίκο Membrane Solutions (USA).

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Τα όργανα και οι συσκευές που χρησιμοποιήθηκαν είναι :

- Σύστημα UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων AA-160
- Φυγόκεντρος Heraeus Megafuge 8
- Στήλη χρωματογραφίας C18
- Στήλη χρωματογραφίας Thermo hypersil gold , 100×2.1 mm με 1,9 μm μέγεθος σωματιδίων

Το σύστημα της υγρής χρωματογραφίας UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL είναι της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany) , ενώ ο αναλυτικό ζυγός αποτελεί προϊόν της Denver Instrument Company (Göttingen, Germany). Η φυγόκεντρος είναι της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany) . Η στήλη C18 αγοράστηκε από το Restek, USA και η στήλη Thermo hypersil gold αγοράστηκε από την Bremen, Germany.

4.3. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Με σκοπό την επιλογή του σωστού πρωτόκολλου ανάλυσης υπάρχουν ορισμένοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψιν όπως η υγρασία και η περιεκτικότητα σε λίπη. Οπότε ανάλογα με τις χημικές ιδιότητες των ενώσεων προς ανάλυση (μυκοτοξινών, φυτοφαρμάκων, φαρμακευτικών προϊόντων και φυτικών μεταβολιτών) και την φύση της υποστρώματος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση ,επιλέγεται η κατάλληλη μέθοδος εκχύλισης με σκοπό την αποφυγή των αναλυτικών παρεμποδίσεων και την παραλαβή με καλύτερη απόδοση των ενώσεων. Όσον αφορά τις μυκοτοξίνες , η επιλογή τη σωστής μεθόδου επεξεργασίας στα τρόφιμα εξαρτάται από τη μοριακή τους δομή(83). Η μέθοδος QuEChERS , αποτελεί μια από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους για την εξαγωγή ρύπων σε δείγματα τροφίμων. Παρέχει τη δυνατότητα προσδιορισμού τόσο πολικών όσο και μη πολικών ενώσεων. Όπως αναφέρθηκε, όλα τα δείγματα κατηγοριοποιήθηκαν σε δύο κύριες κατηγορίες , είδη ζώων (γάτες και σκύλοι), ακολουθούμενα από μια επακόλουθη κατηγοριοποίηση της περιεκτικότητας σε πρωτεΐνες, λίπη και υγρασία .Πριν την εκχύλιση ένα αντιπροσωπευτικό τμήμα του κάθε δείγματος ξηράς τροφής αλέστηκαν σε εργαστηριακό μύλο με σκοπό να ληφθεί μια λεπτή και ομοιογενής σκόνη , ενώ τα υγρά δείγματα αναμίχθηκαν με μια σπάτουλα από ανοξείδωτο χάλυβα για να σχηματίσουν μια ομοιόμορφη πάστα. Για την ανάλυση των οργανικών ρύπων στα δείγματα ζωοτροφών σκύλου-γάτας χρησιμοποιήθηκε η Buffered EN 15662 QuEChERS μέθοδος εκχύλισης σύμφωνα με προηγουμένως επικυρωμένο πρωτόκολλο πολλαπλών υπολειμμάτων για ζωοτροφές υδατοκαλλιέργειας(169).

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΠΟΡΕΙΑ

1^ο ΣΤΑΔΙΟ

Πέντε γραμμάρια (5g) ομογενοποιημένου δείγματος ζυγίστηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρισης 50ml , ακολουθούμενα από προσθήκη 10ml ακετονιτριλίου και 10ml νερού , και τα δύο βαθμού LC-MS. Στη συνέχεια το μίγμα αναδεύτηκε σε οριζόντιο αναδευτήρα για 15 λεπτά. Έπειτα προστέθηκαν τα άλατα εκχύλισης που περιλάμβαναν: 4g $MgSO_4$, 1g $C_6H_5Na_3O_7 \cdot H_2O$, 1g NaCl , 0,5g $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ και ο σωλήνας αναδεύτηκε χειροκίνητα για 1 λεπτό , ακολουθούμενο από ανάδευση σε δίνη για επιπλέον 1 λεπτό προκειμένου να ελαχιστοποιηθεί η πήξη κατά την ενυδάτωση του $MgSO_4$. Τα δείγματα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκαν στις 4000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Ένα κλάσμα 1 mL του υπερκείμενου υγρού μεταφέρθηκε σε καθαρό σωλήνα 15 mL που περιείχε άλατα καθαρισμού.

2^ο ΣΤΑΔΙΟ

Το 2^ο στάδιο , δηλαδή το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) διεξήχθη με υγρή-στερεή εκχύλιση σε διασπορά(dSPE). Στο στάδιο αυτό, τα πρωτόκολλα διαφοροποιήθηκαν κυρίως όσον αφορά τις αναλογίες προσροφητικών υλικών , δηλαδή των αλάτων καθαρισμού . Εφαρμόστηκαν πειραματικά τα 3 παρακάτω πρωτόκολλα :

- a) 150 mg του άνυδρου $MgSO_4$, 50 mg PSA και 50 mg C18 / 1ml υπερκείμενου
- b) 300 mg του άνυδρου $MgSO_4$, 50 mg PSA και 50 mg C18/ 1ml υπερκείμενου
- c) 50 mg Z-sep⁺ / 1ml υπερκείμενου

Μετά την προσθήκη του 1ml στο φυγοκεντρικό σωλήνα των 15ml , ακολούθησε η προσθήκη των αλάτων καθαρισμού για την κάθε περίπτωση(a,b,c) και στη συνέχεια ανάδευση σε vortex για 1 λεπτό και φυγοκέντριση στις 4000 στροφές/λεπτό για 5 λεπτά. Τέλος 1ml του τελικού εκχυλίσματος διηθήθηκε μέσω φίλτρου σύριγγας και μεταφέρθηκε σε υάλινα φιαλίδια των 2ml με βιδωτά πώματα με septa τεφλόν-σιλικόνης , συμβατά με αυτόματους δειγματολήπτες για

τη χρωματογραφική ανάλυση. Τα τελικά εκχυλίσματα αναλύθηκαν με τη χρήση ενός συστήματος LC-HRMS που περιγράφεται στην ενότητα 5.4 .

4.4. ΑΝΑΛΥΣΗ LC-LTQ/ORBITRAP MS

Για την ανάλυση όλων των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε σύστημα UHPLC-LTQ/ORBITRAP MS. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με χρήση συστήματος Accela LC(Thermo Fisher Scientific , Bremen, Germany) , το οποίο περιλάμβανε αυτόματο δειγματολήπτη Accela AS (MODEL 2.1.1.) και αντλία Accela quaternary gradient LC. Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας ήταν σε σύζευξη με φασματομετρία μάζας LTQ Orbitrap XL 2.5.5 SP1(Thermo Fisher Scientific Inc. GmbH, Bremen, Germany). Ο αναλυτής μάζας Linear Ion Trap (LTQ) του υβριδικού συστήματος ήταν εξοπλισμένος με πηγή ιοντισμού Ηλεκτροψεκασμού (Electrospray Ionization, ESI) σε θετική λειτουργία. Για τον διαχωρισμό των χημικών ουσιών κατά τον έλεγχο των ύποπτων οργανικών ενώσεων που παρουσιάζουν ενδιαφέρον , χρησιμοποιήθηκε αναλυτική στήλη Thermo hypersil gold C18 αντίστροφης φάσης (100×2.1 mm , 1,9 μm , Bremen, Germany). Η κινητή φάση αποτελούνταν από τη φάση A (0,1% φορμικό οξύ σε νερό) και τη φάση B (0,1% φορμικό οξύ σε μεθανόλη), χρησιμοποιώντας μια τεχνική βαθμωτής έκλουσης που ξεκίνησε στο 98% της κινητής φάσης A(ΠΙΝΑΚΑΣ 7). Ο ρυθμός ροής καθορίστηκε στα 0,4ml / λεπτό , ενώ ο συνολικός χρόνος εκτέλεσης του προγράμματος ήταν 25 λεπτά. Ο όγκος έγχυσης ήταν 10 μL , με θερμοκρασίες δίσκου και φούρνου 15 και 40°C. Στο ΣΧΗΜΑ 12, παρουσιάζεται η ροή εργασίας του πειράματος.



ΣΧΗΜΑ 11: ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ ΤΟΥ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ

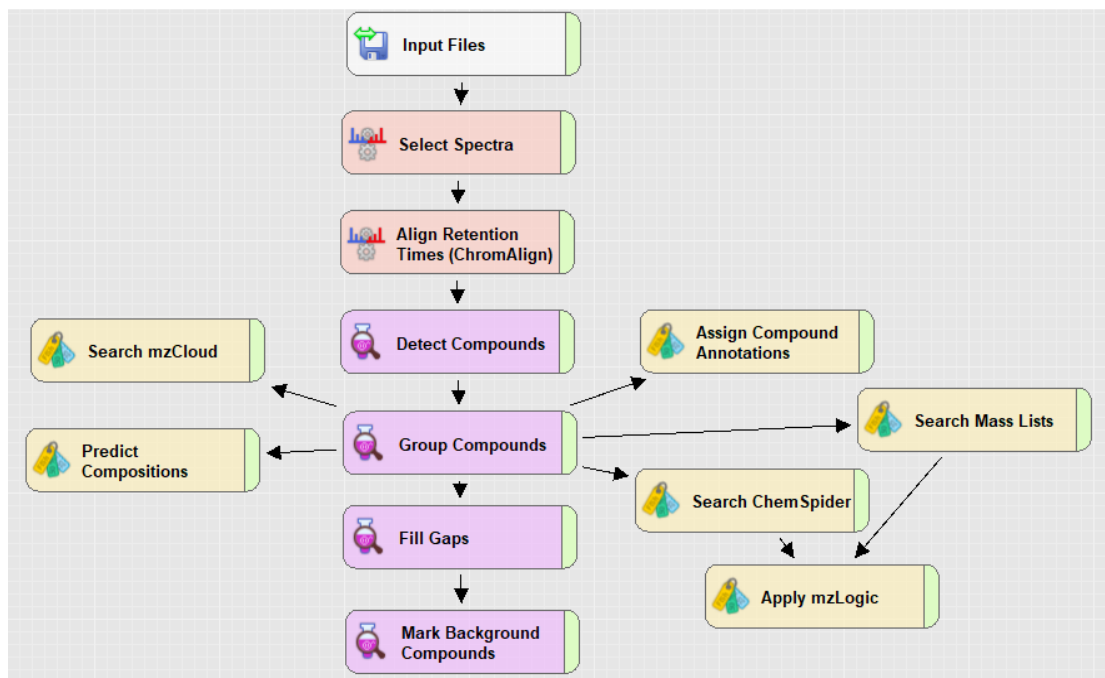
ΠΙΝΑΚΑΣ 7: ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΚΛΟΥΣΗΣ ΒΑΘΜΙΔΑΣ UHPLC ΚΑΙ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ (MS) ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ LTQ-ORBITRAP HRMS, ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΣΤΗΚΑΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΔΙΑΧΩΡΙΣΜΟ ΟΡΓΑΝΙΚΩΝ ΠΡΟΣΜΙΞΕΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΕΣ ΖΩΩΝ ΣΥΝΤΡΟΦΙΑΣ

ΧΡΟΝΟΣ (min)	A% (H ₂ O + 0.1 % FA)	B% (MeOH + 0.1 % FA)	ΡΥΘΜΟΣ ΡΟΗΣ (μL min ⁻¹)
0	98	2	400
2	98	2	400
18	2	98	400
20	2	98	400
20.1	98	2	400
25	98	2	400
ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ MS			
Spray Voltage (kV)			4.2
Resolution (FWHM)			60000
Capillary Voltage (V)			60
Tube lens (V)			80
Sealth gas (au)			55
Auxiliary gas (au)			35
Capillary temperature (°C)			340
Automatic Gain Control (AGC) target			8.00E+05

4.5. ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΩΣΕΩΝ

Τα δεδομένα από την LC-HRMS , υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με το λογισμικό Compound Discoverer 3.3 TM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ΗΠΑ, δοκιμαστική έκδοση) χρησιμοποιώντας μια προσαρμοσμένη ροή εργασίας (ΣΧΗΜΑ 13). Αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένας παράγοντας κατηγοριοποίησης για να γίνει διάκριση μεταξύ υγρών και ξηρών σκευασμάτων ζωοτροφών. Ανατέθηκαν τρεις τύποι δειγμάτων , που περιλάμβαναν έλεγχο ποιότητας για τα δείγματα που ταιριάζουν με τη υπόστρωμα , δείγμα για τα άγνωστα δείγματα και κενό για τα δείγματα διαλύτη. Εφαρμόστηκε ένα χρωματογραφικό όριο σήματος προς θόρυβο (S/N) 3 με σκοπό να ληφθούν υπόψιν όσο το δυνατόν περισσότερες ταυτοποιήσεις ενώ περιλήφθηκαν οι πρωτονιωμένες μορφές. Οι παράμετροι των συνδετικών κόμβων διατηρήθηκαν ως επί το πλείστον στην προεπιλεγμένη λειτουργία ή προσαρμόστηκαν όπως φαίνεται στον ΠΙΝΑΚΑ 9 , σύμφωνα με προηγούμενη μελέτη (225), εκτός από συγκεκριμένες αλλαγές που ήταν απαραίτητες για την μελέτη αυτή. Οι προσωρινές ταυτοποιήσεις χρησιμοποίησαν τον κόμβο «Assign Compound Annotations» , δηλαδή ανάθεση σχολίων ενώσεων με ανοχή μάζας 10ppm για τα πρόδρομα ιόντα και 300ppm για την αντιστοίχιση θραυσμάτων που ελήφθη στον αναλυτή μάζας χαμηλής ανάλυσης LTQ. Εφαρμόστηκε ένα ελάχιστο όριο έντασης 1×10^4 . Το ChemSpider χρησιμοποιήθηκε για αναζητήσεις μητρικής μάζας και στοιχειακής σύνθεσης ως πρόσθετη πηγή ταυτοποίησης. Ο κόμβος «Search Mass Lists» χρησιμοποιήθηκε με πολλές φορτωμένες λίστες μάζας , συμπεριλαμβανομένης μιας αυτοσχέδιας λίστας μάζας από προηγούμενη μελέτη με ύποπτα φυτοφάρμακα(201) , νέων λιστών που προσανατολίζονται σε φαρμακευτικά προϊόντα , συμπεριλαμβανομένων των κτηνιατρικών φαρμάκων, αλλά και μυκοτοξίνες που συντάχθηκαν από δεδομένα της βιβλιογραφίας σχετικά με μελέτες ζωοτροφών και της εγγενούς βάσης δεδομένων EFS HRAM Compound Database. Τα μοτίβα κατακερματισμού MS/MS συγκρίθηκαν χειροκίνητα με αυτά που ελήφθησαν από πρότυπα , ένα ήταν διαθέσιμα , είτε από ήδη υπάρχοντα δεδομένα σε διαδικτυακές και εμπορικά διαθέσιμες βάσεις δεδομένων (mz Cloud , βιβλιοθήκη NIST MS/MS), είτε από αναφερόμενα δεδομένα στη βιβλιογραφία , προκειμένου

να επιβεβαιωθούν προσωρινά οι ταυτοποιήσεις των ύποπτων ενώσεων. Τα πειραματικά ιόντα προϊόντων MS/MS και ο χρόνοι κατακράτησης που υποστηρίζουν κάθε σημείωση παρέχονται στον ΠΙΝΑΚΑ 8. Σύμφωνα με τους κανόνες Schymanski , αποδόθηκε ένα επίπεδο ταυτοποίησης σε κάθε ύποπτη ένωση. Ταυτοποιήσεις επιπέδου 1 , αποδόθηκαν μόνο όταν επιβεβαιώθηκαν με αυθεντικά πρότυπα αναφοράς που αναλύθηκαν υπό τις ίδιες συνθήκες. Οι σχολιασμοί επιπέδου 2 αναφέρθηκαν ως πιθανές δομές που υποστηρίζονται από ακριβή μάζα και στοιχεία MS/MS καθώς και τα αντίστοιχα πειραματικά ιόντα προϊόντων και οι χρόνοι κατακράτησης του ΠΙΝΑΚΑ 8. Κάθε υποψήφια ένωση ελέγχθηκε χειροκίνητα ως προς την αξιοπιστία του σχήματος της κορυφής και την καταλληλότητα για LC-MS. Σύμφωνα με τον ποιοτικό σχεδιασμό της μελέτης , δεν υπολογίστηκαν όρια ανίχνευσης ή ποσοτικοποίησης (LOD/LOQ) συγκεκριμένων ενώσεων , ανακτήσεις ή ακρίβεια (%RSD). Ως εκ τούτου η προτεινόμενη μεθοδολογία δεν επικυρώθηκε για στοχευμένους ποσοτικούς σκοπούς. Ωστόσο οι συνθήκες της εκχύλισης QuEChERS και LC-HRMS βασίστηκαν σε ένα προηγουμένως επικυρωμένο πρωτόκολλο πολλαπλών υπολειμμάτων για ζωοτροφές ιχθυοκαλλιέργειας(169) , όπου επιτεύχθηκαν όρια ανίχνευσης μεθόδου στην περιοχή 0,2-15 ng/g και όρια ποσοτικοποίησης στην περιοχή 0,5-50ng/g για αντιπροσωπευτικά φυτοφάρμακα και φαρμακευτικά προϊόντα με ανακτήσεις γενικά εντός 70-120% και ακρίβεια (RSD%) κάτω του 20%.



ΣΧΗΜΑ 12: ΕΞΑΤΟΜΙΚΕΥΜΕΝΗ ΡΟΗ ΕΡΓΑΣΙΑΣ (CUSTOM WORKFLOW) ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ COMPOUND DISCOVERER 3.3 ΓΙΑ ΤΗ ΣΑΡΩΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (SUSPECT SCREENING) ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ.

ΠΙΝΑΚΑΣ 8: ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΣΤΟΧΕΥΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΜΕΣΩ ΥΗPLC-LTQ-ORBITRAP-MS

ΕΝΩΣΕΙΣ(ΠΡΟΚΑΤΑΡΤΙΚΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΕΣ)	ΠΡΩΤΟΝΙΟΜΕΝΟ ΜΟΡΙΟ	ΜΕΣΟ ΣΦΑΛΜΑ (ppm)	ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ m/z	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ MS/MS ΘΡΑΥΣΜΑΤΩΝ ΙΟΝΤΩΝ(NCE 35%)	ΧΡΟΝΟΣ ΚΑΤΑΚΡΑΤΗΣΗΣ, Rt (min)	ΕΠΙΠΕΔΟ ΕΜΠΙΣΤΟΣΥΝΗΣ*	ΑΝΑΦΟΡΕΣ
Aclonifen	[M+H] ⁺	2.72	265.0374	248.2, 264.9	11.04	2	Pubchem, MassBank, NIST
Aflatoxin B1	[M+H] ⁺	0.09	313.0707	285.1, 298.0	12.5	2	mzCloud, MassBank, NIST
Aflatoxin B2	[M+H] ⁺	0.63	315.0863	287.1, 297.2	13.2	2	mzCloud, MassBank, NIST
Aflatoxin G1	[M+H] ⁺	1.64	329.0656	311.0, 283.2	9.21	2	mzCloud, MassBank, NIST
Aflatoxin G2	[M+H] ⁺	-3.42	331.0812	313.0, 303.2	12.52	2	mzCloud, MassBank, NIST
Aflatoxin P1	[M+H] ⁺	-0.55	299.0542	271.1	12.89	2	Pubchem, (5)
Alternariol	[M+H] ⁺	-4.31	259.0601	241.0, 259.0	10.11	1	Standard
Alternariolmethylether	[M+H] ⁺	-0.09	273.0757	241.0, 2558.1	11.41	2	mzCloud, MassBank, NIST
Atrazine-desethyl	[M+H] ⁺	3.27	188.0697	146.1	5.25	2	mzCloud, MassBank, NIST
Bupirimate	[M+H] ⁺	-1.28	317.1646	237.3, 272.3	13.57	1	Standard
Citrinin	[M+H] ⁺	-1.48	233.0808	205.1, 147.0	7.43	1	Standard

Diacetoxyscirpenol	[M+H] ⁺	-4.09	349.1646	349.2	12.27	2	mzCloud, MassBank, NIST
Enniatin B	[M+H] ⁺	-0.07	640.4166	527.3, 427.4	17.08	2	mzCloud, MassBank, NIST
Esculetin	[M+H] ⁺	-0.12	179.0337	151.1, 161.1	13.88	2	mzCloud, MassBank, NIST
Eugenol	[M+H] ⁺	-0.19	165.091	137.2, 119.2	21.16	2	mzCloud, MassBank, NIST
Flutriafol	[M+H] ⁺	4.41	302.1098	284.2	17.67	1	Standard
Formononetin	[M+H] ⁺	-0.61	269.0808	254.0, 237.1	7.69	2	mzCloud, MassBank, NIST
Fumagilin	[M+H] ⁺	3.58	459.2362	177.2	8.99	2	NIST,(5)
Genistein	[M+H] ⁺	0.76	433.1132	153.0, 215.1	9.13	2	mzCloud, MassBank, NIST
HT-2-Toxin	[M+H] ⁺	-4.22	425.2164	365.4	17.23	1	Standard
Pirimiphos-methyl	[M+H] ⁺	-1.4	306.1038	278.2, 164.1	15.08	1	Standard
Pyrogallol	[M+H] ⁺	-1.29	127.039	109.1, 95.1	9.7	2	mzCloud, MassBank, NIST
Quercetin	[M+H] ⁺	-4.42	303.0499	285.0, 257.1	10.26	2	mzCloud, MassBank, NIST
Quercitrin	[M+H] ⁺	-0.36	449.108	325.0	10.31	2	mzCloud, MassBank, NIST
Sparfloxacin	[M+H] ⁺	-2.23	393.1744	349.3, 393.1	8.08	2	mzCloud, NIST
T-2-Toxin	[M+H] ⁺	-3.61	467.227	467.2, 365.2	14.64	1	Standard

T-2-Triol	[M+H] ⁺	-2.28	383.2064	327.2, 365.2	16.65	2	(5)
Tridemorph	[M+H] ⁺	-0.16	298.3121	130.1, 144.1	19.2	1	Standard
Zearalenone	[M+H] ⁺	-1.88	301.1434	301.1, 283.1	14.21	1	Standard

*Επίπεδα εμπιστοσύνης σύμφωνα με τους (Schymanski et al., 2014): Το **1** αντιστοιχεί σε ταυτοποιήσεις που επιβεβαιώθηκαν μέσω σύγκρισης των φασμάτων MS/MS πρότυπων διαλυμάτων. Το **2** αντιστοιχεί σε ταυτοποιήσεις που επιβεβαιώθηκαν μέσω σύγκρισης των φασμάτων MS/MS με φάσματα MS/MS από διαδικτυακές (π.χ. mzCloud™) ή εσωτερικές (in-house spectral library) φασματικές βιβλιοθήκες.

ΠΙΝΑΚΑΣ 9: ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΤΟΥ ΛΟΓΙΣΜΙΚΟΥ COMPOUND DISCOVERER 3.3 TM

Select Spectra (1)	
1. Spectrum Properties Filter	
Lower RT Limit	0.3
Upper RT Limit	23
2. Scan Event Filters	
Polarity Mode Is	+
Align Retention Times (Chromalign) (2)	
1. General Settings	
Reference File	STD pest_25ppb
Detect Compounds (3)	
1. General Settings	
Mass Tolerance	10 ppm
Min. Peak Intensity	10000
Use Most Intense Isotope Only	True
3. Peak Detection	
Chromatographic S/N Threshold	3
Remove Baseline	True
5. Compound Detection	
Ions	[M+H] ⁺ , [M+Na] ⁺
Group Compounds (4)	
1. General Settings	

Mass Tolerance	10 ppm
Align Peaks	True
Preferred Ions	[M+H] ⁺¹ , [M+Na] ⁺¹
3. Peak Rating Filter	
Peak Rating Threshold	6
Number of Files	2
Search mzCloud (9)	
1. General Settings	
Compound Classes	Illegal Additives; Industrial Chemicals; Natural Toxins; Perfluorinated Hydrocarbons; Pesticides/Herbicides
Library	Autoprocessed; Reference
Search MSn Tree	False
2. DDA Search	
Identity Search	HighChem HighRes
Match Activation Type	True
Match Activation Energy	Match with Tolerance
Activation Energy Tolerance	35
Apply Intensity Threshold	False
Similarity Search	Similarity Reverse
Match Factor Threshold	40
Search Mass Lists (10)	

Mass Lists	EFS HRAM Compound Database/Import from literature /Pest &TPs (custom list)
Use Retention Time	False
Mass Tolerance	10 ppm
Assign Compound Annotations (7)	
1. General Settings	
Mass Tolerance	10 ppm
Predict Compositions (8)	
1. Prediction Settings	
Mass Tolerance	10 ppm
3. Fragments Matching	
Use Fragments Matching	True
Mass Tolerance	300 ppm
S/N Threshold	3
Fill Gaps (5)	
2.General Settings	
Mass Tolerance	10 ppm
S/N Threshold	3
Mark Background Compounds (6)	
1. General Settings	
Max. Sample/Blank	5

4.6. ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Πραγματοποιήθηκε διερευνητική ανάλυση δεδομένων για τις προσωρινά προσδιοριζόμενες ενώσεις με βάση τα αποτελέσματα HRMS. Για κάθε κατηγορία ρύπου (μυκοτοξίνες, φυτοφάρμακα, κτηνιατρικά φάρμακα, φυτικοί βιοδραστικοί μεταβολίτες) , καταγράφηκε ο αριθμός των διαφορετικών ενώσεων που ανιχνεύτηκαν ανά δείγμα , ως μέτρο της χημικής ποικιλομορφίας. Όλες οι στατιστικές αναλύσεις διεξήχθησαν χρησιμοποιώντας την πλατφόρμα βιοπληροφορικής SRPlot(226) . Χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής συσχέτισης Σπίαρμαν για την αξιολόγηση των σχέσεων μεταξύ των μεταβλητών της θρεπτικής σύνθεσης (περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες ,υγρασία και λίπος εκφρασμένη ως %w/w/) και της ποικιλομορφίας της κατηγορίας των ρύπων (εκφρασμένη ως αριθμός ανιχνεύσεων ανά δείγμα) , εφαρμόζοντας ένα όριο σημαντικότητας $p < 0,05$. Διενεργήθηκε ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA) σε τυποποιημένα δεδομένα (με μέση κλίμακα και κλίμακα μονάδας διακύμανσης) για την αξιολόγηση της δομής διακύμανσης του συνόλου δεδομένων. Ο αριθμός των συνιστωσών που διατηρήθηκαν και η διακύμανση ακολούθησαν τις προεπιλεγμένες παραμέτρους SRPlot για τον υπολογισμό των ιδιοτιμών και τη δημιουργία biplot.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1. ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΕΝΑΛΛΑΚΤΙΚΩΝ ΑΛΑΤΩΝ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗ ΣΑΡΩΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Οι επιδράσεις της υποστρώματος κατά την ανάλυση ζωοτροφών δύναται να επηρεάσουν καθοριστικά τόσο τη χρωματογραφική απόδοση όσο και την ανίχνευση μέσω φασματομετρίας μάζας , ιδίως σε μεθόδους σάρωσης ύποπτων ενώσεων, όπου εξετάζονται ταυτόχρονα ενώσεις με ετερογενείς φυσικοχημικές ιδιότητες και διαφορετικές συμπεριφορές ιονισμού. Ως εκ τούτου , πριν από την

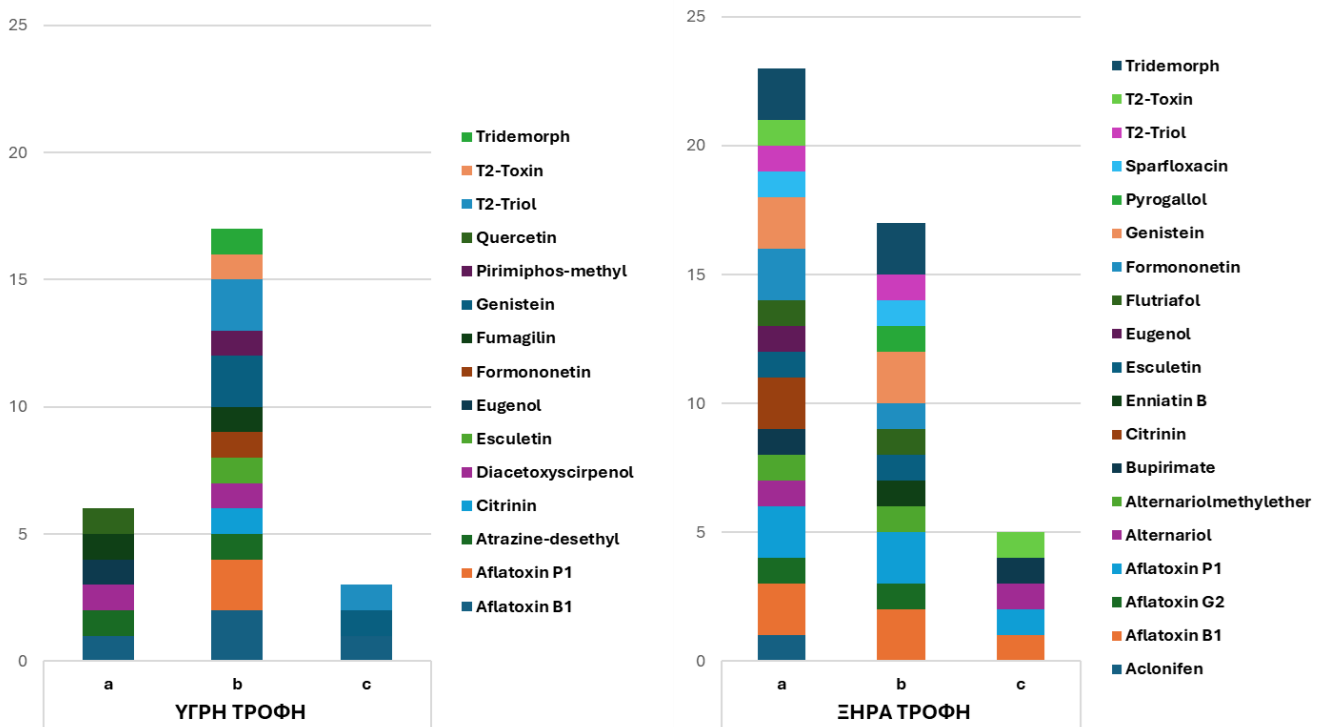
κύρια ανάλυση επιλέχθηκε το καταλληλότερο στάδιο καθαρισμού , με στόχο τη μείωση των παρεμβολών και τη βελτίωση της συνολικής αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου. Μέσω της σύγκρισης παραδοσιακών μιγμάτων προσροφητικών υλικών με μια νεότερη εναλλακτική προσέγγιση , η ανάπτυξη της μεθόδου αποσκοπούσε στον προσδιορισμό του πλέον κατάλληλου πρωτοκόλλου καθαρισμού για της απαιτητικές μήτρες ξηρών και υγρών ζωοτροφών για κατοικίδια ζώα. Στη μελέτη αυτή αξιολογήθηκαν τρεις συνδυασμοί καθαρισμού με διασπειρόμενη στερεά φάση εκχύλισης (dSPE) , οι οποίοι περιλάμβαναν τόσο συμβατικές όσο και εναλλακτικές μεθοδολογίες όπως αναφέρθηκε.

Τα εξεταζόμενα πρωτόκολλα ήταν:

- a) 150 mg του άνυδρου $MgSO_4$, 50 mg PSA και 50 mg C18
- b) 300 mg του άνυδρου $MgSO_4$, 50 mg PSA και 50 mg C18
- c) 50 mg Z-sep⁺

Οι εν λόγω συνδυασμοί χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να διερευνηθεί η επίδραση της ποσότητας του άλατος και των προσροφητικών υλικών στην ποιότητα των εκχυλισμάτων. Η αξιολόγηση των εναλλακτικών πρωτοκόλλων καθαρισμού βασίστηκε στην αναμενόμενη επίδραση τους στη χρωματογραφική καθαρότητα , στη μείωση των παρεμβολών που σχετίζονται με τη υπόστρωμα και στην αξιοπιστία της ταυτοποίησης των αναλυτών. Οι τρεις συνδυασμοί εφαρμόστηκαν σε έξι δείγματα ζωοτροφών : τρεις ξηρές συνθέσεις (περιεκτικότητα σε υγρασία 6-15%) και τρεις υγρές συνθέσεις (78-85% υγρασία). Η αποτελεσματικότητα κάθε συνδυασμού αξιολογήθηκε με βάση τον συνολικό αριθμό και τη χημική ποικιλομορφία των ενώσεων που ανιχνεύθηκαν μέσω ροών εργασίας σάρωσης ύποπτων ενώσεων. Ο καθαρισμός των υγρών τροφών με 300 mg άνυδρου $MgSO_4$, 50 mg PSA και 50 mg C₁₈ (πρωτόκολλο b) παρείχε τα βέλτιστα αποτελέσματα με συνολική βαθμολογία 17 ταυτοποιήσεων , επιτρέποντας την ανίχνευση αναλυτών σε όλες τις κατηγορίες συμπεριλαμβανομένων μυκοτοξινών , φυτοφαρμάκων ,φυτικών μεταβολιτών και φαρμακευτικών ουσιών. Αντιθέτως το πρωτόκολλο (a) , που αποτελεί παραλλαγή του (b) πρωτοκόλλου , που περιείχε μειωμένη ποσότητα $MgSO_4$ απέδωσε βαθμολογία 6 , περιοριζόμενη κυρίως σε μικρό αριθμό μυκοτοξινών και δευτερογενών φυτικών μεταβολιτών , ενώ το

πρωτόκολλο (c) με το Z sep⁺ παρουσίασε την χαμηλότερη αποτελεσματικότητα (βαθμολογία 3) , με σποραδική ανίχνευση ενώσεων από διακριτές χημικές κατηγορίες. Όσον αφορά τις ξηρές τροφές η βέλτιστη απόδοση επιτεύχθηκε με το μείγμα με 150 mg άνυδρου MgSO₄ , 50 mg PSA και 50 mg C₁₈ (πρωτόκολλο a) οδήγησε στη μέγιστη βαθμολογία με 23 ταυτοποιήσεις , καλύπτοντας εκτενώς φάσμα ενώσεων που αφορούν μυκοτοξίνες , φυτοφάρμακα , φυτικοί μεταβολίτες και φαρμακευτικές ουσίες. Η χρήση 300 mg άνυδρου MgSO₄ , 50 mg PSA και 50 mg C₁₈ (πρωτόκολλο b) επέφερε μείωση της απόδοσης , με 17 ταυτοποιήσεις , περιορίζοντας τη χημική ποικιλομορφία των ταυτοποιημένων ενώσεων , ενώ το Z sep⁺ (πρωτόκολλο c) αποδείχθηκε ανεπαρκές με 5 ταυτοποιήσεις κυρίως σε περιορισμένο βαθμό μυκοτοξινών. Συνολικά φαίνεται ότι ο συνδυασμός MgSO₄ /PSA / C₁₈ υπερέχει του Z-Sep⁺ και για τους δύο τύπους ζωοτροφών. Ωστόσο , η βέλτιστη ποσότητα MgSO₄ εξαρτήθηκε από τα χαρακτηριστικά της υποστρώματος. Στις ζωοτροφές υψηλής υγρασίας με αυξημένη ποσότητα MgSO₄ ενισχύθηκε η αφυδάτωση και ήταν δυνατή η εκχύλιση ενός ευρύτερου φάσματος ρυπαντών , ενώ στις ξηρές τροφές , οι χαμηλότερες συγκεντρώσεις MgSO₄ διατήρησαν μεγαλύτερη χημική ποικιλομορφία χωρίς σημαντική απώλεια αναλυτών. Το ΣΧΗΜΑ 14, συνοψίζει τα ευρήματα αυτά , υποδεικνύοντας το βέλτιστο πρωτόκολλο για κάθε τύπο ζωοτροφής.



ΣΧΗΜΑ 13: ΑΡΙΘΜΟΣ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΤΗΚΑΝ ΣΕ ΥΓΡΕΣ ΚΑΙ ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΩΝΤΑΣ ΤΡΕΙΣ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥΣ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥΣ D-SPE (Α :150 ΜG ΑΝΥΔΡΟΥ MgSO₄ , 50 ΜG PSA ΚΑΙ 50 ΜG C18 , Β: 300 ΜG ΑΝΥΔΡΟΥ MgSO₄ , 50 ΜG PSA ΚΑΙ 50 ΜG C18 ,C: 50 ΜG Z-SEP+)

5.2. ΣΑΡΩΣΗ ΥΠΟΠΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Η παρούσα μελέτη περιέλαβε εκτενή διερεύνηση ρυπαντών σε εμπορικά διαθέσιμες ξηρές και υγρές τροφές για σκύλους και γάτες. Ποικίλες ενώσεις συμπεριλαμβανομένων μυκοτοξινών, φυτοφαρμάκων, φαρμακευτικών/κτηνιατρικών ουσιών και φυτικής προέλευσης βιοδραστικών μεταβολιτών, ταυτοποιήθηκαν προκαταρκτικά στη μεγάλη πλειονότητα των δειγμάτων μέσω της στρατηγικής σάρωσης ύποπτων ενώσεων, αναδεικνύοντας διακριτά ποιοτικά πρότυπα ανίχνευσης μεταξύ ξηρών και υγρών σκευασμάτων (ΠΙΝΑΚΑΣ 10). Η επιμέρους εξέταση κάθε κατηγορίας ρυπαντών υπογραμμίζει τις δυνητικές επιπτώσεις στην υγεία των ζώων συντροφιάς, λαμβάνοντας υπόψη ότι η πραγματική έκθεση και η εκτίμηση του κινδύνου δεν δύναται να συναχθούν ελλείψει προσοχής και επιβεβαίωσης. Συνολικά 29 ενώσεις ταυτοποιήθηκαν

προκαταρκτικά σε 65 δείγματα , αντιστοιχώντας σε 186 μοναδικές ανιχνεύσεις . Στον ΠΙΝΑΚΑ 11 περιλαμβάνονται ο συνολικός αριθμός ταυτοποιήσεων, η κατανομή μεταξύ υγρών και ξηρών ζωοτροφών, η συχνότητα ανίχνευσης στο σύνολο των δεδομένων (n = 65 δείγματα), το επίπεδο εμπιστοσύνης κατά Schymanski και οι πηγές αναφοράς που χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση, όπως οι βάσεις δεδομένων mzCloud (πρόσβαση στις 29 Δεκεμβρίου 2025), MassBank (πρόσβαση στις 29 Δεκεμβρίου 2025), PubChem (πρόσβαση στις 29 Δεκεμβρίου 2025), το λογισμικό NIST MS Search (Έκδοση 3.0 build 18 Απριλίου 2023) και ερευνητικές εργασίες (227). Οι ξηρές τροφές (DD για ξηρά τροφή σκύλου και DC για ξηρά τροφή γάτας) αντιπροσώπευαν το 65,6% των συνολικών ανιχνεύσεων, ενώ οι υγρές τροφές (WD για υγρή τροφή σκύλου και WC για υγρή τροφή γάτας) περιείχαν το υπόλοιπο 34,4% (ΣΧΗΜΑ 15 & 16). Οι μυκοτοξίνες αναδείχθηκαν ως οι πλέον διαδεδομένοι ρυπαντές καθώς ανιχνεύθηκαν στο 76,9% των δειγμάτων και στο 95% των ξηρών σκευασμάτων , γεγονός που καταδεικνύει την ευαισθησία των συστατικών που προέρχονται από πρώτες ύλες δημητριακών. Η αφλατοξίνη B1 αποτέλεσε τη συχνότερα ανιχνεύσιμη μυκοτοξίνη , καθώς ταυτοποιήθηκε σε 22 δείγματα και ήταν παρούσα στο 71,4 % των ξηρών τροφών σκύλου και στο 28% των κηρών τροφών γάτας. Επιπλέον , άλλες μυκοτοξίνες όπως η κιτρινίνη , η HT-2 τοξίνη, και οι τοξίνες του γένους *Aspergillus* συνέβαλαν ουσιαστικά στο συνολικό προφίλ επιμόλυνσης. Παράλληλα υπολείμματα φυτοφαρμάκων ανιχνεύθηκαν στο 72% των ξηρών ζωοτροφών , ενώ μόλις στο 11% των υγρών , γεγονός που υποδηλώνει ότι τα εν λόγω υπολείμματα σχετίζονται με τις πρακτικές καλλιέργειας και αποθήκευσης των σιτηρών. Μεταβολίτες φυτικής προέλευσης , όπως φλαβονοειδή και φυτοιστρογόνα , συμπεριλαμβανομένων της γενιστεΐνης και της φορμονεΐνης , ανιχνεύθηκαν στο 51% των δειγμάτων. Η παρουσία βοτανικών συστατικών σε συνδυασμό με μυκοτοξίνες και φυτοφάρμακα περιπλέκει την κατηγοριοποίηση του κινδύνου σε συγκεκριμένες κατηγορίες ενώσεων και υποδηλώνει πιθανή ορμονική σημασία , ιδίως για τις γάτες , οι οποίες εμφανίζουν περιορισμένη μεταβολική ικανότητα ανοχής σε τέτοιου είδους ενώσεις. Ωστόσο, λόγω έλλειψης ποσοτικών δεδομένων έκθεσης δεν δύναται να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα σχετικά με τον πραγματικό ορμονικό κίνδυνο. Στα ΣΧΗΜΑΤΑ 17,18 παρουσιάζεται

η τυπική ταυτοποίηση μέσω σάρωσης ύποπτων ενώσεων ,που πραγματοποιήθηκε με σύγκριση φασμάτων MS² στη βάση δεδομένων mzCloud είτε με αντιστοίχιση στη βιβλιοθήκη φασμάτων NIST MS². Σε πολλές περιπτώσεις επιτεύχθηκε σύγκριση και με τις δύο βάσεις , γεγονός που οδήγησε σε υψηλότερο επίπεδο αξιοπιστίας των ταυτοποιήσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 10: ΠΡΩΤΟΓΕΝΗ ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ ΑΝΑ ΤΥΠΟ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ ΔΕΙΓΜΑ (ΔΕΔΟΜΕΝΑ ΠΡΟΕΡΧΟΜΕΝΑ ΑΠΟ ΤΑ 65 ΑΝΑΛΥΘΕΝΤΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ (D= ΞΗΡΗ ΤΡΟΦΗ, W = ΥΓΡΗ ΤΡΟΦΗ)).

	Aclo nifen	Afla toxin B1	Afla toxin B2	Afla toxin G1	Afla toxin G2	Aflat oxin P1	Alt erriol	Altern ariolm ethyl ther	Atra zine- dese thyl	Bu piri ma te	Ci tri ni n	Diac etoxy scirp enol	En nia tin B	Esc ule tin	E u ge nol
Συνολικ ές ανιχνεύ σεις (D+W)	2	22	1	2	3	13	7	3	5	1	13	2	4	4	3
Ποσοστ ό (65)	3.08 %	33.85 %	1.54 %	3.08 %	4.62 %	20.00 %	10.77 %	4.62 %	7.69 %	1.54 %	20.00 %	3.08 %	6.15 %	6.15 %	4.62 %
Υγρές τροφές	1	9	0	2	0	3	7	0	3	1	1	0	1	0	1
Ποσοστ ό σε υγρές τροφές	2.27 %	20.45 %	0.00 %	4.55 %	0.00 %	6.82 %	15.91 %	0.00 %	6.82 %	2.27 %	2.27 %	0.00 %	2.27 %	0.00 %	2.27 %
Ξηρές τροφές	1	13	1	0	3	10	0	3	2	0	12	2	3	4	2
Ποσοστ ό σε ξηρές τροφές	5.26 %	68.42 %	5.26 %	0.00 %	15.79 %	52.63 %	0.00 %	15.79 %	10.53 %	0.00 %	63.16 %	10.53 %	15.79 %	21.05 %	10.53 %
	Fl utria fol	For mon etin	Fu magi lin	Ge nis tein	HT- 2- Tox in	Pirim ipho s- meth yl	Py ro gal lol	Quer etin	Quer citri n	Sp arfl oxa cin	T- 2- Tri iol	T-2- Toxin	Tri de mor ph	Ze ara len one	
Συνολικ ές ανιχνεύ σεις (D+W)	3	14	2	25	20	3	1	4	2	3	10	2	11	1	
Ποσοστ ό (65)	4.62 %	21.54 %	3.08 %	38.46 %	30.77 %	4.62 %	1.54 %	6.15 %	3.08 %	4.62 %	15.38 %	3.08 %	16.92 %	1.54 %	
Υγρές τροφές	0	1	0	8	14	0	0	4	2	0	4	2	0	0	
Ποσοστ ό σε υγρές τροφές	0.00 %	2.27 %	0.00 %	18.18 %	31.82 %	0.00 %	0.00 %	9.09 %	4.55 %	0.00 %	9.09 %	4.55 %	0.00 %	0.00 %	
Ξηρές τροφές	3	13	2	17	6	3	1	0	0	3	6	0	11	1	
Ποσοστ ό σε ξηρές τροφές	15.79 %	68.42 %	10.53 %	89.47 %	31.58 %	15.79 %	5.26 %	0.00 %	0.00 %	15.79 %	31.58 %	0.00 %	57.89 %	5.26 %	

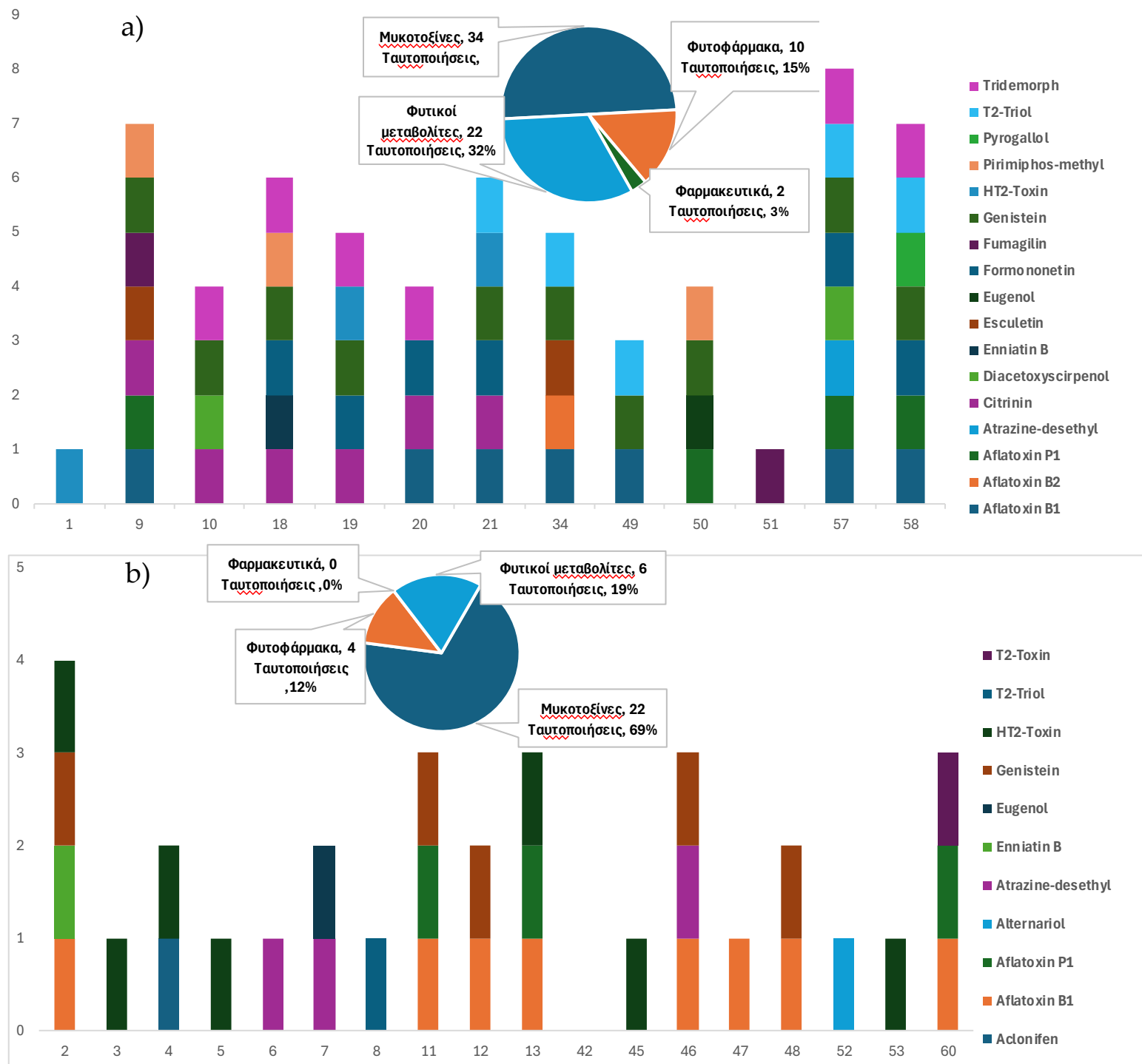
ΠΙΝΑΚΑΣ 11: ΣΥΝΟΠΤΙΚΗ ΠΑΡΟΥΣΙΑΣΗ ΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΠΡΟΣΩΡΙΝΑ ΣΕ ΕΜΠΟΡΙΚΕΣ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΓΑΤΑΣ ΚΑΙ ΣΚΥΛΟΥ ΜΕΣΩ ΣΑΡΩΣΗΣ ΥΠΟΠΤΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ (SUSPECT SCREENING) ΜΕ LC-LTQ/ORBITRAP HRMS.

ΕΝΩΣΗ	ΣΥΝΟΛΙΚΟΣ ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΕΩΝ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΣΕ ΥΓΡΗ ΤΡΟΦΗ	ΑΡΙΘΜΟΣ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΕΩΝ ΣΕ ΞΗΡΑ ΤΡΟΦΗ	ΣΥΧΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ % ¹	SCHYMANSKI LEVELS ²	REFERENCES
Aclonifen	2	1	1	3.1%	2	Pubchem, MassBank, NIST
Aflatoxin B1	22	9	13	33.8%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Aflatoxin B2	1	0	1	1.5%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Aflatoxin G1	2	2	0	3.1%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Aflatoxin G2	3	0	3	4.6%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Aflatoxin P1	13	3	10	20.0%	2	Pubchem, (227)
Alternariol	7	7	0	10.8%	1	Standard
Alternariolmethyl ether	3	0	3	4.6%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Atrazine-desethyl	5	3	2	7.7%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Bupirimate	1	1	0	1.5%	1	Standard
Citrinin	13	1	12	20.0%	1	Standard
Diacetoxyscirpenol	2	0	2	3.1%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Enniatin B	4	1	3	6.2%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Esculetin	4	0	4	6.2%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Eugenol	3	1	2	4.6%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Flutriafol	3	0	3	4.6%	1	Standard

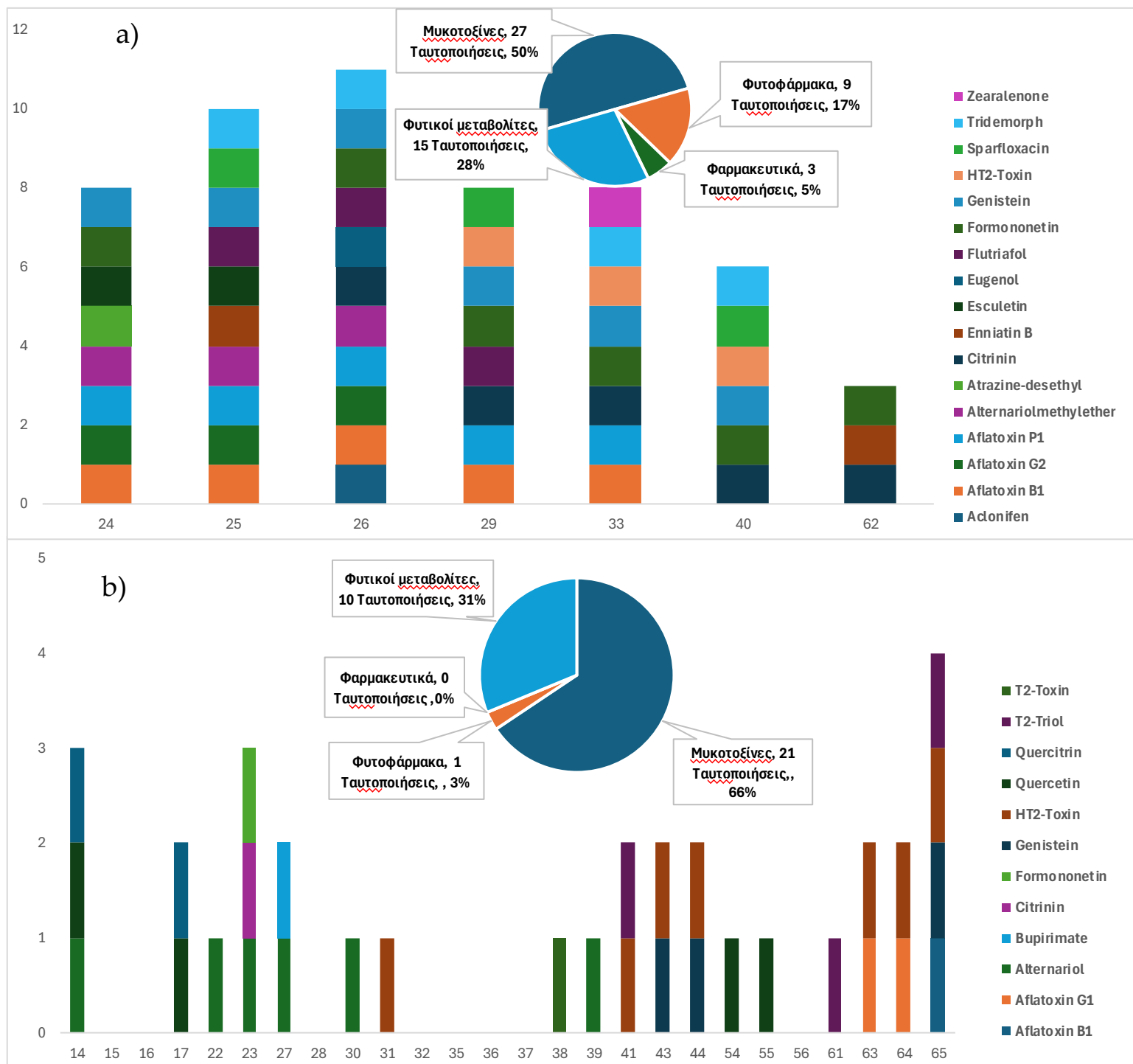
Formononetin	14	1	13	21.5%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Fumagilin	2	0	2	3.1%	2	NIST ,(227)
Genistein	25	8	17	38.5%	2	mzCloud, MassBank, NIST
HT-2-Toxin	20	14	6	30.8%	1	Standard
Pirimiphos-methyl	3	0	3	4.6%	1	Standard
Pyrogallol	1	0	1	1.5%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Quercetin	4	4	0	6.2%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Quercitrin	2	2	0	3.1%	2	mzCloud, MassBank, NIST
Sparfloxacin	3	0	3	4.6%	2	mzCloud, NIST
T-2-Toxin	10	4	6	15.4%	1	Standard
T-2-Triol	2	2	0	3.1%	2	(227)
Tridemorph	11	0	11	16.9%	1	Standard
Zearalenone	1	0	1	1.5%	1	Standard

¹ Συχνότητα ανίχνευσης (%) υπολογίζεται ως (αριθμός δειγμάτων που ανιχνεύθηκε η ίδια ένωση/65 συνολικά δείγματα) × 100

² Τα επίπεδα Schymaski αποδίδονται σύμφωνα με τους κανόνες Schymaski και αντικατοπτρίζουν την εμπιστοσύνη στην ταυτοποίηση (Επίπεδο 1:επιβεβαιωμένη δομή με πρότυπο αναφοράς , Επίπεδο 2:πιθανή δομή βάσει διαγνωστικών αποδείξεων)



ΣΧΗΜΑ 14: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ ,ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ ,ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ (Α): ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΣΚΥΛΟΥ ΚΑΙ (Β) ΥΓΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΣΚΥΛΟΥ (ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΥΝ ΤΟΝ ΑΙΡΘΜΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΑΝΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΡΥΠΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΟΜΑΔΑ ΤΡΟΦΩΝ).



ΣΧΗΜΑ 15: ΣΥΓΚΡΙΤΙΚΗ ΚΑΤΑΝΟΜΗ ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΩΝ, ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΩΝ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΟΥΣΙΩΝ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΣΕ (Α): ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΓΑΤΑΣ ΚΑΙ (Β) ΥΓΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ ΓΑΤΑΣ (ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΥΝ ΤΟΝ ΑΙΡΘΜΟ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΠΟΥ ΑΝΙΧΝΕΥΘΗΚΑΝ ΑΝΑ ΚΑΤΗΓΟΡΙΑ ΡΥΠΩΝ ΣΕ ΚΑΘΕ ΟΜΑΔΑ ΤΡΟΦΩΝ).

5.2.1. ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ

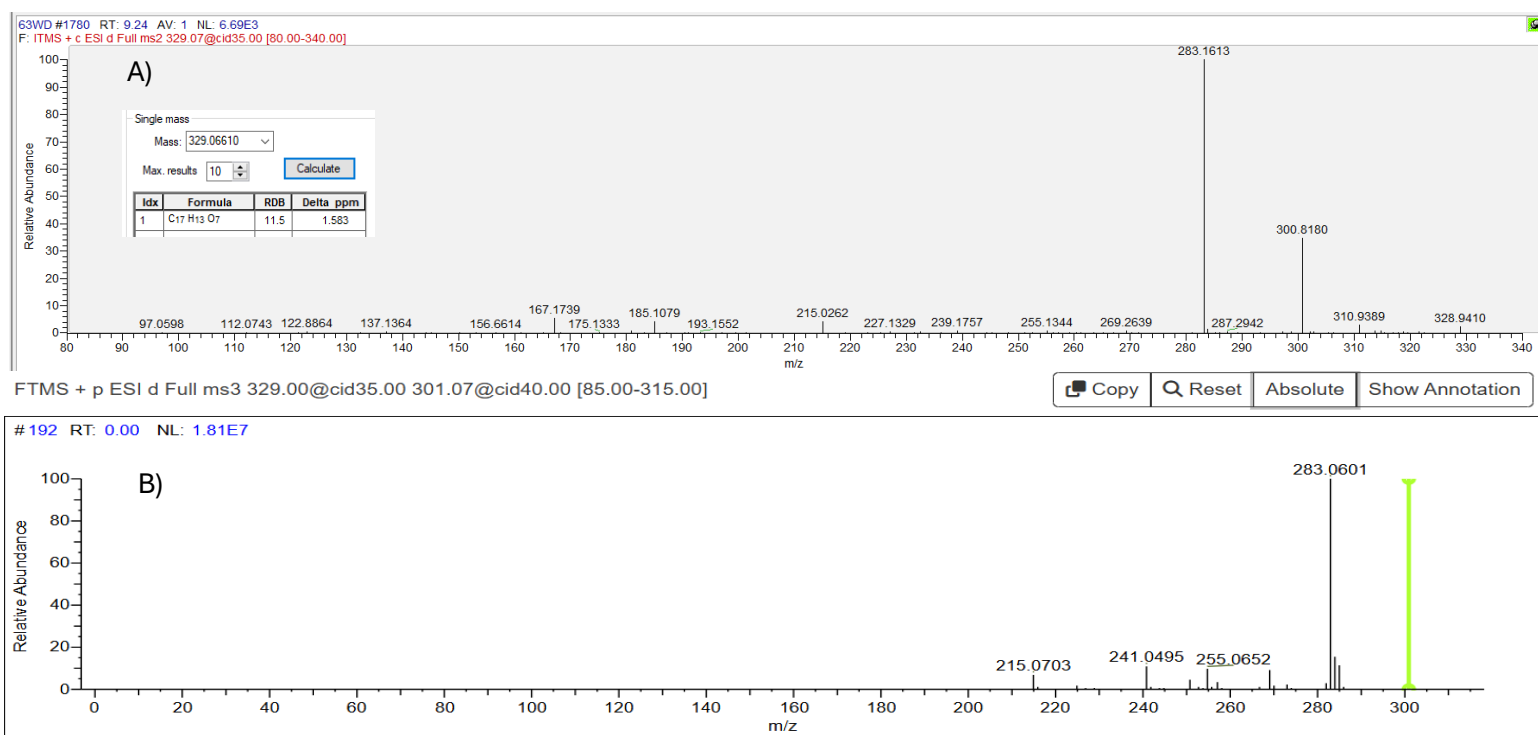
Μυκοτοξίνες όπως οι αφλατοξίνες (B1,B2,G1,G2) , οι τοξίνες T-2 και HT-2 , η κιτρινίνη και η διαιθυλοξικριπενόλη ταυτοποιήθηκαν υποθετικά στο 76,9% των συνολικών δειγμάτων . Ειδικότερα , οι ξηρές ζωοτροφές των σκύλων (DD) παρουσίασαν μεγάλο αριθμό αφλατοξινών σε 9 από τα 14 δείγματα. Οι αφλατοξίνες θεωρούνται εξαιρετικά επικίνδυνες για τους σκύλους όσο και για τις γάτες , καθώς πρωτίστως βλάπτουν τη λειτουργία του ήπατος και μπορούν να προκαλέσουν καρκινογένεση με παρατεταμένη έκθεση αλλά γιατί επιπλέον αυτές οι ουσίες συνδέονται συνήθως με δημητριακά .Οι γάτες παράλληλα , λόγω των περιορισμένων ικανοτήτων αποτοξίνωσής τους εκδηλώνουν ιδιαίτερη ευαισθησία στις μυκοτοξίνες ακόμη και σε χαμηλές ποσότητες. (5,91,228). Ωστόσο απουσιάζει η Ωχροτοξίνη Α από τα αποτελέσματα διερεύνησης. Παρά την υψηλή επικινδυνότητα και συχνότητα εμφάνισης στις ζωοτροφές. Λόγω της χημικής της δομής , επειδή περιέχει στο μόριο της καρβοξυλικής ομάδας εμφανίζει βέλτιστο βαθμό ιονισμού σε αρνητική λειτουργία (ESI-). Ωστόσο οι αναλύσεις διεξήχθησαν σε θετική λειτουργία ιονισμού(ESI+) , όπως φαίνεται από τον προσδιορισμό των [M+H]⁺ στον ΠΙΝΑΚΑ 8. Συνεπώς , η χαμηλή ευαισθησία της μεθόδου σε θετικό ιονισμό ενδέχεται να περιορίσει την ανίχνευσή της σε επίπεδα κάτω από τα όρια της τρέχουσας ροής εργασίας. Επίσης η ανίχνευση μυκοτοξινών της ομάδας των τριχοθηκενών , όπως η T-2 και HT-2 , μαζί με αφλατοξίνες σε σχεδόν όλες τις ξηρές τροφές των γατών , υποδηλώνει τη μόλυνση κατά την καλλιέργεια των δημητριακών , καθώς αυτές οι ουσίες παράγονται από μύκητες του είδους *Fusarium* και συνδέονται στενά με την καλλιέργεια δημητριακών σε συνθήκες υγρασίας και κρύου(229–231). Η υψηλή ανθεκτικότητα των μυκοτοξινών σε διεργασίες επεξεργασίας και την αποθήκευσης καθιστά επιτακτική την ανάγκη για προσεκτική επιλογή στην προμήθεια των πρώτων υλών για την παραγωγή τροφών κατοικίδιων , ιδιαίτερα για τις τροφές σκύλων που συνήθως περιέχουν μεγαλύτερες ποσότητες σε δημητριακά σχετικά με τις τροφές των γατών. Η εφαρμογή συστηματικού ελέγχου και η χρήση υψηλής ποιότητας πρώτων υλών μπορεί να περιορίσει σημαντικά αυτούς τους κινδύνους , δεδομένου ότι οι μυκοτοξίνες επιβιώνουν καθ' όλη τη διαδικασία παραγωγής των

τροφίμων και δεν απομακρύνονται εύκολα. Συνολικά η αφλατοξίνη B1 ήταν η συχνότερη και ανιχνεύθηκε σε 22 δείγματα (33,8%) , ακολουθούμενη από την HT-2 τοξίνη (30,8%) και την αφλατοξίνη P1 (20,0%). Η συνύπαρξη ήταν συχνή , με 6 δείγματα να περιέχουν τουλάχιστον 4 διαφορετικές μυκοτοξίνες , κυρίως σε ξηρές τροφές γατών και σκύλων , υποδεικνύοντας τον κίνδυνο σωρευτικών τοξικών επιδράσεων .

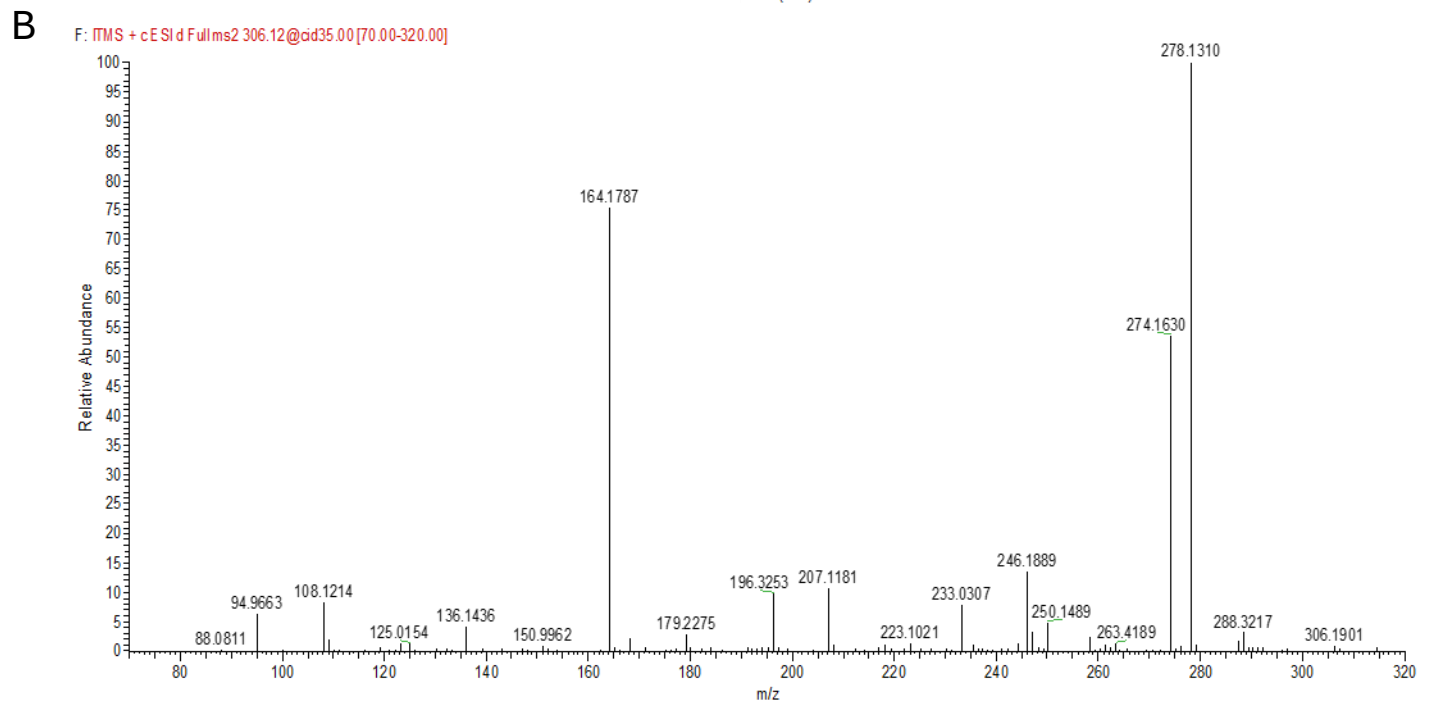
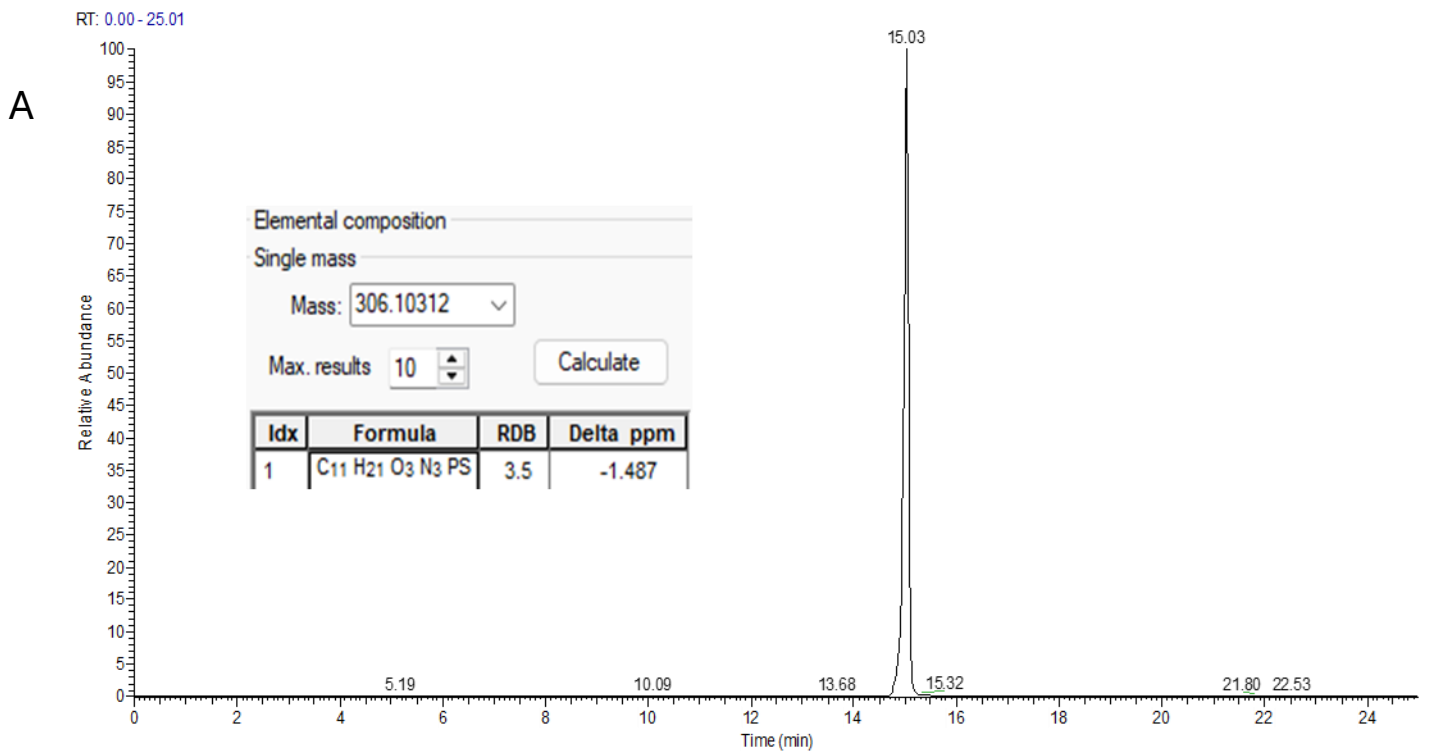
5.2.2. ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ

Υπολείμματα φυτοφαρμάκων , όπως η ακλονιφένη (Aclonifen) , η διαιθυλική ατραζίνη (Atrazine-desethyl) , η τριδεμόρφη (Tridemorph) και η πιριμιφός-μεθυλιο(pirimiphos-methyl), ανιχνεύθηκαν πρωτίστως σε δείγματα ξηρών τροφών , με το 71,5% των ξηρών προϊόντων τροφών να περιέχει τουλάχιστον ένα φυτοφάρμακο. Τα φυτοφάρμακα ανιχνεύθηκαν σποραδικά στο 11% των υγρών τροφών χωρίς να παρατηρηθεί κάποιο συγκεκριμένο μοτίβο, πιθανώς λόγω διαφορετικών μεθόδων επεξεργασίας. Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι οι πρώτες ύλες των ξηρών τροφών αποτελούν πιθανές πηγές υδάτινης ή εδαφικής μόλυνσης ή προέρχονται άμεσα από τα φυτικά συστατικά των τροφών , δεδομένου ότι πρόκειται για ευρέως χρησιμοποιούμενα φυτοφάρμακα στη γεωργία για την προστασία των καλλιεργειών(59,169). Ένας επιπλέον σημαντικός παράγοντας ανίχνευσης αυτών των φυτοφαρμάκων, είναι η χρήση τους κατά τη την επεξεργασία και αποθήκευση ζωοτροφών. Φυτοφάρμακα όπως η πιριμιφός-μεθυλιο (pirimiphos-methyl), χρησιμοποιούνται και έχουν ανιχνευθεί επανειλημμένως σε δείγματα ιχθυοτροφών , υποδεικνύοντας τη χρήση τους για συντήρηση τροφίμων ή τον έλεγχο των παρασίτων κατά την αποθήκευση(169,232,233). Η χρόνια έκθεση κατοικίδιων σε χαμηλές δόσεις φυτοφαρμάκων μπορεί να προκαλέσει ενδοκρινικές διαταραχές, καταστολή του ανοσοποιητικού , οξεία δηλητηρίαση και μακροπρόθεσμες παθολογικές επιπλοκές όπως νεφροπάθεια και καρκινογένεση(161,234). Τα κατοικίδια λόγω της κατανάλωσης σχεδόν σε καθημερινή βάση ,της ίδιας τροφής, συσσωρεύουν υπολείμματα , ενισχύοντας το κίνδυνο για την ασφάλεια της υγείας τους λόγω βιομεγέθυνσης . Οπότε ακόμη και ελάχιστες συγκεντρώσεις συγκεντρώσεις φυτοφαρμάκων ενδέχεται να ενισχύσουν τους κινδύνους , δικαιολογώντας την

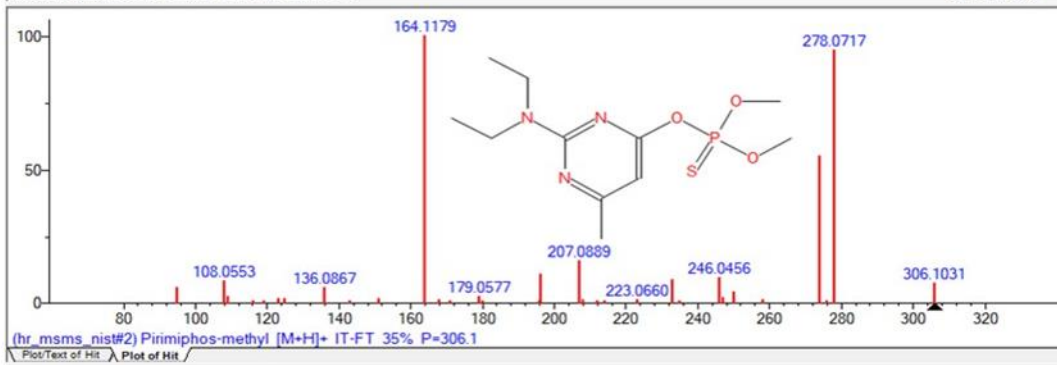
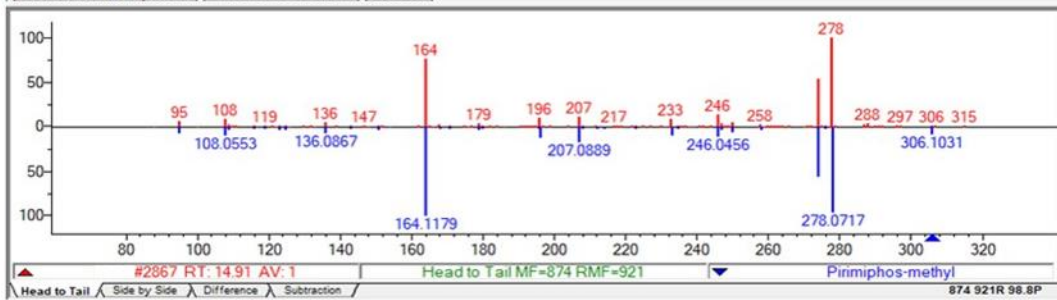
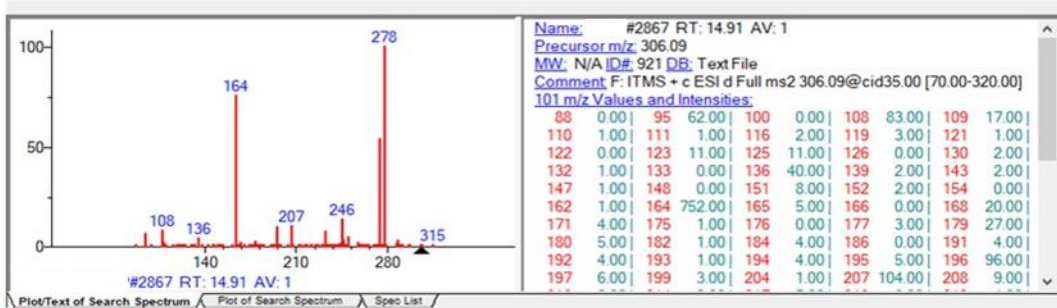
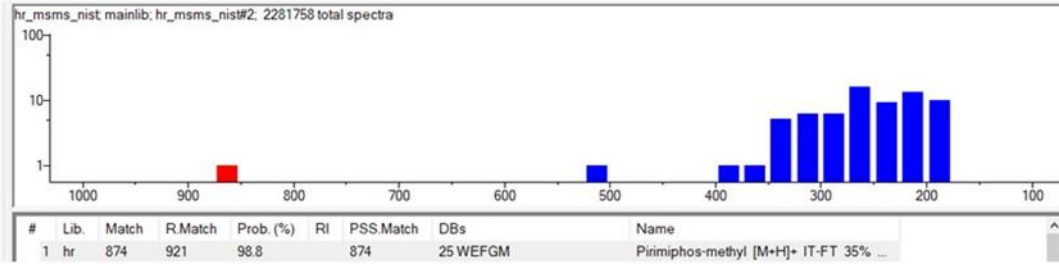
προτεραιότητα για στοχευμένη παρακολούθηση με ποσοτικές μεθόδους σε υλικά που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των ζωοτροφών κατοικίδιων(234,235). Η πιο συχνά ανιχνευθείσα ουσία ήταν η τριδεμόρφη(Tridemorph) (16,9%) , ακολουθούμενη από την διαιθυλική ατραζίνη(Atrazine-desethyl) (7,7%) και την πιριμιφος-μεθυλιο (pirimiphos-methyl) (4,6%). Επιπλέον σε χαμηλότερο ποσοστά ανιχνεύθηκαν η ακλονιφένη (Acclonifen) , το Bupirimate και το Flutriafol. Είναι αξιοσημείωτο ότι η ακλονιφένη και η διαιθυλική ατραζίνη αποτελούν ζιζανιοκτόνα που σχετίζονται με την καλλιέργεια αραβοσίτου και άλλων δημητριακών, ενώ η πιριμιφος-μεθύλιο και η bupirimate αποτελούν εντομοκτόνα/μυκητοκτόνα ευρέως χρησιμοποιούμενα κατά την αποθήκευση των σιτηρών ,γεγονός που ενισχύει την υπόθεση ότι η επιμόλυνση προέρχεται τόσο από το αγρόκτημα όσο και από τα στάδια μετά τη συγκομιδή.



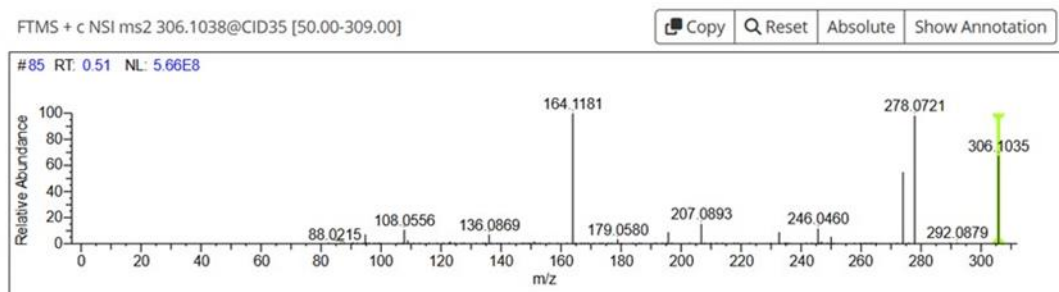
ΣΧΗΜΑ 16: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΦΛΑΤΟΞΙΝΗΣ G1 ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΗPLC-LTEQ/ORBITRAP HRMS. (A) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ MS², (B) ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ MZCLOUD



C



D



ΣΧΗΜΑ 17: ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΠΙΡΙΜΙΡΗΟΣ-ΜΕΤΗΛ ΣΕ ΖΩΟΤΡΟΦΕΣ ΚΑΤΟΙΚΙΔΙΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΥΗPLC-LTEQ/ΟΡΒΙΤΡΑΡ ΗRMS. (Α) ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑ ΕΞΑΧΘΕΝΤΟΣ ΙΟΝΤΟΣ (ΕΙC), (Β) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΦΑΣΜΑ MS², (Γ) ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΣΩ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗ NIST, (Δ) ΕΠΙΒΕΒΑΙΩΣΗ ΜΕΣΩ ΦΑΣΜΑΤΙΚΗΣ ΣΥΓΚΡΙΣΗΣ ΜΕ ΤΗ ΒΑΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ MZCLOUD

5.2.3. ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΠΡΟΪΟΝΤΑ

Οι λίστες υποψήφίων φαρμακευτικών ουσιών (suspect lists) , συμπεριλαμβανομένων των κτηνιατρικών φαρμάκων και υπολειμμάτων αντιβιοτικών , αποκάλυψαν την παρουσία sparfloxacin , ενός φθοριοκινολονικού αντιβιοτικού , το οποίο ταυτοποιήθηκε υποθετικά σε 3 δείγματα βάσει των HRMS φασματοσκοπικών δεδομένων καθώς και του Fumagillin υποθετικά σε 2 δείγματα. Η εμφάνιση των φαρμακευτικών προϊόντων στις τροφές των κατοικίδιων μπορεί να προέρχεται από πρώτες ύλες κρέατος ή άλλων ζωικής προέλευσης προϊόντων που έχουν υποβληθεί σε θεραπεία με αντιβιοτικά, όπως το Fumagillin ,που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία λοιμώξεων από μικροσπορίδια σε παραγωγικά ζώα, είτε από μεταφορά των φαρμάκων ,όταν ένα σκεύασμα που χρησιμοποιείται στην παρασκευή μια φαρμακευτικής τροφής , για την οποία το φάρμακο έχει εγκριθεί και περιλαμβάνεται κατά λάθος σε μια επόμενη παρτίδα τροφής(169,171,236,237). Επιπλέον το sparfloxacin , χρησιμοποιείται για τη θεραπεία ασθενειών , που μπορούν να προάγουν την ανάπτυξη αντιβιοτικής αντοχής σε σκύλους με παρατεταμένη έκθεση, συνιστώντας κίνδυνο για τη δημόσια υγεία , ανάλογο με τα συστήματα ανθρώπινης διατροφής(238,239). Παρά το γεγονός ότι τα φαρμακευτικά προϊόντα αντιπροσωπεύουν μόνο το 3% των συνολικών ανιχνεύσεων , η εμφάνισή τους σε ξηρές τροφές υπογραμμίζει μια πιθανή οδό μόλυνσης που απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση και στοχευμένη ανάλυση.

5.2.4. ΦΥΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ

Ενώσεις όπως η εσκουλετίνη , η γενιστεΐνη , η φορμονονετίνη , η κερκετίνη , κερκιτρίνη , η πυρογαλλόλη και η ευγενόλη ανιχνεύθηκαν στο 51% των δειγμάτων των ζωοτροφών. Η γενιστεΐνη και η φορμονονετίνη αποτελούν φυτοιστρογόνα , δηλαδή ενώσεις φυτικής προέλευσης που μιμούνται τη δράση των οιστρογόνων στους οργανισμούς. Παρόλο που οι ενώσεις αυτές απαντώνται φυσικά , ενδέχεται να παρουσιάζουν αθροιστικές-σωρευτικές επιδράσεις με τοξικολογική σημασία , λόγω της ενδοκρινικής δραστηριότητας που αναφέρεται στη βιβλιογραφία, για σκύλους ,γάτες και ιδιαίτερα σε στειρωμένα ζώα με πιθανώς διαταραγμένη

ορμονική ισορροπία(240) . Η παρουσία αυτών των ενώσεων υποδηλώνει ότι τα συστατικά φυτικής προέλευσης , όπως τα όσπρια ή τα δημητριακά , χρησιμοποιούνται ως συμπληρώματα στα γεύματα των κατοικιδίων και ενδέχεται να εισάγουν ακούσια αυτούς τους μεταβολίτες(241,242). Τα υποχρεωτικά σαρκοφάγα , όπως οι γάτες , διαθέτουν περιορισμένη ικανότητα πέψης ουσιών φυτικής προέλευσης , και τα οιστρογόνα ενδέχεται να διαταράξουν την αναπαραγωγική υγεία και τον ορμονικό έλεγχο(243). Αυτό υπογραμμίζει την ανάγκη για σχολαστική εξισορρόπηση των φυτικών συστατικών στη διατροφή των αιλουροειδών , προκειμένου να αποφευχθούν δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία. Όσον αφορά τη συχνότητα ανίχνευσης ,ενώσεις όπως η γενιστεΐνη (38,5%) και η φορμονονετίνη (21,5%) ανιχνεύθηκαν με τη μεγαλύτερη συχνότητα, ακολουθούμενες από την κερσετίνη και την εσκουλετίνη (6,2% η καθημία). Σε μικρότερα ποσοστά εντοπίστηκαν η κερσιτρίνη, ευγενόλης και πυρογαλλόλης. Σε ορισμένα δείγματα , η συγκεκριμένη κατηγορία ενώσεων ανιχνεύθηκε παράλληλα με παρασιτοκτόνα και μυκοτοξίνες, καθιστώντας δυσχερή τον ακριβή προσδιορισμό της πηγής προέλευσής τους και απαιτεί περαιτέρω αναλυτική διερεύνηση.

5.3. ΠΟΛΥΠΑΡΑΓΟΝΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ ΚΑΙ ΤΟΥ ΠΡΟΦΙΛ ΤΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ

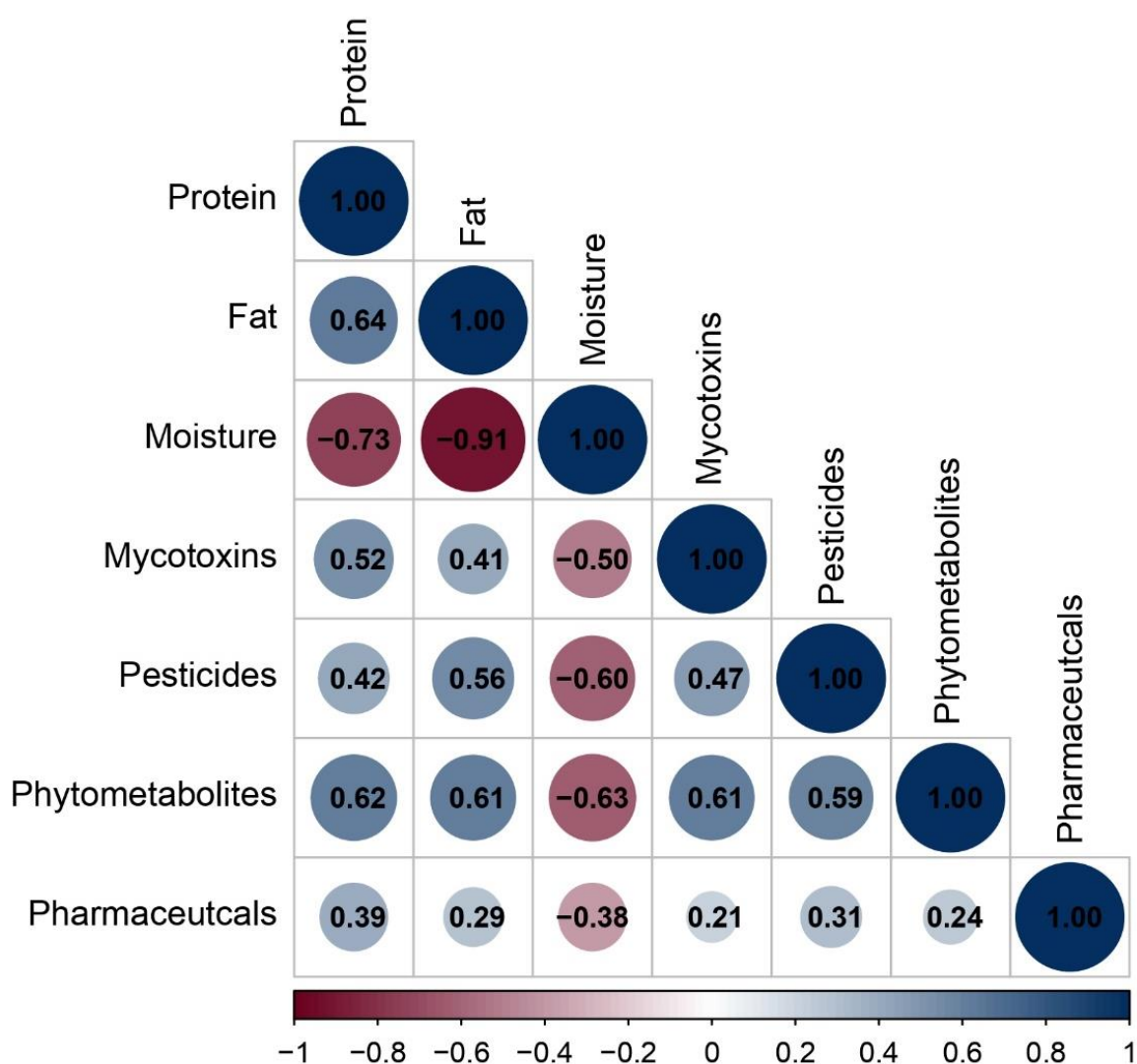
5.3.1. ΑΝΑΛΥΣΗ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΜΕΤΑΞΥ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ

Η ανάλυση συσχέτισης κατά Spearman ($p < 0,05$) αποκάλυψε σχετικές μεταξύ των κατηγοριών επιμολυντών και της θρεπτικής σύστασης των ζωοτροφών (ΣΧΗΜΑ 19 και ΠΙΝΑΚΑΣ 12). Τα υπολείμματα παρασιτοκτόνων ($r=0,56$) και οι φυτικοί μεταβολίτες ($r=0,61$) συσχετίστηκαν θετικά με την περιεκτικότητα σε λίπος, ενώ ταυτόχρονα εμφάνισαν αρνητικές συσχετίσεις με την υγρασία ($r = -0,60$ και $-0,63$ αντίστοιχα). Αυτές οι παρατηρήσεις συνάδουν με τον διαμερισμό που καθοδηγείται από τη λιποφιλία, καθώς πολλές ενώσεις αυτών των κατηγοριών παρουσιάζουν υψηλές τιμές LogK_{ow} και ως εκ τούτου, κατανέμονται κατά προτίμηση στα κλάσματα λιπιδίων. Οι μυκοτοξίνες συσχετίστηκαν θετικά με τους φυτικούς μεταβολίτες ($r=0,61$) και τα παρασιτοκτόνα ($r=0,47$). Αυτή η συσχέτιση αντανακλά πιθανώς την κοινή γεωργική τους προέλευση, καθώς τόσο οι μυκοτοξίνες όσο και οι φυτικοί μεταβολίτες προέρχονται από τα συστατικά των ζωοτροφών που είναι φυτικής προέλευσης (δημητριακά, όσπρια). Η συνύπαρξη πολλαπλών μυκοτοξινών στις ζωοτροφές έχει αναφερθεί ευρέως στη βιβλιογραφία, όπως και η παρουσία τους σε παρτίδες ζωοτροφών μαζί με φυτικούς μεταβολίτες και ενώσεις που σχετίζονται με παρασιτοκτόνα (56,149). Οι συσχετίσεις που αφορούν φαρμακευτικές ουσίες είναι γενικά ασθενέστερες, ($r=0,21-0,39$). Αυτό εξηγείται από το γεγονός ότι οι φαρμακευτικές ουσίες καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα ιδιοτήτων και συχνά εμφανίζονται σποραδικά, μετά από στοχευμένη θεραπεία των ζώων. Συνεπώς η παρουσία τους ποικίλει περισσότερο ανάλογα με συγκριμένα συστατικά προέλευσης παρά με τη συνολική σύσταση (bulk) του δείγματος. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι εμπορικές ξηρές τροφές κατοικίδιων με χαμηλή υγρασία είναι συνήθως πιο πλούσιες σε δημητριακά. Αντίθετα, οι υγρές τροφές με υψηλή υγρασία βασίζονται κυρίως στο κρέας και είναι πτωχές σε δημητριακά. Έτσι οι μυκοτοξίνες, οι οποίες μεταφέρονται κυρίως μέσω δημητριακών, τείνουν να είναι περισσότερες σε αριθμό όταν η υγρασία είναι χαμηλότερη, απλώς και μόνο επειδή τα προϊόντα αυτά περιέχουν

περισσότερα φυτικά συστατικά , οδηγώντας σε αρνητική συσχέτιση με την υγρασία ($r = -0,50$).

Συνολικά τα αποτελέσματα της συσχέτισης συνάδουν με:

1. Τα χαρακτηριστικά της σύστασης της υποστρώματος των ζωοτροφών
2. Τον διαμερισμό των προσωρινά ταυτοποιημένων ενώσεων στο κλάσμα του λίπους λόγω λιποφιλίας
3. Την κοινή γεωργική προέλευση των φυτικών βιοδραστικών ενώσεων στα συστατικά των ζωοτροφών



ΣΧΗΜΑ 19: ΧΑΡΤΗΣ ΘΕΡΜΟΤΗΤΑΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ ΚΑΤΑ SPEARMAN ($p < 0,05$) ΠΟΥ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΕΙ ΤΙΣ ΤΑΣΕΙΣ ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΕΝΔΕΙΚΤΙΚΑ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΤΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ. Η ΕΝΤΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΩΜΑΤΟΣ ΑΝΤΙΚΑΤΟΠΤΡΙΖΕΙ ΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΚΑΙ ΤΟ ΠΡΟΗΜΟ ΤΟΥ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ R ΤΟΥ SPEARMAN.

Αυτά τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η θρεπτική σύσταση των τροφών για κατοικίδια επηρεάζει σημαντικά την ποικιλομορφία ανίχνευσης (τον αριθμό των προσωρινά ταυτοποιημένων ενώσεων) , η οποία αποτελεί δείκτη τόσο της προέλευσης των πρώτων υλών , όσο και των μεθόδων επεξεργασίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ 12: ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΕΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ (ΤΙΜΕΣ R) ΜΕΤΑΞΥ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ ΩΣ ΠΑΡΑΜΕΤΡΟΙ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΤΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ

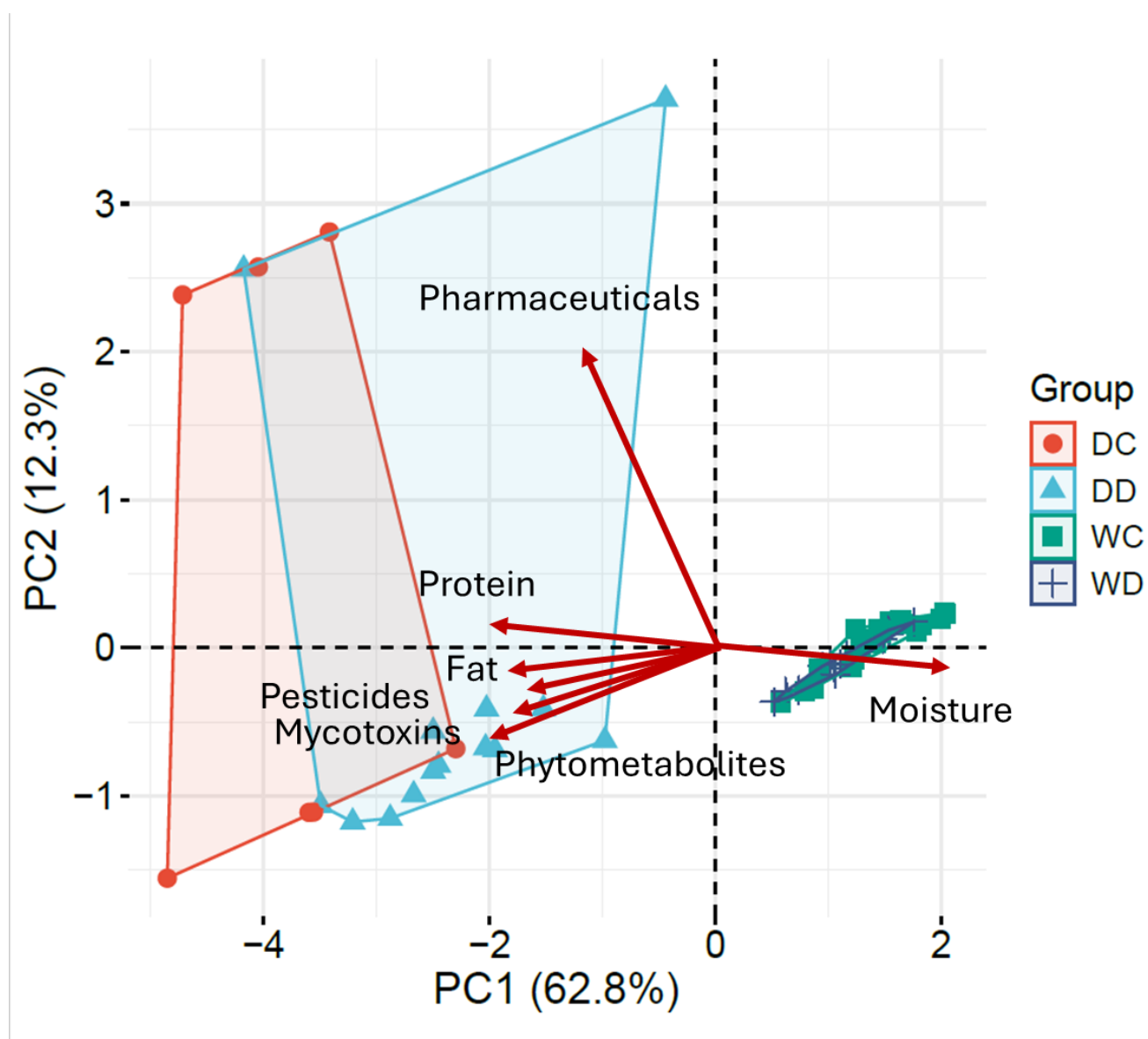
Παράμετρος	Μυκοτοξίνες	Φυτοφάρμακα	Φαρμακευτικά	Φυτικοί Μεταβολίτες
Πρωτεΐνη (%)	0.52	0.42	0,39	0,62
Λίπος(%)	0,41	0.56	0,29	0,61
Υγρασία(%)	-0.50	-0.60	-0,38	-0,63

5.3.2. ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PCA) ΣΥΣΤΑΣΗΣ-ΕΠΙΜΟΛΥΝΣΗΣ

Η ανάλυση Κύριων Συνιστωσών (PCA) , χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της σχέσης μεταξύ της σύστασης των ζωοτροφών και της εμφάνισης διαφορετικών κατηγοριών επιμολυντών (ΠΙΝΑΚΑΣ 13). Οι τρεις πρώτες συνιστώσες ερμήνευσαν το 86,8% της συνολικής διασποράς , με PC1 να περιγράφει το 62,85% , την PC2 το 12,35% και την PC3 το 11,61% της μεταβλητότητας (ΣΧΗΜΑ 20). Στο biplot , η συμβολή κάθε μεταβλητής στο επίπεδο PC1- PC2 αντιπροσωπεύεται από το μήκος του διανύσματος , ενώ η κατεύθυνση αντικατοπτρίζει την συσχέτιση κάθε μεταβλητής με τους άξονες και τις υπόλοιπες μεταβλητές. Η πρώτη κύρια συνιστώσα , PC1 , αντιπροσώπευε το 62,85% της συνολικής μεταβλητότητας , αντιπαραβάλλοντας την υγρασία (η οποία εμφάνισε ισχυρή θετική φόρτιση-loading) με τα φορτία λίπους, πρωτεΐνης και υπολειμμάτων (αρνητικές φορτίσεις-loadings). Κατά συνέπεια , οι υγρές ζωοτροφές (WD/WC) ομαδοποιήθηκαν στο θετικό τμήμα της PC1 , ενώ οι ξηρές στο αρνητικό.

ΠΙΝΑΚΑΣ 13: ΦΟΡΤΙΣΕΙΣ PCA ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ

ΜΕΤΑΒΛΗΤΕΣ	PC1 (62.85%)	PC2 (12.35%)	PC3 (11.61%)
ΠΡΩΤΕΙΝΗ	0.82	-0.11	0.09
ΛΙΠΟΣ	0.41	-0.21	0.79
ΥΓΡΑΣΙΑ	-0.32	0.84	0.26
ΜΥΚΟΤΟΞΙΝΕΣ	0.88	-0.14	0.12
ΦΥΤΟΦΑΡΜΑΚΑ	0.79	-0.18	0.22
ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ	-0.29	0.81	0.27
ΦΥΤΙΚΟΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΕΣ	0.46	0.21	0.74



ΣΧΗΜΑ 20:ΑΝΑΛΥΣΗ ΚΥΡΙΩΝ ΣΥΝΙΣΤΩΣΩΝ (PCA) ΚΑΙ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΦΟΡΤΙΣΕΩΝ (LOADING PLOTS) ΠΟΥ ΑΠΕΙΚΟΝΙΖΟΥΝ ΤΗ ΣΥΜΒΟΛΗ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ :PC1 (62,8%) ΚΑΙ PC2 (12,3%)· ΟΙ ΤΙΜΕΣ ΤΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ (SCORES) ΕΙΝΑΙ ΧΡΩΜΑΤΙΣΜΕΝΕΣ ΑΝΑΛΟΓΑ ΜΕ ΤΟΝ ΤΥΠΟ ΤΗΣ ΖΩΟΤΡΟΦΗΣ (ΞΗΡΗ/ΥΓΡΗ, ΓΑΤΑΣ/ΣΚΥΛΟΥ), ΕΝΩ ΤΑ ΚΟΚΚΙΝΑ ΔΙΑΝΥΣΜΑΤΑ ΑΝΤΙΠΡΟΣΩΠΕΥΟΥΝ ΤΙΣ ΦΟΡΤΙΣΕΙΣ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΚΑΤΗΓΟΡΙΩΝ ΕΠΙΜΟΛΥΝΤΩΝ.

Γεγονός που υποδηλώνει ένα σαφή διαχωρισμό μεταξύ τους. Η σύμπτωση (co-alignment) των διανυσμάτων λίπους, πρωτεΐνης, παρασιτοκτόνων, μυκοτοξινών και φυτικών μεταβολιτών υποδεικνύει ότι οι πρώτες ύλες με βάση τα δημητριακά και η περιεκτικότητα σε λίπος αποτελούν τους κύριους καθοριστικούς παράγοντες του προφίλ επιμόλυνσης των ξηρών σκευασμάτων. Μέσα σε αυτή τη δομή, δείγματα που χαρακτηρίζονταν από υψηλά επίπεδα πρωτεΐνης ομαδοποιούνταν σε σταθερά αρνητική περιοχή της PC1 και σχετίζονταν με μεγαλύτερο αριθμό των ενδεικτικά ταυτοποιημένων μυκοτοξινών, όπως η αφλατοξίνη B1 και η κιτρινίνη. Τα ευρήματα αυτά ήταν σύμφωνα με την παρουσία φυτικών συστατικών στις ξηρές τροφές. Η PC2 (12,3%) καθορίστηκε κυρίως από τη μεταβλητότητα των φαρμακευτικών ουσιών με θετική φόρτιση, ενώ οι υπόλοιπες μεταβλητές εμφάνισαν φορτίσεις πλησίον του μηδενός. Αυτό το πρότυπο υπογραμμίζει την μάλλον σποραδική και σε μεγάλο βαθμό ανεξάρτητη από τη συνολική σύσταση εμφάνιση αυτών των ενώσεων. Το biplot της PCA επικύρωσε με σαφήνεια τον διαχωρισμό μεταξύ ξηρών και υγρών σκευασμάτων και ευθυγραμμίστηκε με την ανάλυση συσχέτισης: η θρεπτική σύσταση των τροφών για κατοικίδια αποτελεί τον κύριο καθοριστικό παράγοντα της κατανομής των επιμολυντών, με εξαίρεση τις φαρμακευτικές ουσίες που εμφανίζουν συμπεριφορά ανεξάρτητη από τη σύσταση. Η κατηγοριοποίηση των δειγμάτων με βάση τον τύπο της ζωοτροφής και το προφίλ των επιμολυντών καταδεικνύει ότι η προέλευση των πρώτων υλών και οι διαδικασίες επεξεργασίας κρίνονται ουσιώδεις για την διαμόρφωση των προτύπων επιμόλυνσης.

5.4. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΜΕΤΑΞΥ ΤΥΠΩΝ ΖΩΟΤΡΟΦΩΝ

5.4.1. ΞΗΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ

Οι ξηρές τροφές περιέχουν ένα ευρύ φάσμα ρύπων, συμπεριλαμβανομένων των παρασιτοκτόνων, μυκοτοξινών, φαρμακευτικών ουσιών και βιοδραστικών μεταβολιτών φυτικής προέλευσης (ΣΧΗΜΑ 15 & 16). Πιο αναλυτικά, οι μυκοτοξίνες αποτέλεσαν την ομάδα ενώσεων που ταυτοποιήθηκε πιο συχνά στα ξηρά δείγματα τροφών, με ποσοστό 95%, υποδηλώνοντας την παρουσία δημητριακών που έχουν επιμολυνθεί κατά τη γεωργική διαδικασία, κατά τη μεταφορά, είτε κατά την αποθήκευση (229–231). Αυτές οι ενώσεις σχετίζονται με ηπατοτοξικότητα, ανοσοκαταστολή και πιθανές καρκινογόνες επιπτώσεις στους σκύλους, καθιστώντας αναγκαία την λήψη αυστηρών μέτρων ποιοτικού ελέγχου (75). Για παράδειγμα, στις ξηρές τροφές σκύλων ανιχνεύθηκαν κυρίως αφλατοξίνες, σε μεγαλύτερο ποσοστό η AFB1, η οποία ταυτοποιήθηκε στο 71,4% των ξηρών τροφών σκύλου έναντι του 28% των ξηρών τροφών γάτας, ενώ 9 από τα 14 δείγματα DD έφεραν πολλαπλές αφλατοξίνες, εύρημα που αποδίδεται στη μεγαλύτερη συμμετοχή δημητριακών στη σύνθεση των τροφών σκύλου. Οι αφλατοξίνες μπορούν να παραχθούν τόσο κατά την καλλιέργεια όσο και κατά την αποθήκευση. Είναι θερμοανθεκτικές κατά τις διαδικασίες επεξεργασίας ξηρών τροφών, ενώ στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι οι περισσότερες δηλητηριάσεις σκύλων έχουν συσχετιστεί γενικά με αφλατοξίνες, γιατί έχουν υψηλή τοξικότητα σε αυτό το είδος (4,104). Επιπλέον, οι ξηρές τροφές για γάτες χαρακτηρίστηκαν από τη σχεδόν καθολική συν-εμφάνιση τριχοθηκενίων (T-2 και HT-2) μαζί με τις αφλατοξίνες, καθώς και από αυξημένη παρουσία φυτοιστρογόνων, γεγονός που αντανακλά τη συμβολή των φυτικής προέλευσης πρώτων υλών. Τα τριχοθηκένια σχετίζονται με επιμόλυνση των δημητριακών από μύκητες του γένους *Fusarium*, ενώ τα φυτοιστρογόνα αποτελούν φυσικούς βιοδραστικούς μεταβολίτες φυτών που προέρχονται από συστατικά όπως η σόγια και άλλα φυτικά παράγωγα (5,91,228). Συγκεκριμένα, η γενιστεΐνη ανιχνεύθηκε στο 89,5% και η φορμονονετίνη στο 68,4% των ξηρών δειγμάτων, με ιδιαίτερη τοξικολογική βαρύτητα για τις γάτες: ως υποχρεωτικά σαρκοφάγα, τα αιλουροειδή διαθέτουν περιορισμένη μεταβολική ικανότητα έναντι ενώσεων φυτικής προέλευσης, με

αποτέλεσμα ακόμη και χαμηλές συγκεντρώσεις να εγκυμονούν κίνδυνο ορμονικής διαταραχής, ιδίως σε στερωμένα ζώα. Τα ευρήματα αυτά αποτελούν ανησυχητικά λόγω της αυξημένης ευαισθησίας των αιλουροειδών στις τοξίνες των ζωοτροφών. Η ανίχνευση της τοξίνης HT-2, καθώς και των αφλατοξινών, υπογραμμίζει την ανάγκη για αυστηρή ρύθμιση των συστατικών με βάση τα δημητριακά, καθώς οι ουσίες αυτές είναι επιβλαβείς για τις γάτες και για τους σκύλους. Επιπλέον, σε ποσοστό 23,8% ανιχνεύθηκαν οι φαρμακευτικές ενώσεις στις ξηρές ζωοτροφές, που αποτελεί ένα αποτέλεσμα σημαντικό για την περαιτέρω σάρωση ύποπτων ενώσεων. Το εύρημα αυτό απαιτεί προσοχή σε μελλοντικές αναλυτικές μελέτες, ιδιαίτερα όσον αφορά αντιβιοτικά όπως η σπارفλοξασίνη (sparfloxacin), η οποία μπορεί να έχει σημαντικές επιπτώσεις για τα ζώα που καταναλώνουν συστηματικά ξηρές τροφές. Παράλληλα, τα αποτελέσματα αυτά υποδηλώνουν πιθανές οδούς επιμόλυνσης από ουσίες ζωικής προέλευσης, όπου οι πρώτες ύλες ενδέχεται να προέρχονται από ζώα που είχαν υποβληθεί σε αντιβιοτική θεραπεία (169,232,233,236,237). Επιπλέον, η συχνή παρουσία υπολειμμάτων παρασιτοκτόνων σε όλες τις ξηρές τροφές (71,5%) επαλήθευσε την ευρεία χρήση τους στην καλλιέργεια των δημητριακών και στην συντήρηση κατά την αποθήκευση.

Συνολικά:

- Τα δείγματα DD (ξηρή τροφή σκύλου, n=14) παρουσίασαν 68 ανιχνεύσεις σε 17 ενώσεις, με κυρίαρχες την αφλατοξίνη B1, την κιτρινίνη και την HT-2 τοξίνη και σποραδικά ευρήματα Fumagillin.
- Τα δείγματα DC (ξηρή τροφή γάτας, n=7) περιείχαν 54 ανιχνεύσεις σε 17 ενώσεις, εμφανίζοντας μεγαλύτερο αριθμό συνυπαρχόντων μυκοτοξινών, με 4 δείγματα να περιέχουν 5 ή περισσότερους επιμολυντές.

Συνολική κατηγορία DD παρουσίασε ένα πιο σύνθετο προφίλ επιμόλυνσης, ενώ η DC εμφάνισε μεγαλύτερη πολυπλοκότητα πολλαπλών υπολειμμάτων ανά δείγμα — εύρημα ιδιαίτερος κρίσιμο, δεδομένης της περιορισμένης μεταβολικής ανοχής των γατών σε σωρευτικές εκθέσεις.

5.4.2. ΥΓΡΕΣ ΤΡΟΦΕΣ

Σε αντίθεση με τις ξηρές, οι υγρές ζωοτροφές εμφάνισαν χαμηλότερα φορτία επιμόλυνσης, παρουσιάζοντας χαμηλότερα ποσοστά ανίχνευσης σε όλες τις κατηγορίες αναλυτών (ΣΧΗΜΑ 15 & 16), γεγονός που οφείλεται κυρίως στη σύστασή τους — υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία (70–80%), περιορισμένη συμμετοχή δημητριακών, αποστείρωση των αεροστεγών συσκευασιών και απουσία ανάγκης για πρόσθετα συντηρητικά. Ο έλεγχος υπόπτων ενώσεων αποκάλυψε την παρουσία μυκοτοξινών, παρασιτοκτόνων και φυτομεταβολιτών σε όλα τα δείγματα αυτής της ομάδας. Μυκοτοξίνες ανιχνεύθηκαν σε 30 από τα 44 δείγματα, συμπεριλαμβανομένων ενώσεων από διαφορετικές ομάδες, όπως αφλατοξίνες, τοξίνες του είδους *Alternaria* και τριχοθηκένια. Παρότι ο συνολικός αριθμός ανιχνεύσεων ήταν παρόμοιος μεταξύ υγρών τροφών σκύλου και γάτας, το προφίλ των ανιχνευόμενων ενώσεων διαφοροποιήθηκε σαφώς: στις υγρές τροφές σκύλου (WD, n=18) κυριάρχησαν νομοθετικά ρυθμιζόμενες μυκοτοξίνες, με την αφλατοξίνη B1 να ταυτοποιείται σε 8 δείγματα και την τοξίνη HT-2 σε 7, ενώ οι υγρές τροφές γάτας (WC, n=26) χαρακτηρίστηκαν από αναδυόμενες τοξίνες και φυσικούς μεταβολίτες, με την αλτερναριόλη να ανιχνεύεται αποκλειστικά σε αυτή την υποκατηγορία (6 από τα 7 συνολικά θετικά δείγματα της ένωσης) και να συμπληρώνεται από φαινολικούς μεταβολίτες όπως η κερκιτρίνη. Η διαφοροποίηση αυτή πιθανώς αντανακλά διαφορές στις πρώτες ύλες των δύο κατηγοριών. Το χαμηλό ποσοστό εμφάνισης παρασιτοκτόνων επιβεβαίωσε την αυξημένη ανάγκη για τις ενώσεις αυτές στη συντήρηση των ξηρών τροφών κατά την αποθήκευση, καθώς μόνο το 11% των υγρών δειγμάτων περιείχε υπολείμματα παρασιτοκτόνων (έναντι 71,5% στις ξηρές), χωρίς ουσιαστική διαφοροποίηση μεταξύ WD και WC. Λαμβάνοντας υπόψη τις διατροφικές απαιτήσεις των γατών, η ύπαρξη φυτοιστρογόνων (όπως η φορμονονετίνη και η γενιστεΐνη) είναι ιδιαίτερα ανησυχητική στην κατηγορία WC, καθώς οι ουσίες αυτές μπορούν να διαταράξουν την ορμονική ισορροπία και δυνητικά να παρεμποδίσουν φυσιολογικές βιολογικές διεργασίες — ζήτημα κρίσιμο για τα αιλουροειδή ως υποχρεωτικά σαρκοφάγα με περιορισμένη μεταβολική ικανότητα έναντι ενώσεων φυτικής προέλευσης, ιδίως σε στειρωμένα ζώα. Γενικά, η

παρουσία φυτοοιστρογόνων όπως αναφέρθηκε παραπάνω στις υγρές τροφές αποτελεί άμεση συνέπεια της χρήσης φυτικής προέλευσης συστατικών (π.χ. σόγια, άμυλο), τα οποία εισάγονται στις συνταγές των ζωοτροφών για τεχνολογικούς λόγους, όπως η βελτίωση της υφής. Αυτό το πρότυπο επιμόλυνσης υπογραμμίζει την ανάγκη για ρυθμιστική εποπτεία στην προμήθεια και την επεξεργασία των πρώτων υλών για την παρασκευή υγρών τροφών κατοικιδίων, προκειμένου να μετριάσουν αυτοί οι κίνδυνοι.

Συνοψίζοντας τις διαφορές μεταξύ των δύο υπο-κατηγοριών:

- Η κατηγορία WD (υγρή τροφή σκύλου, n=18) περιείχε 32 ανιχνεύσεις σε 11 ενώσεις, με κυρίαρχες την αφλατοξίνη B1 (8 ανιχνεύσεις) και την τοξίνη HT-2 (7 ανιχνεύσεις)
- Η κατηγορία WC (υγρή τροφή γάτας, n=26) περιείχε επίσης 32 ανιχνεύσεις σε 12 ενώσεις, με μοναδικά χαρακτηριστικά όπως τοξίνες του είδους *Alternaria* (αλτερναριόλη σε 6 δείγματα) και φαινολικούς μεταβολίτες όπως η κερκιτρίνη.

Έτσι, η WD εμφάνισε υψηλότερη συχνότητα ανίχνευσης νομοθετικά ρυθμιζόμενων επιμολυντών, ενώ η WC χαρακτηρίστηκε από αναδυόμενες τοξίνες και φυσικούς μεταβολίτες — μια διαφοροποίηση που αποκτά ιδιαίτερη σημασία δεδομένης της περιορισμένης ικανότητας ηπατικής αποτοξίνωσης των γατών και της απουσίας θεσμοθετημένων ορίων για πολλές από αυτές τις αναδυόμενες ενώσεις.

6. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε μια ολοκληρωμένη ροή εργασίας υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας (LC-HRMS) για τη διερεύνηση υπόπτων ενώσεων σε 65 εμπορικές τροφές για γάτες και σκύλους. Η σύγκριση των ποιοτικών ευρημάτων της παρούσας μελέτης με τις διαθέσιμες βιβλιογραφικές αναφορές που

παρουσιάζονται στον ΠΙΝΑΚΑ 2 , αναδεικνύει τόσο σημεία σύμπτωσης όσο και ουσιώδεις διαφοροποιήσεις , οι οποίες αποδίδονται κατά κύριο λόγο στην αναλυτική στρατηγική που υιοθετήθηκε όπως θα αναφερθεί παρακάτω. Σε συμφωνία με το σύνολο σχεδόν των μελετών αναφοράς (67,69,91,153) , η αφλατοξίνη B1 επιβεβαιώθηκε και στην παρούσα εργασία ως η συχνότερα ανιχνεύσιμη αφλατοξίνη στις εμπορικές τροφές κατοικίδιων , αν και η συχνότητα ανίχνευσης (33,8%) προσέγγισε εκείνη των μελετών με συγκρίσιμο πειραματικό σχεδιασμό (33% στην αναφορά 2, 25,8% στην αναφορά 67) και υπολείπταν σαφώς των πολύ υψηλότερων ποσοστών που έχουν αναφερθεί σε δείγματα ξηρών τροφών σκύλων (έως 93,3%) (91). Αντίστοιχη ποιοτική συμφωνία διαπιστώνεται και ως προς τα τριχοθήκεια, με τις τοξίνες T-2 και HT-2 να εντοπίζονται και στην παρούσα εργασία (15,4% και 30,8% αντίστοιχα), επιβεβαιώνοντας τη σημασία τους ως κυρίαρχων επιμολυντών των τροφών δημητριακής βάσης, αν και με χαμηλότερη επικράτηση συγκριτικά με τις στοχευμένες μελέτες (70, 91), όπου παρουσιάζονται ποσοστά που υπερβαίνουν το 80%. Σημαντική διαφοροποίηση παρατηρείται όσον αφορά τις ρυθμιζόμενες μυκοτοξίνες δεσοξυνιβαλενόλη (DON), ωχρατοξίνη A (OTA), ζεαραλενόνη (ZEA) και φουμονισίνες (FBs), οι οποίες στις προαναφερθείσες μελέτες εμφανίζουν ιδιαίτερα υψηλή συχνότητα ανίχνευσης (συχνά 70–100%), ενώ στην παρούσα εργασία είτε δεν εντοπίστηκαν είτε ταυτοποιήθηκαν σποραδικά (ZEA: 1,5%). Η απόκλιση αυτή αποδίδεται κατά κύριο λόγο στον περιορισμό της ανάλυσης στη θετική λειτουργία ιονισμού (ESI⁺), δεδομένου ότι οι συγκεκριμένες ενώσεις παρουσιάζουν αυξημένη απόκριση σε αρνητικό ιονισμό (ESI⁻), και δεν θα πρέπει να ερμηνευθεί ως απουσία επιμόλυνσης. Αντιθέτως, η εφαρμοσθείσα ροή σάρωσης ύποπτων ενώσεων μέσω HRMS διεύρυνε ουσιαστικά το χημικό αποτύπωμα, επιτρέποντας την ταυτοποίηση αναδυόμενων μυκοτοξινών οι οποίες σπανίως αξιολογούνται στις στοχευμένες μελέτες του ΠΙΝΑΚΑ, όπως η κιτρινίνη (20,0%), η αλτερναριόλη (10,8%), η εννιατίνη B (6,2%), η αφλατοξίνη P1 (20,0%) και η διακετοξυσκιρπενόλη (3,1%). Τέλος, σε επίπεδο μοτίβων συνύπαρξης, τα ευρήματα της παρούσας εργασίας ευθυγραμμίζονται πλήρως με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (αναφορές 67, 70, 91), επιβεβαιώνοντας ότι η ταυτόχρονη παρουσία πολλαπλών μυκοτοξινών στο ίδιο δείγμα αποτελεί μάλλον

τον κανόνα παρά την εξαίρεση στις εμπορικές τροφές κατοικίδιων. Από όσα γνωρίζουμε, πρόκειται για την πρώτη συστηματική σύγκριση των προφίλ επιμόλυνσης μεταξύ ξηρών και υγρών σκευασμάτων σε μια ενιαία αναλυτική πορεία πολλαπλών κατηγοριών. Τα αποτελέσματα κατέδειξαν σαφώς διαφοροποιημένα πρότυπα επιμόλυνσης, τα οποία καθορίζονται από τη σύσταση της τροφής (υγρασία, λίπη και πρωτεΐνες) και την προέλευση των πρώτων υλών. Συγκεκριμένα, τα ξηρά σκευάσματα εμφάνισαν περίπου διπλάσιο αριθμό ταυτοποιημένων ενώσεων (122 ανιχνεύσεις) συγκριτικά με τις υγρές τροφές (64 ανιχνεύσεις). Οι μυκοτοξίνες και τα παρασιτοκτόνα κυριαρχούσαν στις ξηρές τροφές, γεγονός που συνάδει με την υψηλότερη περιεκτικότητα σε συστατικά με βάση τα δημητριακά και τις σχετικές γεωργικές πρακτικές. Επιπλέον, ταυτοποιήθηκαν φυτικοί βιοδραστικοί μεταβολίτες τόσο σε ξηρές όσο και σε υγρές τροφές, υποδεικνύοντας μια πρόσθετη, μη ρυθμιζόμενη πηγή βιοδραστικών ενώσεων στη διατροφή των κατοικίδιων. Η συχνή συνύπαρξη πολλαπλών μυκοτοξινών υπογραμμίζει περαιτέρω την πολυπλοκότητα των πραγματικών σεναρίων έκθεσης, τα οποία δεν καλύπτονται επαρκώς από τις τρέχουσες κανονιστικές προσεγγίσεις που βασίζονται σε μεμονωμένες ενώσεις. Η ταυτόχρονη παρουσία μυκοτοξινών, παρασιτοκτόνων, κτηνιατρικών φαρμάκων και φυτικών βιοδραστικών ενώσεων υποδηλώνει ότι τα ζώα συντροφιάς, ιδιαίτερα οι γάτες, οι οποίες διαθέτουν περιορισμένη μεταβολική ικανότητα αποτοξίνωσης ξενοβιοτικών ουσιών, ενδέχεται να εκτίθενται σε σύνθετα μείγματα προσμίξεων με πιθανές αθροιστικές ή συνεργιστικές δράσεις. Συνολικά, η διερεύνηση βάσει HRMS αποτελεί μια αποτελεσματική μέθοδο έγκαιρης προειδοποίησης και ιεράρχησης για σύνθετα υποστρώματα ζωοτροφών. Εντούτοις, η έλλειψη ποσοτικών δεδομένων συγκέντρωσης δεν επιτρέπει την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το πραγματικό μέγεθος της έκθεσης ή των κινδύνων, δεδομένης της τρέχουσας απουσίας ειδικών ρυθμιστικών ορίων για τους περισσότερους αναδυόμενους ρύπους στις τροφές κατοικίδιων. Οπότε, απαιτείται ποσοτική επιβεβαίωση και αξιολόγηση των μειγμάτων για τη μετατροπή των ευρημάτων αυτών σε συμπεράσματα βασισμένα στην έκθεση και την επικινδυνότητα. Τα ευρήματα αυτά αναδεικνύουν ένα κρίσιμο κανονιστικό κενό και συνηγορούν υπέρ της ενσωμάτωσης

προηγμένων στρατηγικών σάρωσης ύποπτων ενώσεων μέσω HRMS, συμπληρωμένων από στοχευμένες προσεγγίσεις, στους ελέγχους ποιότητας ρουτίνας. Τέλος είναι φανερό πως η θέσπιση πλαισίων παρακολούθησης ειδικά για τις τροφές κατοικίδιων θα παρέχει μια απαραίτητη βάση για τη βελτίωση της διαχείρισης της ασφάλειας των ζωοτροφών και, έμμεσα, για την προστασία της δημόσιας υγείας σε νοικοκυριά όπου τα κατοικίδια θεωρούνται μέλη της οικογένειας.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Hassan HF, Dimassi H, Fadous A, Abou Alayoui K, Hteit R, Khatib S, et al. Unveiling food safety knowledge and practices among pet owners in Lebanon. *Sci Rep.* 2024 Aug 23;14(1):19620. doi:10.1038/s41598-024-65872-x
2. Gazzotti T, Biagi G, Pagliuca G, Pinna C, Scardilli M, Grandi M, et al. Occurrence of mycotoxins in extruded commercial dog food. *Anim Feed Sci Technol.* 2015 Apr;202:81–9. doi:10.1016/j.anifeedsci.2015.02.004
3. Gruber-Dorninger C, Jenkins T, Schatzmayr G. Global Mycotoxin Occurrence in Feed: A Ten-Year Survey. *Toxins.* 2019 Jun 27;11(7):375. doi:10.3390/toxins11070375
4. Leung MCK, Díaz-Llano G, Smith TK. Mycotoxins in Pet Food: A Review on Worldwide Prevalence and Preventative Strategies. *J Agric Food Chem.* 2006 Dec 1;54(26):9623–35. doi:10.1021/jf062363+
5. Witaszak Ł N; Waśkiewicz, A; Bocianowski, J; Stępień. Contamination of Pet Food with Mycobiota and Fusarium Mycotoxins—Focus on Dogs and Cats. 2020. doi:10.3390/toxins12020130.

6. Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Jun 13;14(6):632. doi:10.3390/ijerph14060632
7. Jestoi M. Emerging ***Fusarium*** -Mycotoxins Fusaproliferin, Beauvericin, Enniatins, And Moniliformin—A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2008 Jan 2;48(1):21–49. doi:10.1080/10408390601062021
8. Berthiller F, Crews C, Dall'Asta C, Saeger SD, Haesaert G, Karlovsky P, et al. Masked mycotoxins: A review. *Mol Nutr Food Res*. 2013 Jan;57(1):165–86. doi:10.1002/mnfr.201100764
9. EFSA. Risk assessment of mycotoxins in food and feed. *EFSA J*. 2020;18(3):e06040.
10. Fenik J, Tankiewicz M, Biziuk M. Properties and determination of pesticides in fruits and vegetables. *TrAC Trends Anal Chem*. 2011;30(6):814–26.
11. Masiá A, Suarez-Varela MM, Llopis-Gonzalez A, Picó Y. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Anal Chim Acta*. 2016 Sep;936:40–61. doi:10.1016/j.aca.2016.07.023
12. Kovalsky P, Kos G, Nährer K, Schwab C, Jenkins T, Schatzmayr G, et al. Co-Occurrence of Regulated, Masked and Emerging Mycotoxins and Secondary Metabolites in Finished Feed and Maize—An Extensive Survey. *Toxins*. 2016 Dec 6;8(12):363. doi:10.3390/toxins8120363
13. Commission E. Commission Regulation (EC) No 1881/2006 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *J Eur Union*. 2006.
14. FDA. Guidance for industry: Action levels for aflatoxins in animal feeds. U.S. Food and Drug Administration; 2025.
15. Van Der Fels-Klerx HJ, Van Asselt ED, Van Leeuwen SPJ, Dorgelo FO, Hoek - Van Den Hil EF. Prioritization of chemical food safety hazards in the

European feed supply chain. *Compr Rev Food Sci Food Saf.* 2024 Nov;23(6):e70025. doi:10.1111/1541-4337.70025

16. Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the ninety-first meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) [Internet]. [cited 2025 Nov 3]. Available from: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240060760>
17. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ Sci Technol.* 2014 Feb 18;48(4):2097–8. doi:10.1021/es5002105
18. Facorro R, Llompart M, Dagnac T. Combined (d)SPE-QuEChERS Extraction of Mycotoxins in Mixed Feed Rations and Analysis by High Performance Liquid Chromatography-High-Resolution Mass Spectrometry.
19. González-Jartín JM, Alfonso A, Sainz MJ, Vieytes MR, Botana LM. Multi-detection method for mycotoxins with a modified QuEChERS extraction in feed and development of a simple detoxification procedure. *Anim Feed Sci Technol.* 2021 Feb;272:114745. doi:10.1016/j.anifeedsci.2020.114745
20. Lago LO, Niewierowski TH, Mallmann LP, Rodrigues E, Welke JE. QuEChERS-LC-QTOFMS for the simultaneous determination of legislated and emerging mycotoxins in malted barley and beer using matrix-matched calibration as a solution to the commercial unavailability of internal standards for some mycotoxins. *Food Chem.* 2021 May;345:128744. doi:10.1016/j.foodchem.2020.128744
21. Kaufmann A. The current role of high-resolution mass spectrometry in food analysis. *Anal Bioanal Chem.* 2012 May;403(5):1233–49. doi:10.1007/s00216-011-5629-4
22. Hollender J, Schymanski EL, Ahrens L, Alygizakis N, Béen F, Bijlsma L, et al. NORMAN guidance on suspect and non-target screening in environmental

- monitoring. *Environ Sci Eur.* 2023 Sep 4;35(1):75. doi:10.1186/s12302-023-00779-4
23. Malachová A, Stránská M, Václavíková M, Elliott CT, Black C, Meneely J, et al. Advanced LC–MS-based methods to study the co-occurrence and metabolization of multiple mycotoxins in cereals and cereal-based food. *Anal Bioanal Chem.* 2018 Jan;410(3):801–25. doi:10.1007/s00216-017-0750-7
24. Righetti L, Paglia G, Galaverna G, Dall’Asta C. Recent Advances and Future Challenges in Modified Mycotoxin Analysis: Why HRMS Has Become a Key Instrument in Food Contaminant Research. *Toxins.* 2016 Dec 2;8(12):361. doi:10.3390/toxins8120361
25. Bessaire T, Savoy MC, Ernest M, Christinat N, Badoud F, Desmarchelier A, et al. Enhanced Surveillance of >1100 Pesticides and Natural Toxins in Food: Harnessing the Capabilities of LC-HRMS for Reliable Identification and Quantification. *Foods.* 2024 Sep 25;13(19):3040. doi:10.3390/foods13193040
26. Sun J, Li W, Zhang Y, Hu X, Wu L, Wang B. QuEChERS Purification Combined with Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry for Simultaneous Quantification of 25 Mycotoxins in Cereals. *Toxins.* 2016 Dec 15;8(12):375. doi:10.3390/toxins8120375
27. Καστορινή Γ. «Διαχείριση ποιότητας στο χώρο των ζωοτροφών – Νομοθετικό πλαίσιο & Τεχνικές ελέγχου – Στοιχεία επίσημων ελέγχων». 2018.
28. FEDIAF | History of pet food manufacturing [Internet]. [cited 2025 Sep 29]. Available from: <https://europeanpetfood.org/pet-food-facts/fact-sheets/quality-and-safety/history-of-pet-food-manufacturing/>
29. Pet Food Overview. NIR For Feed [Internet]. [cited 2025 Sep 29]. Available from: <https://nir-for-feed.com/overviews/pet-food/>

30. Boti T V; Martinaiou, P; Gkountouras, D; Albanis. Target and Suspect Screening Approaches for the Identification of Emerging and Other Contaminants in Fish Feeds Using High Resolution Mass Spectrometry. 2024. doi:10.1016/j.envres.2024.118739.
31. Marin S, Ramos AJ, Cano-Sancho G, Sanchis V. Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. *Food Chem Toxicol.* 2013 Oct;60:218–37. doi:10.1016/j.fct.2013.07.047
32. Wu Y W; Huang, X; Liang, R; Guo, T; Xiao, Q; Xia, B; Wan, Y; Zhou. Determination of 63 Mycotoxins in Grain Products by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometry. 2023. doi:10.1016/j.foodcont.2023.109772.
33. Pet Food Marketing Trends 2025: Mastering the Pet Food Market - Favoured. [Internet]. [cited 2025 Oct 4]. Available from: <https://favoured.co.uk/pet-food-marketing-trends-2025/>
34. Agnew C. Global Insights Series: The Humanisation of Pet Food. Langdon [Internet]. 2025 Jul 24 [cited 2025 Oct 4]. Available from: <https://www.hjlangdon.com/global-insights-series-the-humanisation-of-pet-food/>
35. Corsato Alvarenga I, Keller LC, Waldy C, Aldrich CG. Extrusion Processing Modifications of a Dog Kibble at Large Scale Alter Levels of Starch Available to Animal Enzymatic Digestion. *Foods.* 2021 Oct 21;10(11):2526. doi:10.3390/foods10112526
36. Davies RH, Lawes JR, Wales AD. Raw diets for dogs and cats: a review, with particular reference to microbiological hazards. *J Small Anim Pract.* 2019 Jun;60(6):329–39. doi:10.1111/jsap.13000
37. Leiva A, Molina A, Redondo-Solano M, Artavia G, Rojas-Bogantes L, Granados-Chinchilla F. Pet Food Quality Assurance and Safety and Quality

- Assurance Survey within the Costa Rican Pet Food Industry. *Animals*. 2019 Nov 15;9(11):980. doi:10.3390/ani9110980
38. Tran QD, Hendriks WH, Van Der Poel AF. Effects of extrusion processing on nutrients in dry pet food. *J Sci Food Agric*. 2008 Jul;88(9):1487–93. doi:10.1002/jsfa.3247
 39. Purina Institute [Internet]. [cited 2025 Oct 6]. What Is the Difference Between Dry, Semi-Moist and Wet Pet Foods? Available from: <https://www.purinainstitute.com/centresquare/understanding-pet-food/what-is-the-difference-between-dry-semi-moist-and-wet-pet-foods>
 40. FEDIAF | The safety of pet food [Internet]. [cited 2025 Oct 6]. Available from: <https://europeanpetfood.org/pet-food-facts/fact-sheets/quality-and-safety/the-safety-of-pet-food/>
 41. Houndsy [Internet]. [cited 2025 Oct 7]. What Is Wet Dog Food Made Of? Understanding Ingredients, Production, and Benefits for Your Dog’s Health. Available from: <https://www.houndsy.com/blogs/modern-tails/what-is-wet-dog-food-made-of-understanding-ingredients-production-and-benefits-for-your-dog-s-health>
 42. Semi-Moist Pet Food: Nutrition & Palatability Balance [Internet]. [cited 2025 Oct 7]. Available from: <https://www.foodresearchlab.com/animal-food-product-development/semi-moist-pet-food-a-balanced-approach-to-nutrition-and-palatability/>
 43. Knight A, Satchell L. Vegan versus meat-based pet foods: Owner-reported palatability behaviours and implications for canine and feline welfare. *PLOS ONE*. 2021 Jun;16(6):1–25. doi:10.1371/journal.pone.0253292
 44. FEDIAF: Thriving pet ownership fuels \$33.7 billion European pet food industry | Pet Food Processing [Internet]. [cited 2025 Oct 10]. Available from: <https://www.petfoodprocessing.net/articles/19391-fediaf-thriving-pet-ownership-fuels-337-billion-european-pet-food-industry>

45. Rawfeeding101. FEDIAF vs AAFCO. Raw Feeding 101 [Internet]. 2025 Jan 9 [cited 2025 Oct 10]. Available from: <https://rawfeeding101.com/blogs/uncategorized/fediaf-vs-aafco-comparison/>
46. FEDIAF | FEDIAF Publishes 2025 Nutritional Guidelines for Cats and Dogs [Internet]. [cited 2025 Oct 10]. Available from: https://europeanpetfood.org/_/news/fediaf-publishes-2025-nutritional-guidelines-for-cats-and-dogs/
47. Pet Food Production and Ingredient Analysis (2025). Decision Innovation Solutions [Internet]. 2025 Jun 5 [cited 2025 Oct 12]. Available from: <https://www.decision-innovation.com/case-study/pet-food-production-and-ingredient-analysis-2025/>
48. <https://www.diamondpet.com/> [Internet]. [cited 2025 Oct 11]. Pet Food Ingredients: A Diamond Pet Foods Guide. Available from: <https://www.diamondpet.com/blog/nutrition/ingredients/pet-food-ingredients-diamond-pet-foods-guide/>
49. A Guide to Dog Food Ingredients and Reading Dog Food Labels | PetMD [Internet]. [cited 2025 Oct 11]. Available from: <https://www.petmd.com/dog/nutrition/pet-food-ingredient-and-label-guide>
50. philosophy. What's in the Ingredients List? AAFCO [Internet]. 2023 Jan 17 [cited 2025 Oct 12]. Available from: <https://www.aafco.org/consumers/understanding-pet-food/whats-in-the-ingredients-list/>
51. AAFCO Nutrient Requirements For Cats | Cat Food Central [Internet]. [cited 2025 Oct 11]. Available from: <https://catfoodcentral.co/kb-article/aafco-nutritional-guidelines/>

52. Duan K, Pang G, Duan Y, Onyeaka H, Krebs J. Current research development on food contaminants, future risks, regulatory regime and detection technologies: A systematic literature review. *J Environ Manage.* 2025 May 1;381:125246. doi:10.1016/j.jenvman.2025.125246
53. International Workshop on Feed Risk Assessment – Chemical Safety co-organized by National Institute for Public Health and the Environment of the Netherlands and the Food and Agriculture Organization of the United Nations 10-11 March 2025 | Global Feed Safety Platform | Food and Agriculture Organization of the United Nations [Internet]. [cited 2025 Oct 16]. Available from: <https://www.fao.org/feed-safety/news-events/detail/en/c/1734982/>
54. Lin X, Duan N, Wu J, Lv Z, Wang Z, Wu S. Potential food safety risk factors in plant-based foods: Source, occurrence, and detection methods. *Trends Food Sci Technol.* 2023 Aug 1;138:511–22. doi:10.1016/j.tifs.2023.06.032
55. Mycotoxins: Review on types, toxicity, conventional and updating techniques of detection and counteraction in feeds and foods of animals and human. *Egypt J Anim Health.* 2024 Apr 1. doi:10.21608/ejah.2024.346750
56. Penagos-Tabares F, Khiaosa-ard R, Nagl V, Faas J, Jenkins T, Sulyok M, et al. Mycotoxins, Phytoestrogens and Other Secondary Metabolites in Austrian Pastures: Occurrences, Contamination Levels and Implications of Geo-Climatic Factors. *Toxins.* 2021 Jun 30;13(7):460. doi:10.3390/toxins13070460
57. Zhang X, Chen J, Ma X, Tang X, Tan B, Liao P, et al. Mycotoxins in Feed: Hazards, Toxicology, and Plant Extract-Based Remedies. *Metabolites.* 2025 Mar 24;15(4):219. doi:10.3390/metabo15040219
58. Na TW, Seo HJ, Jang SN, Kim H, Yun H, Kim H, et al. Multi-residue analytical method for detecting pesticides, veterinary drugs, and mycotoxins in feed using liquid- and gas chromatography coupled with mass spectrometry. *J Chromatogr A.* 2022 Aug;1676:463257. doi:10.1016/j.chroma.2022.463257

59. Giugliano B R; Armenio, V; Savio, V; Vaccaro, E; Ciccotelli, V; Vivaldi. Monitoring of Non-Maximum-Residue-Level Pesticides in Animal Feed: A Study from 2019 to 2023. 2024. doi:10.3390/toxics12090680.
60. Mycotoxins - Food Safety - European Commission [Internet]. [cited 2025 Nov 3]. Available from: https://food.ec.europa.eu/food-safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/mycotoxins_en
61. Mycotoxins | FDA [Internet]. [cited 2025 Nov 3]. Available from: <https://www.fda.gov/food/natural-toxins-food/mycotoxins>
62. Mycotoxins [Internet]. [cited 2025 Nov 3]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>
63. Agriopoulou S, Stamatelopoulou E, Varzakas T. Advances in Occurrence, Importance, and Mycotoxin Control Strategies: Prevention and Detoxification in Foods. *Foods*. 2020 Jan 28;9(2):137. doi:10.3390/foods9020137
64. Dall'Asta C, De Boevre M, Dellafiora L, De Saeger S, Moretti A, Pinson-Gadais L, et al. Boosting knowledge and harmonisation in the mycotoxin field through sustainable scientific alliances – MYCOBOOST. *EFSA Support Publ*. 2023 Nov;20(11). doi:10.2903/sp.efsa.2023.EN-8420
65. Dey DK, Kang JI, Bajpai VK, Kim K, Lee H, Sonwal S, et al. Mycotoxins in food and feed: toxicity, preventive challenges, and advanced detection techniques for associated diseases. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2023 Oct 25;63(27):8489–510. doi:10.1080/10408398.2022.2059650
66. Rodrigues P, Venâncio A, Lima N. Mycobiota and mycotoxins of almonds and chestnuts with special reference to aflatoxins. *Food Res Int*. 2012 Aug;48(1):76–90. doi:10.1016/j.foodres.2012.02.007
67. Castaldo L, Graziani G, Gaspari A, Izzo L, Tolosa J, Rodríguez-Carrasco Y, et al. Target Analysis and Retrospective Screening of Multiple Mycotoxins in Pet

- Food Using UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Toxins*. 2019 Jul 24;11(8):434. doi:10.3390/toxins11080434
68. Abd-Elhakim YM, El Sharkawy NI, Moustafa GG. An investigation of selected chemical contaminants in commercial pet foods in Egypt. *J Vet Diagn Invest*. 2016 Jan;28(1):70–5. doi:10.1177/1040638715624733
69. Bissoqui LY, Frehse MS, Freire RL, Ono MA, Bordini JG, Hirozawa MT, et al. Exposure assessment of dogs to mycotoxins through consumption of dry feed. *J Sci Food Agric*. 2016.
70. Błajet-Kosicka A, Kosicki R, Twarużek M, Grajewski J. Determination of moulds and mycotoxins in dry dog and cat food using liquid chromatography with mass spectrometry and fluorescence detection. *Food Addit Contam Part B*. 2014 Oct 2;7(4):302–8. doi:10.1080/19393210.2014.933269
71. Chhaya RS, O'Brien J, Nag R, Cummins E. Prevalence and concentration of mycotoxins in bovine feed and feed components: A global systematic review and meta-analysis. *Sci Total Environ*. 2024 Jun;929:172323. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.172323
72. Gruber-Dorninger C, Müller A, Rosen R. Multi-Mycotoxin Contamination of Aquaculture Feed: A Global Survey. *Toxins*. 2025 Mar 1;17(3):116. doi:10.3390/toxins17030116
73. Teixeira EMK, Frehse MS, Freire RL, Ono MA, Bordini JG, Hirozawa MT, et al. Safety of low and high cost dry feed intended for dogs in Brazil concerning fumonisins, zearalenone and aflatoxins. *World Mycotoxin J*. 2017 Sep 7;10(3):273–84. doi:10.3920/WMJ2016.2166
74. Vardali S, Papadouli C, Rigos G, Nengas I, Panagiotaki P, Golomazou E. Recent Advances in Mycotoxin Determination in Fish Feed Ingredients. *Molecules*. 2023 Mar 9;28(6):2519. doi:10.3390/molecules28062519

75. Zhou G, Hu S, Xie L, Huang H, Huang W, Zheng Q, et al. Individual and combined occurrences of the prevalent mycotoxins in commercial feline and canine food. *Mycotoxin Res.* 2024 Nov 1;40(4):547–58. doi:10.1007/s12550-024-00545-2
76. Aalizadeh R, Nika MC, Thomaidis NS. Development and application of retention time prediction models in the suspect and non-target screening of emerging contaminants. *J Hazard Mater.* 2019 Feb;363:277–85. doi:10.1016/j.jhazmat.2018.09.047
77. Tarábek P, Leonova N, Konovalova O, Kirchner M. Identification of organic contaminants in water and related matrices using untargeted liquid chromatography high-resolution mass spectrometry screening with MS/MS libraries. *Chemosphere.* 2024 Oct;366:143489. doi:10.1016/j.chemosphere.2024.143489
78. Boti I V; Koloka, OL; Konstantinou. Application of Low- and High-resolution Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for the Determination of Contaminants in Food Matrices - Boti - Major Reference Works - Wiley Online Library. 2024.
79. Gkountouras T D; Boti, V; Albanis. High Resolution Mass Spectrometry Targeted Analysis and Suspect Screening of Pesticide Residues in Fruit Samples and Assessment of Dietary Exposure. 2024. doi:10.1016/j.envpol.2024.124143.
80. Gkountouras T D; Boti, V; Albanis. Pesticides and Transformation Products Footprint in Greek Market Basket Vegetables: Comprehensive Screening by HRMS and Health Risk Assessment. 2024. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.176085.
81. Van Wijk XMR, Goodnough R, Colby JM. Mass spectrometry in emergency toxicology: Current state and future applications. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2019 May 19;56(4):225–38. doi:10.1080/10408363.2019.1585415

82. Galindo MV, Perez MV, López-Ruiz R, Oliveira WDS, Godoy HT, Frenich AG, et al. Comprehensive analysis of contaminants in Brazilian infant formulas: Application of QuEChERS coupled with UHPLC-QqQ-MS/MS and suspect screening-unknown analysis by UHPLC-Q-Orbitrap-MS. *J Chromatogr A*. 2024 Jul;1726:464967. doi:10.1016/j.chroma.2024.464967
83. Sadighara P, Basaran B, Afshar A, Nazmara S. Optimization of clean-up in QuEChERS method for extraction of mycotoxins in food samples: A systematic review. *Microchem J*. 2024 Feb;197:109711. doi:10.1016/j.microc.2023.109711
84. Tolosa J, Barba FJ, Font G, Ferrer E. Mycotoxin Incidence in Some Fish Products: QuEChERS Methodology and Liquid Chromatography Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry Approach. *Molecules*. 2019 Feb 1;24(3):527. doi:10.3390/molecules24030527
85. Jedidi I, Soldevilla C, Lahouar A, Marín P, González-Jaén MT, Said S. Mycoflora isolation and molecular characterization of *Aspergillus* and *Fusarium* species in Tunisian cereals. *Saudi J Biol Sci*. 2018 Jul;25(5):868–74. doi:10.1016/j.sjbs.2017.11.050
86. Santos Pereira C, Cunha S, Fernandes JO. Prevalent Mycotoxins in Animal Feed: Occurrence and Analytical Methods. *Toxins*. 2019 May 22;11(5):290. doi:10.3390/toxins11050290
87. Barkai-Golan R. *Alternaria* Mycotoxins. In: *Mycotoxins in Fruits and Vegetables* [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2025 Dec 5]. p. 185–203. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123741264000085> doi:10.1016/B978-0-12-374126-4.00008-5
88. Logrieco A, Moretti A, Castella G, KostECKI M, Golinski P, Ritieni A, et al. Beauvericin Production by *Fusarium* Species. *Appl Environ Microbiol*. 1998 Aug;64(8):3084–8. doi:10.1128/AEM.64.8.3084-3088.1998

89. An Overview of Mycotoxins in Human Health with Emphasis on Development and Progression of Liver Cancer. *Clin Oncol*.
90. Iqbal SZ, Selamat J, Ariño A. Mycotoxins in Food and Food Products: Current Status. In: Selamat J, Iqbal SZ, editors. *Food Safety* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2016 [cited 2025 Dec 5]. p. 113–23. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-39253-0_6 doi:10.1007/978-3-319-39253-0_6
91. Macías-Montes OP A; Rial Berriel, C; Acosta Dacal, A; Henríquez Hernández, LA; Almeida González, M; Rodríguez Hernández, Á; Zumbado, M; Boada, LD; Zaccaroni, A; Luzardo. Risk Assessment of the Exposure to Mycotoxins in Dogs and Cats through the Consumption of Commercial Dry Food. 2020. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.134592.
92. Ertas N, Gonulalan Z, Yildirim Y, Karadal F. A survey of concentration of aflatoxin M1 in dairy products marketed in Turkey. *Food Control*. 2011 Dec;22(12):1956–9. doi:10.1016/j.foodcont.2011.05.009
93. Streit E, Schatzmayr G, Tassis P, Tzika E, Marin D, Taranu I, et al. Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed—Focus on Europe. *Toxins*. 2012 Oct 1;4(10):788–809. doi:10.3390/toxins4100788
94. Skrzydlewski P, Kosicki R, Grajewski J, Twarużek M. Four-year surveillance of mycotoxins in feed and raw materials (2021–2024): Occurrence, co-contamination, and risk implications. *Toxicon*. 2025 Dec 1;268:108618. doi:10.1016/j.toxicon.2025.108618
95. Authority (EFSA) EFS. Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA J*. 2007;5(3):446. doi:10.2903/j.efsa.2007.446

96. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to Aflatoxin B1 as undesirable substance in animal feed - - 2004 - EFSA Journal - Wiley Online Library [Internet]. [cited 2025 Dec 5]. Available from: <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2004.39>
97. Hernández-Martínez R, Navarro-Blasco I. Aflatoxin levels and exposure assessment of Spanish infant cereals. *Food Addit Contam Part B*. 2010;3(4):275–88. doi:10.1080/19393210.2010.531402 PubMed PMID: 24779628.
98. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Lyon: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer; 1993. 1 p. (IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans; v. 56).
99. Puschner B. Mycotoxins. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2002;32(2):409–19. doi:[https://doi.org/10.1016/S0195-5616\(01\)00011-0](https://doi.org/10.1016/S0195-5616(01)00011-0)
100. Sweeney M. Mycotoxin production by *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* species. *Int J Food Microbiol*. 1998 Sep 8;43(3):141–58. doi:10.1016/S0168-1605(98)00112-3
101. Council for Agricultural Science and Technology, editor. Mycotoxins: risks in plant, animal, and human systems. Ames, Iowa: CAST; 2003. 199 p. (Task force report; no. 139).
102. Edite Bezerra Da Rocha M, Freire FDCO, Erlan Feitosa Maia F, Izabel Florindo Guedes M, Rondina D. Mycotoxins and their effects on human and animal health. *Food Control*. 2014 Feb;36(1):159–65. doi:10.1016/j.foodcont.2013.08.021
103. El-Shemy H, editor. Soybean - Pest Resistance [Internet]. InTech; 2013 [cited 2025 Dec 6]. Available from: <http://www.intechopen.com/books/soybean-pest-resistance> doi:10.5772/3384

104. Mycotoxin Blue Book.
105. Scudamore KA, Hetmanski MT, Nawaz S, Naylor J, Rainbird S. Determination of mycotoxins in pet foods sold for domestic pets and wild birds using linked-column immunoassay clean-up and HPLC. *Food Addit Contam.* 1997;14(2):175–86. doi:10.1080/02652039709374512 PubMed PMID: 9102350.
106. Milani JM. Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review. *Veterinárni Medicína.* 2013 Aug 31;58(8):405–11. doi:10.17221/6979-VETMED
107. Bui-Klimke TR, Wu F. Ochratoxin A and Human Health Risk: A Review of the Evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;55(13):1860–9. doi:10.1080/10408398.2012.724480 PubMed PMID: 24874522.
108. Fusi E, Giromini C, Rebucci R, Pinotti L, Caprarulo V, Cheli F, et al. Ochratoxin A cytotoxicity on Madin–Darby canine kidney cells in the presence of alpha-tocopherol: Effects on cell viability and tight junctions. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2018;102(1):350–5. doi:https://doi.org/10.1111/jpn.12682
109. Mbundi L, Gallar-Ayala H, Khan MR, Barber JL, Losada S, Busquets R. Advances in the Analysis of Challenging Food Contaminants. In: *Advances in Molecular Toxicology* [Internet]. Elsevier; 2014 [cited 2025 Dec 15]. p. 35–105. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444634061000027> doi:10.1016/B978-0-444-63406-1.00002-7
110. Razzazi E, Böhm J, Grajewski J, Szczepaniak K, Kübber-Heiss AJ, Iben CH. Residues of ochratoxin A in pet foods, canine and feline kidneys. *J Anim Physiol Anim Nutr.* 2001;85(7–8):212–6. doi:https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2001.00331.x

111. Yang L, Yang L, Cai Y, Luo Y, Wang H, Wang L, et al. Natural mycotoxin contamination in dog food: A review on toxicity and detoxification methods. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2023 Jun;257:114948. doi:10.1016/j.ecoenv.2023.114948
112. van der Merwe KJ, Steyn PS, Fourie L. 1304. Mycotoxins. Part II. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* with. *J Chem Soc.* 1965;(0):7083–8. doi:10.1039/JR9650007083
113. Duarte SC, Lino CM, Pena A. Ochratoxin A in feed of food-producing animals: An undesirable mycotoxin with health and performance effects. *Vet Microbiol.* 2011 Dec;154(1–2):1–13. doi:10.1016/j.vetmic.2011.05.006
114. Gupta RC, Doss RB, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Aflatoxins, ochratoxins, and citrinin. In: *Reproductive and Developmental Toxicology* [Internet]. Elsevier; 2022 [cited 2025 Dec 15]. p. 983–1002. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323897730000485> doi:10.1016/B978-0-323-89773-0.00048-5
115. Khoi CS, Chen JH, Lin TY, Chiang CK, Hung KY. Ochratoxin A-Induced Nephrotoxicity: Up-to-Date Evidence. *Int J Mol Sci.* 2021 Oct 18;22(20):11237. doi:10.3390/ijms222011237
116. Boudra H, Le Bars P, Le Bars J. Thermostability of Ochratoxin A in wheat under two moisture conditions. *Appl Environ Microbiol.* 1995 Mar;61(3):1156–8. doi:10.1128/aem.61.3.1156-1158.1995
117. Vlachou M, Pexara A, Solomakos N, Govaris A. Ochratoxin A in Slaughtered Pigs and Pork Products. *Toxins.* 2022 Jan 19;14(2):67. doi:10.3390/toxins14020067
118. Meneely J, Greer B, Kolawole O, Elliott C. T-2 and HT-2 Toxins: Toxicity, Occurrence and Analysis: A Review. *Toxins.* 2023 Jul 29;15(8):481. doi:10.3390/toxins15080481

119. Cope RB. Trichothecenes. In: Veterinary Toxicology [Internet]. Elsevier; 2025 [cited 2026 Jan 10]. p. 1083–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443290077000145> doi:10.1016/B978-0-443-29007-7.00014-5
120. Scientific Opinion on the risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. EFSA J. (2011;9(12):2481). doi:10.2903/j.efsa.2011.2481
121. Dematati D, Gkountouras D, Boti V, Albanis T. Mycotoxins and Beyond: Unveiling Multiple Organic Contaminants in Pet Feeds Through HRMS Suspect Screening. *Toxins*. 2026 Jan;18(1):22. doi:10.3390/toxins18010022
122. Scientific Opinion on the risks for public health related to the presence of zearalenone in food. EFSA J. (2011;9(6):2197). doi:10.2903/j.efsa.2011.2197
123. Carrión PA. Chapter 18 - Pet Food. In: Andersen V, Lelieveld H, Motarjemi Y, editors. Food Safety Management (Second Edition) [Internet]. Second Edition. San Diego: Academic Press; 2023. p. 363–84. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128200131000115> doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820013-1.00011-5>
124. Castells M, Marín S, Sanchis V, Ramos AJ. Fate of mycotoxins in cereals during extrusion cooking: A review. *Food Addit Contam*. 2005;22(2):150–7. doi:10.1080/02652030500037969 PubMed PMID: 15824005.
125. Bennett JW, Klich M. Mycotoxins. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jul;16(3):497–516. doi:10.1128/CMR.16.3.497-516.2003
126. Yazar S, Omurtag GZ. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int J Mol Sci*. 2008 Oct 31;9(11):2062–90. doi:10.3390/ijms9112062
127. Stopa E, Gajęcka M, Babińska I, Zielonka Ł, Gajęcki M. The effect of experimental exposure to low doses of zearalenone on uterine histology and

- morphometry in prepubertal bitches. *Theriogenology*. 2014 Sep;82(4):537–45. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.05.002
128. Gajęcka M, Janowski T, Jakimiuk E, Polak-Śliwińska M, Podhalicz-Dziegielewska M, Tadeusz R, et al. Histopathological and immunohistochemical examinations, and changes in proliferation activity of the uterus in bitches following zearalenon micotoxicosis. *Pol J Vet Sci*. 2007 Feb;10:143–51.
129. Böhm J, Koinig L, Razzazi-Fazeli E, Blajet-Kosicka A, Twaruzek M, Grajewski J, et al. Survey and risk assessment of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, fumonisins, ochratoxin A, and aflatoxins in commercial dry dog food. *Mycotoxin Res*. 2010 Aug;26(3):147–53. doi:10.1007/s12550-010-0049-4
130. Mulunda M, Ndou RV, Dzoma B, Nyirenda M, Bakunzi F. Canine aflatoxicosis outbreak in South Africa (2011): A possible multi-mycotoxins aetiology. *J S Afr Vet Assoc*. 2013 Jun 11;84(1). doi:10.4102/jsava.v84i1.133
131. Zwierzchowski W, Gajęcki M, Obremski K, Zielonka Ł, Baranowski M. The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2004. p. 289–93.
132. Safety evaluation of certain mycotoxins in food (JECFA 47, 2001) [Internet]. [cited 2024 Oct 11]. Available from: <https://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v47je01.htm>
133. Opinion of the Scientific Panel on contaminants in the food chain [CONTAM] related to fumonisins as undesirable substances in animal feed. *EFSA J*. (EFSA Journal). doi:10.2903/j.efsa.2005.235
134. en.pdf [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from: <https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsi>

tes%252Fcodex%252FShared%2BDocuments%252FArchive%252FMeetin
gs%252FCCCF%252Fcccf4%252Fcf04_05e.pdf

135. out73_en.pdf [Internet]. [cited 2026 Jan 15]. Available from:
https://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out73_en.pdf
136. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva:
WHO; 2012. 825 p. (The ... Meeting of the Joint FAO WHO Expert Committee
on Food Additives; no. 74).
137. Norred WP, Plattner RD, Vesonder RF, Bacon CW, Voss KA. Effects of
selected secondary metabolites of *Fusarium moniliforme* on unscheduled
synthesis of DNA by rat primary hepatocytes. *Food Chem Toxicol.* 1992
Mar;30(3):233–7. doi:10.1016/0278-6915(92)90038-M
138. A Critical Look at the Impact of Fumonisin B1, Fumonisin B2 and Fumonisin
B3 on Health and Agriculture | Fermentek [Internet]. [cited 2026 Apr 17].
Available from: [https://www.fermentek.com/critical-look-impact-
fumonisin-b1-fumonisin-b2-and-fumonisin-b3-health-and-agriculture](https://www.fermentek.com/critical-look-impact-fumonisin-b1-fumonisin-b2-and-fumonisin-b3-health-and-agriculture)
139. Smith GW, Gupta RC. Fumonisins. In: *Veterinary Toxicology* [Internet].
Elsevier; 2025 [cited 2026 Jan 15]. p. 1039–56. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443290077000674>
doi:10.1016/B978-0-443-29007-7.00067-4
140. NutritionA. Mycotoxins in PetFood: Risks and Natural Alternatives [Internet].
2025 Apr 28 [cited 2026 Jan 28]. Available from:
[https://alerisnutrition.com/en/2025/04/28/mycotoxins-in-petfood-risks-
and-natural-alternatives/](https://alerisnutrition.com/en/2025/04/28/mycotoxins-in-petfood-risks-and-natural-alternatives/)
141. Rychlik M, Humpf HU, Marko D, Dänicke S, Mally A, Berthiller F, et al.
Proposal of a comprehensive definition of modified and other forms of
mycotoxins including “masked” mycotoxins. *Mycotoxin Res.* 2014
Nov;30(4):197–205. doi:10.1007/s12550-014-0203-5

142. Lu Q, Qin JA, Fu YW, Luo JY, Lu JH, Logrieco AF, et al. Modified mycotoxins in foodstuffs, animal feed, and herbal medicine: A systematic review on global occurrence, transformation mechanism and analysis methods. *TrAC Trends Anal Chem.* 2020 Dec;133:116088. doi:10.1016/j.trac.2020.116088
143. Nešić K, Habschied K, Mastanjević K. Modified Mycotoxins and Multitoxin Contamination of Food and Feed as Major Analytical Challenges. *Toxins.* 2023 Aug 19;15(8):511. doi:10.3390/toxins15080511
144. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified forms of certain mycotoxins in food and feed. *EFSA J.* 2014 Dec;12(12). doi:10.2903/j.efsa.2014.3916
145. Kolawole O, Siri-Anusornsak W, Petchkongkaew A, Elliott C. A systematic review of global occurrence of emerging mycotoxins in crops and animal feeds, and their toxicity in livestock. *Emerg Contam.* 2024 Sep;10(3):100305. doi:10.1016/j.emcon.2024.100305
146. Lapris M, Errico M, Rocchetti G, Gallo A. The Potential of Multi-Screening Methods and Omics Technologies to Detect Both Regulated and Emerging Mycotoxins in Different Matrices. *Foods.* 2024 Jun 2;13(11):1746. doi:10.3390/foods13111746
147. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific Opinion on the risks to human and animal health related to the presence of beauvericin and enniatins in food and feed. *EFSA J.* 2014 Aug;12(8). doi:10.2903/j.efsa.2014.3802
148. Shimshoni JA, Cuneah O, Sulyok M, Krska R, Galon N, Sharir B, et al. Mycotoxins in corn and wheat silage in Israel. *Food Addit Contam Part A.* 2013 Sep;30(9):1614–25. doi:10.1080/19440049.2013.802840

149. Muñoz-Solano B, González-Peñas E. Co-Occurrence of Mycotoxins in Feed for Cattle, Pigs, Poultry, and Sheep in Navarra, a Region of Northern Spain. *Toxins*. 2023 Feb 22;15(3):172. doi:10.3390/toxins15030172
150. Smith MC, Madec S, Coton E, Hymery N. Natural Co-Occurrence of Mycotoxins in Foods and Feeds and Their in vitro Combined Toxicological Effects. *Toxins*. 2016 Mar 26;8(4):94. doi:10.3390/toxins8040094
151. Mwanza M, Kametler L, Bonai A, Rajli V, Kovacs M, Dutton MF. The cytotoxic effect of fumonisin B1 and ochratoxin A on human and pig lymphocytes using the Methyl Thiazol Tetrazolium (MTT) assay. *Mycotoxin Res*. 2009 Dec 1;25(4):233–8. doi:10.1007/s12550-009-0033-z
152. Grandi M, Vecchiato CG, Biagi G, Zironi E, Tondo MT, Pagliuca G, et al. Occurrence of Mycotoxins in Extruded Commercial Cat Food. *ACS Omega*. 2019 Aug 27;4(9):14004–12. doi:10.1021/acsomega.9b01702
153. Shao M, Li L, Gu Z, Yao M, Xu D, Fan W, et al. Mycotoxins in commercial dry pet food in China. *Food Addit Contam Part B*. 2018 Oct 2;11(4):237–45. doi:10.1080/19393210.2018.1475425
154. Kwaß LM, Khiaosa-ard R, Zebeli Q, Sulyok M, Milojevic V, Metzler-Zebeli BU. Exposure of horses to biotoxins, phytoestrogens, and pesticides from different feed materials and supplementary feeds. *J Equine Vet Sci*. 2025 Aug;151:105632. doi:10.1016/j.jevs.2025.105632
155. Guo Z, Zhu Z, Huang S, Wang J. Non-targeted screening of pesticides for food analysis using liquid chromatography high-resolution mass spectrometry-a review. *Food Addit Contam Part A*. 2020 Jul 2;37(7):1180–201. doi:10.1080/19440049.2020.1753890
156. Wong JW, Wang J, Chow W, Carlson R, Jia Z, Zhang K, et al. Perspectives on Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry for Pesticide Screening in Foods. *J Agric Food Chem*. 2018 Sep 19;66(37):9573–81. doi:10.1021/acs.jafc.8b03468

157. Picó Y, El-Sheikh MA, Alfarhan AH, Barceló D. Target vs non-target analysis to determine pesticide residues in fruits from Saudi Arabia and influence in potential risk associated with exposure. *Food Chem Toxicol.* 2018;111:53–63. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.10.060>
158. Negash D. *Animal Feed Safety: Cases and Approaches to Identify the Contaminants and Toxins.* 2020.
159. Macías-Montes A, Luzardo OP, Zaccaroni A, Acosta-Dacal A. Optimization and validation of a QuEChERS-based method with a freezing-out clean-up for pesticide residues in commercial dry food for dogs and cats. *J Chromatogr A.* 2025 Aug;1756:466093. doi:10.1016/j.chroma.2025.466093
160. Cho HW, Seo K, Jeong JY, Chun JL, Kim KH. Evaluating sulfoxaflor residues in pig tissues using animal modeling. *J Anim Sci Technol.* 2022;64(5):911–21. doi:10.5187/jast.2022.e67
161. Li ZM, Robinson M, Kannan K. An assessment of exposure to several classes of pesticides in pet dogs and cats from New York, United States. *Environ Int.* 2022 Nov;169:107526. doi:10.1016/j.envint.2022.107526
162. Wise CF, Hammel SC, Herkert NJ, Ospina M, Calafat AM, Breen M, et al. Comparative Assessment of Pesticide Exposures in Domestic Dogs and Their Owners Using Silicone Passive Samplers and Biomonitoring. *Environ Sci Technol.* 2022 Jan 18;56(2):1149–61. doi:10.1021/acs.est.1c06819
163. Peterson ME, Ward CR. Etiopathologic Findings of Hyperthyroidism in Cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2007;37(4):633–45. doi:<https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2007.05.001>
164. Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC (Text with EEA relevance) [Internet]. 2025 Aug 24. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/396/2025-08-24>

165. Macías-Montes A, Luzardo OP, Zaccaroni A, Acosta-Dacal A. Pesticides residues in pet food: A market-based study on prevalence and toxicological implications. *Environ Pollut.* 2025 Jul;376:126399. doi:10.1016/j.envpol.2025.126399
166. World Health Organization, editor. WHO guidelines on use of medically important antimicrobials in food-producing animals. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2017. 1 p.
167. Khalifa HO, Shikoray L, Mohamed MYI, Habib I, Matsumoto T. Veterinary Drug Residues in the Food Chain as an Emerging Public Health Threat: Sources, Analytical Methods, Health Impacts, and Preventive Measures. *Foods.* 2024 May 23;13(11):1629. doi:10.3390/foods13111629
168. Khalifa HO, Shikoray L, Mohamed MYI, Habib I, Matsumoto T. Veterinary Drug Residues in the Food Chain as an Emerging Public Health Threat: Sources, Analytical Methods, Health Impacts, and Preventive Measures. *Foods.* 2024 May 23;13(11):1629. doi:10.3390/foods13111629
169. Boti V, Martinaiou P, Gkountouras D, Albanis T. Target and suspect screening approaches for the identification of emerging and other contaminants in fish feeds using high resolution mass spectrometry. *Environ Res.* 2024 Jun;251:118739. doi:10.1016/j.envres.2024.118739
170. Gómez-Pérez ML, Romero-González R, Martínez Vidal JL, Garrido Frenich A. Analysis of veterinary drug and pesticide residues in animal feed by high-resolution mass spectrometry: comparison between time-of-flight and Orbitrap. *Food Addit Contam Part A.* 2015 Oct 3;32(10):1637–46. doi:10.1080/19440049.2015.1023742 PubMed PMID: 25785350.
171. Medicine C for V. CVM GFI #272 Practices to Prevent Unsafe Contamination of Animal Feed from Drug Carryover [Internet]. FDA; 2023 [cited 2026 Jan 25]. Available from: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/cvm-gfi-272-practices-prevent-unsafe-contamination-animal-feed-drug-carryover>

172. Kumar A, Bhattacharyya A, Shinde R, Dhanshetty M, Elliott CT, Banerjee K. Development and validation of a multiresidue method for pesticides and selected veterinary drugs in animal feed using liquid- and gas chromatography with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2020 Sep;1627:461416. doi:10.1016/j.chroma.2020.461416
173. Ates E, Godula M, Stroka J, Senyuva H. Screening of plant and fungal metabolites in wheat, maize and animal feed using automated on-line clean-up coupled to high resolution mass spectrometry. *Food Chem*. 2014 Jan;142:276–84. doi:10.1016/j.foodchem.2013.07.054
174. Blaney BJ. Plant and fungal toxins as contaminants of feed and meat. In: *Improving the Safety of Fresh Meat* [Internet]. Elsevier; 2005 [cited 2026 Jan 25]. p. 77–101. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781855739550500042> doi:10.1533/9781845691028.1.77
175. Mol HGJ, Van Dam RCJ, Zomer P, Mulder PPJ. Screening of plant toxins in food, feed and botanicals using full-scan high-resolution (Orbitrap) mass spectrometry. *Food Addit Contam Part A*. 2011 Oct;28(10):1405–23. doi:10.1080/19440049.2011.603704
176. Speijers G, Alink GM, Saeger S de, Hardy A, Magan N, Pilegaard K, et al. Evaluation of agronomic practices for mitigation of natural toxins [Internet]. ILSI Europe; 2010 [cited 2026 Jan 25]. Available from: <https://research.wur.nl/en/publications/evaluation-of-agronomic-practices-for-mitigation-of-natural-toxin/>
177. Salgueiro L, Martins AP, Correia H. Raw materials: the importance of quality and safety. A review. *Flavour Fragr J*. 2010 Sep;25(5):253–71. doi:10.1002/ffj.1973
178. Glucosinolates as undesirable substances in animal feed - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food Chain. *EFSA J*. (EFSA Journal). doi:10.2903/j.efsa.2008.590

179. Monbaliu S, Van Peteghem C, De Saeger S. Detection and determination of natural toxins (mycotoxins and plant toxins) in feed. In: *Animal Feed Contamination* [Internet]. Elsevier; 2012 [cited 2026 Jan 25]. p. 286–325. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845697259500121>
doi:10.1533/9780857093615.3.286
180. Than KA, Stevens V, Knill A, Gallagher PF, Gaul KL, Edgar JA, et al. Plant-associated toxins in animal feed: Screening and confirmation assay development. *Anim Feed Sci Technol.* 2005;121(1):5–21. doi:<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2005.02.005>
181. Choudhary A, Dhewa T. Natural plant toxins in food: A comprehensive review of health implications, processing changes and regulatory challenges. *Food Chem Adv.* 2025 Dec;9:101139. doi:10.1016/j.focha.2025.101139
182. Ogutu FO, Wafula GW, Makori SI, Omondi MO, Kitur NJ. Natural Toxins in Plant Foods: Health Implications. *Asian Food Sci J.* 2018 May 23;2(3):1–13. doi:10.9734/AFSJ/2018/39989
183. Urugo MM, Tringo TT. Naturally Occurring Plant Food Toxicants and the Role of Food Processing Methods in Their Detoxification. Salmerón I, editor. *Int J Food Sci.* 2023 Apr 27;2023:1–16. doi:10.1155/2023/9947841
184. Mycotoxins - Food Safety - European Commission [Internet]. [cited 2026 Jan 25]. Available from: https://food.ec.europa.eu/food-safety/chemical-safety/contaminants/catalogue/mycotoxins_en
185. Program HF. Mycotoxins. FDA [Internet]. 2024 Sep 26 [cited 2026 Jan 25]. Available from: <https://www.fda.gov/food/natural-toxins-food/mycotoxins>
186. Mycotoxins [Internet]. [cited 2026 Jan 25]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/mycotoxins>

187. Directive - 2002/32 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cited 2026 Jan 26]. Available from: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX%3A32002L0032>
188. Commission Recommendation (EU) 2016/1319 of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food (Text with EEA relevance). OJ L [Internet]. 2016 Jul [cited 2026 Jan 26]. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reco/2016/1319/oj>
189. 2013/637/EU: Commission Recommendation of 4 November 2013 amending Recommendation 2006/576/EC as regards T-2 and HT-2 toxin in compound feed for cats Text with EEA relevance. OJ L [Internet]. 2013 Nov [cited 2026 Jan 26]. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reco/2013/637/oj>
190. Commission Recommendation of 17 August 2006 on the presence of deoxynivalenol, zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding (Text with EEA relevance). OJ L [Internet]. 2006 Aug [cited 2026 Jan 26]. Available from: <http://data.europa.eu/eli/reco/2006/576/oj>
191. 2005/396/EC: Commission Decision of 19 January 2005 relating to a proceeding pursuant to Article 81 of the EC Treaty and Article 53(1) of the EEA Agreement (Case COMP/C.2/37.214 — Joint selling of the media rights to the German Bundesliga) (notified under document number C(2005) 78) (Text with EEA relevance). OJ L [Internet]. 2005 Jan 19. Available from: <http://data.europa.eu/eli/dec/2005/396/oj>
192. Pinotti L, Ottoboni M, Giromini C, Dell'Orto V, Cheli F. Mycotoxin Contamination in the EU Feed Supply Chain: A Focus on Cereal Byproducts. *Toxins*. 2016 Feb 15;8(2):45. doi:10.3390/toxins8020045

193. Janik E, Niemcewicz M, Podogrocki M, Ceremuga M, Gorniak L, Stela M, et al. The Existing Methods and Novel Approaches in Mycotoxins' Detection. *Molecules*. 2021 Jun 29;26(13):3981. doi:10.3390/molecules26133981
194. Zhang L, Dou XW, Zhang C, Logrieco A, Yang MH. A Review of Current Methods for Analysis of Mycotoxins in Herbal Medicines. *Toxins*. 2018 Feb 2;10(2):65. doi:10.3390/toxins10020065
195. Turner NW, Bramhmbhatt H, Szabo-Vezse M, Poma A, Coker R, Piletsky SA. Analytical methods for determination of mycotoxins: An update (2009–2014). *Anal Chim Acta*. 2015 Dec;901:12–33. doi:10.1016/j.aca.2015.10.013
196. Wu A, Khan WS, editors. *Nanobiosensors: From Design to Applications* [Internet]. 1st ed. Wiley; 2020 [cited 2026 Jan 26]. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9783527345137>
doi:10.1002/9783527345137
197. Lattanzio VMT, Von Holst C, Lippolis V, De Girolamo A, Logrieco AF, Mol HGJ, et al. Evaluation of Mycotoxin Screening Tests in a Verification Study Involving First Time Users. *Toxins*. 2019 Feb 20;11(2):129. doi:10.3390/toxins11020129
198. Urusov AE, Zherdev AV, Dzantiev BB. Immunochemical methods of mycotoxin analysis (review). *Appl Biochem Microbiol*. 2010 May;46(3):253–66. doi:10.1134/S0003683810030038
199. Rico-Yuste A, Walravens J, Urraca JL, Abou-Hany RAG, Descalzo AB, Orellana G, et al. Analysis of alternariol and alternariol monomethyl ether in foodstuffs by molecularly imprinted solid-phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chem*. 2018 Mar;243:357–64. doi:10.1016/j.foodchem.2017.09.125
200. Van Wijk XMR, Goodnough R, Colby JM. Mass spectrometry in emergency toxicology: Current state and future applications. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2019 May 19;56(4):225–38. doi:10.1080/10408363.2019.1585415

201. Gkountouras D, Boti V, Albanis T. High resolution mass spectrometry targeted analysis and suspect screening of pesticide residues in fruit samples and assessment of dietary exposure. *Environ Pollut.* 2024 Jul;352:124143. doi:10.1016/j.envpol.2024.124143
202. Hollender J, Schymanski EL, Ahrens L, Alygizakis N, Béen F, Bijlsma L, et al. NORMAN guidance on suspect and non-target screening in environmental monitoring. *Environ Sci Eur.* 2023 Sep 4;35(1):75. doi:10.1186/s12302-023-00779-4
203. González-Gaya B, Lopez-Herguedas N, Bilbao D, Mijangos L, Iker AM, Etxebarria N, et al. Suspect and non-target screening: the last frontier in environmental analysis. *Anal Methods.* 2021;13(16):1876–904. doi:10.1039/D1AY00111F
204. Mohammed Taha H, Aalizadeh R, Alygizakis N, Antignac JP, Arp HPH, Bade R, et al. The NORMAN Suspect List Exchange (NORMAN-SLE): facilitating European and worldwide collaboration on suspect screening in high resolution mass spectrometry. *Environ Sci Eur.* 2022 Dec;34(1):104. doi:10.1186/s12302-022-00680-6
205. Schymanski EL, Jeon J, Gulde R, Fenner K, Ruff M, Singer HP, et al. Identifying Small Molecules via High Resolution Mass Spectrometry: Communicating Confidence. *Environ Sci Technol.* 2014 Feb 18;48(4):2097–8. doi:10.1021/es5002105
206. Izzo L, Castaldo L, Narváez A, Gaspari A, Grosso M, Rodríguez-Carrasco Y, et al. Target analysis and retrospective screening of contaminants in ready-to-eat cooked ham samples through UHPLC-Q-Orbitrap HRMS. *Food Chem.* 2023 May;408:135244. doi:10.1016/j.foodchem.2022.135244
207. Pantano L, La Scala L, Olibrio F, Galluzzo FG, Bongiorno C, Buscemi MD, et al. QuEChERS LC–MS/MS Screening Method for Mycotoxin Detection in Cereal Products and Spices. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Apr 4;18(7):3774. doi:10.3390/ijerph18073774

208. Marín-Sáez J, Álvarez-Romero M, López-Ruiz R, García-Campaña AM, Sáez MI, Gámiz-Gracia L, et al. Simultaneous determination of mycotoxins and pesticides by UHPLC-HRMS in aquaculture feed from intensive farms. *Microchem J.* 2025 Dec;219:116043. doi:10.1016/j.microc.2025.116043
209. Viñas P, Campillo N. Gas Chromatography: Mass Spectrometry Analysis of Polyphenols in Foods. In: *Polyphenols in Plants* [Internet]. Elsevier; 2019 [cited 2026 Jan 27]. p. 285–316. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128137680000165> doi:10.1016/B978-0-12-813768-0.00016-5
210. Μαργαρίτα Γ. Καψή. Ανάπτυξη αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού παρασιτοκτόνων σε ιχθυοκαλλιέργειες και εκτίμηση επικινδυνότητας. 2020.
211. Μπαρτζιοπούλου Μαργαρίτα. Διαχρονική παρακολούθηση επίπεδων συγκέντρωσης υπολειμμάτων φυτοφάρμακων στα υδάτινα συστήματα ποταμών της Ηπείρου με τεχνικές φασματομετρίας μάζας, υψηλής διακριτικής ικανότητας. 2023.
212. Rockwood AL, Kushnir MM, Clarke NJ. Mass Spectrometry. In: *Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry* [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2026 Jan 27]. p. 33–65. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128160633000025> doi:10.1016/B978-0-12-816063-3.00002-5
213. Steiner D, Malachová A, Sulyok M, Krska R. Challenges and future directions in LC-MS-based multiclass method development for the quantification of food contaminants. *Anal Bioanal Chem.* 2021 Jan;413(1):25–34. doi:10.1007/s00216-020-03015-7
214. Χριστίνα Ι. Νάννου. Σύγχρονες αναλυτικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών και φαρμακευτικών ενώσεων σε φυσικά νερά και ιζήματα. 2018.

215. Schulze B, Jeon Y, Kaserzon S, Heffernan AL, Dewapriya P, O'Brien J, et al. An assessment of quality assurance/quality control efforts in high resolution mass spectrometry non-target workflows for analysis of environmental samples. *TrAC Trends Anal Chem.* 2020 Dec;133:116063. doi:10.1016/j.trac.2020.116063
216. Γκουντούρας Δημήτριος. Σύγχρονες αναλυτικές μεθοδολογίες στοχευμένης και μη στοχευμένης ανάλυσης υπολειμμάτων φυτοφάρμακων σε φρούτα και λαχανικά με χρήση LC-HRMS τεχνικών. 2023.
217. Χριστίνα Ι. Κοσμά. Ανίχνευση, μεταφορά και φωτολυτική διάσπαση φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον. 2013.
218. Κίτσου Ειρήνη. Προσδιορισμός επιπέδων υπολειμμάτων φυτοπροστατευτικών ενώσεων σε οίνους Ελληνικής προέλευσης με χρήση μεθοδολογίας QuEChERS-LC-LTQ/Orbitrap MS. 2022.
219. Baduel C, Mueller JF, Tsai H, Gomez Ramos MJ. Development of sample extraction and clean-up strategies for target and non-target analysis of environmental contaminants in biological matrices. *J Chromatogr A.* 2015 Dec;1426:33–47. doi:10.1016/j.chroma.2015.11.040
220. Yeo CE, Gwon S, Chang EH, Kim HY, Kim SY, Seo K, et al. Concurrent Quantification of Deoxynivalenol, Its Derivatives, and Nivalenol in Pet Food Using QuEChERS Combined with LC-MS/MS. *Toxins.* 2025 Dec 10;17(12):590. doi:10.3390/toxins17120590
221. Seo H, Jang S, Jo H, Kim H, Lee S, Yun H, et al. Optimization of the QuEChERS-Based Analytical Method for Investigation of 11 Mycotoxin Residues in Feed Ingredients and Compound Feeds. *Toxins.* 2021 Oct 29;13(11):767. doi:10.3390/toxins13110767
222. Anastassiades M, Lehotay SJ, Štajnbaher D, Schenck FJ. 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.* 2003 Mar 1;86(2):412–31. doi:10.1093/jaoac/86.2.412
223. Casado N, Morante-Zarcero S, Sierra I. Application of the QuEChERS Strategy as a Useful Sample Preparation Tool for the Multiresidue Determination of Pyrrolizidine Alkaloids in Food and Feed Samples: A Critical Overview. *Appl Sci.* 2022 Apr 25;12(9):4325. doi:10.3390/app12094325
224. Λαιμού-Γερανιού Μ. Προσδιορισμός υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε εδαφικά δείγματα με την τεχνική QuEChERS σε συνδυασμό με υγρή χρωματογραφία με φασματομέτρα μάζας. 2020.
225. Gkountouras D, Boti V, Albanis T. Pesticides and transformation products footprint in Greek market basket vegetables: Comprehensive screening by HRMS and health risk assessment. *Sci Total Environ.* 2024 Nov;953:176085. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.176085
226. Tang D, Chen M, Huang X, Zhang G, ZEAg L, Zhang G, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing. Yin Y, editor. *PLOS ONE.* 2023 Nov 9;18(11):e0294236. doi:10.1371/journal.pone.0294236
227. Zhang Y, Chen T, Wang Z, Liang W, Wang X, Zhang X, et al. High-resolution mass spectrometry-based suspect and nontarget screening of natural toxins in foodstuffs and risk assessment of dietary exposure. *Environ Pollut.* 2025 Jan;365:125338. doi:10.1016/j.envpol.2024.125338
228. European Food Safety Authority (EFSA). Aflatoxins (sum of B1, B2, G1, G2) in cereals and cereal-derived food products. *EFSA Support Publ.* 2013 Mar 25;10(3). doi:10.2903/sp.efsa.2013.EN-406
229. Janavičienė S, Mankevičienė A, Kochiieru Y, Venslovas E. T-2 and HT-2 toxins in harvested oat grains and their prevalence in whole grain flour during storage. *Food Addit Contam Part A.* 2022 Jul 3;39(7):1284–95. doi:10.1080/19440049.2022.2063392

230. Hjelkrem IS AGR; Aamot, HU; Brodal, G; Strand, EC; Torp, T; Edwards, SG; Dill Macky, R; Hofgaard. HT-2 and T-2 Toxins in Norwegian Oat Grains Related to Weather Conditions at Different Growth Stages. 2018. doi:10.1007/s10658-017-1394-3.
231. Guo W, Feng D, Yang X, Zhao Z, Yang J. Screening and dietary exposure assessment of T-2 toxin and its modified forms in commercial cereals and cereal-based products in Shanghai. *Food Chem X*. 2024 Mar;21:101199. doi:10.1016/j.fochx.2024.101199
232. Nácher-Mestre F J; Serrano, R; Portolés, T; Berntssen, MHG; Pérez Sánchez, J; Hernández. Screening of Pesticides and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Feeds and Fish Tissues by Gas Chromatography Coupled to High-Resolution Mass Spectrometry Using Atmospheric Pressure Chemical Ionization. 2014. doi:10.1021/jf405366n.
233. Walorczyk S, Drożdżyński D. Improvement and extension to new analytes of a multi-residue method for the determination of pesticides in cereals and dry animal feed using gas chromatography–tandem quadrupole mass spectrometry revisited. *J Chromatogr A*. 2012 Aug;1251:219–31. doi:10.1016/j.chroma.2012.06.055
234. Caloni F F; Cortinovis, C; Rivolta, M; Davanzo. Suspected Poisoning of Domestic Animals by Pesticides. 2016. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.09.005.
235. Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for pirimiphos-methyl according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA J*. (2015;13(1):3974). doi:10.2903/j.efsa.2015.3974
236. Bacanlı N M; Başaran. Importance of Antibiotic Residues in Animal Food. 2019. doi:10.1016/j.fct.2019.01.033.

237. Rizal GM, Gyeltshen J, Namgay K. Evaluation of animal feeds for the presence of three important antibiotic classes in Bhutan. *J Glob Antimicrob Resist.* 2018 Dec;15:228–31. doi:10.1016/j.jgar.2018.08.006
238. Ferriol-González C, Domingo-Calap P. Phage Therapy in Livestock and Companion Animals. *Antibiotics.* 2021 May 11;10(5):559. doi:10.3390/antibiotics10050559
239. Gaugain M, Fourmond MP, Fuselier R, Verdon E, Roudaut B, Pessel D. Control of Antimicrobials in Feed Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Assessment of Cross-Contamination Rates at the Farm Level. *J Agric Food Chem.* 2020 Aug 26;68(34):9033–42. doi:10.1021/acs.jafc.0c02999
240. Woźniak-Potocka I, Mannelli C, Boruszewska D, Kowalczyk-Zieba I, Waśniewski T, Skarżyński DJ. Diverse Effects of Phytoestrogens on the Reproductive Performance: Cow as a Model. *Int J Endocrinol.* 2013;2013:1–15. doi:10.1155/2013/650984
241. De Nijs M, Noordam MY, Mol HGJ. Short inventory of EU legislation on plant toxins in food. *Qual Assur Saf Crops Foods.* 2017 Jan;9(1):129–39. doi:10.3920/QAS2016.0862
242. Benford DJ. Risk Assessment of Chemical Contaminants and Residues in Food. In: *Chemical Contaminants and Residues in Food* [Internet]. Elsevier; 2017 [cited 2025 Dec 24]. p. 3–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081006740000011> doi:10.1016/B978-0-08-100674-0.00001-1
243. Dusza I; et al L; Cierieszko, R; Skarżyński, DJ; Nogowski, L; Opałka, M; Kamińska, B; Nynca, A; Kraszewska, O; Słomczyńska, M; Woźniak Potocka. Mechanism of Phytoestrogens Action in Reproductive Processes of Mammals and Birds. 2006.