



Σχολή Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας  
Τμήμα Βιοϊατρικών Επιστημών



Εργαστήριο Χημείας, Βιοχημείας, Κοσμητολογίας

ΠΡΟΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

## Μέθοδοι προσδιορισμού διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών και αντιβιοτικών στα τρόφιμα

GRADUATE THESIS

### Methods for the determination of several pharmaceutical substances and antibiotics in food



ΟΝΟΜΑ ΦΟΙΤΗΤΗ/NAME OF STUDENT

**Βασιλική Γιακουμάκη**

Vasiliki Giakoumaki

ΟΝΟΜΑ ΕΙΣΗΓΗΤΗ/NAME OF THE SUPERVISOR

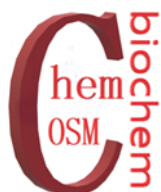
Μαρία Τράπαλη

**Maria Trapali**

ΑΙΓΑΛΕΩ/AIGALEO 2021



Faculty of Health and Caring Professions  
Department of Biomedical Sciences



Laboratory of Chemistry, Biochemistry, Cosmetology

GRADUATE THESIS

**Methods for the determination of several pharmaceutical  
substances and antibiotics in food**

VASILIKI GIAKOUMAKI

Registration number

[basw.giak@gmail.com](mailto:basw.giak@gmail.com)

FIRST SUPERVISOR

MARIA TRAPALI

SECOND SUPERVISOR

CHRISTINE FOUNTZOULA

THIRD SUPERVISOR

PETROS KARKALOUSOS

AIGALEO 2021



## **Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας**

Η κάτωθι υπογεγραμμένη *Γιακουμάκη Βασιλική* του *Αντωνίου*, με αριθμό μητρώου 62117018 φοιτήτρια του Τμήματος Βιοϊατρικών Επιστημών της Σχολής Επιστημών Υγείας και Πρόνοιας του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής, δηλώνω ότι:

«Είμαι συγγραφέας αυτής της πτυχιακής/διπλωματικής εργασίας και ότι κάθε βοήθεια την οποία είχα για την προετοιμασία της είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται στην εργασία. Επίσης, οι όποιες πηγές από τις οποίες έκανα χρήση δεδομένων, ιδεών ή λέξεων, είτε ακριβώς είτε παραφρασμένες, αναφέρονται στο σύνολό τους, με πλήρη αναφορά στους συγγραφείς, τον εκδοτικό οίκο ή το περιοδικό, συμπεριλαμβανομένων και των πηγών που ενδεχομένως χρησιμοποιήθηκαν από το διαδίκτυο. Επίσης, βεβαιώνω ότι αυτή η εργασία έχει συγγραφεί από μένα αποκλειστικά και αποτελεί προϊόν πνευματικής ιδιοκτησίας τόσο δικής μου, όσο και του Ιδρύματος. Παράβαση της ανωτέρω ακαδημαϊκής μου ευθύνης αποτελεί ουσιώδη λόγο για την ανάκληση του πτυχίου μου».

Όνομα φοιτητή

Βασιλική Γιακουμάκη

Υπογραφή φοιτητή

## **Ευχαριστίες**

Για την εκπόνηση της παρούσας βιβλιογραφικής πτυχιακής εργασίας θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην επιβλέπουσα καθηγήτρια και λέκτορα Βιοχημείας και Κλινικής Χημείας κα. Μαρία Τράπαλη, για την εισήγηση του θέματος της εργασίας, καθώς και για την επίβλεψη και την άψογη συνεργασία μας. Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου, η οποία στάθηκε δίπλα μου κατά τη διάρκεια των σπουδών μου.

## Αφιερώσεις

“η θεωρία οδηγεί,  
το πείραμα αποφασίζει”

I.M. Kolthoff



## Περίληψη

Τα τελευταία χρόνια, η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων (όπως τα αντιβιοτικά) και των φυτοφαρμάκων στην κτηνοτροφία, στην υδατοκαλλιέργεια και στη γεωργία είναι ένα φαινόμενο το οποίο αυξάνεται με ραγδαίο ρυθμό. Με τη χρήση αυτών καθίσταται δυνατή η πρόληψη και η θεραπεία ζωικών ασθενειών οφειλόμενων σε μικροοργανισμούς όπως είναι τα παράσιτα, τα βακτήρια κ.α. Ωστόσο, η εμφάνιση φαρμακευτικών καταλοίπων σε προϊόντα που παράγονται από αυτά τα ζώα και καταναλώνονται από τον άνθρωπο, μπορεί να θέσει σε σοβαρό κίνδυνο την υγεία του ανθρώπου. Γι' αυτό καθίσταται απαραίτητος ο προσδιορισμός των ουσιών αυτών με διάφορες μεθόδους. Η συγκεκριμένη εργασία στοχεύει στην αναφορά των κύριων και πιο συχνών μεθόδων προετοιμασίας των δειγμάτων τροφίμων προς ανάλυση, αλλά και των αναλυτικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των υπολειμμάτων φαρμακευτικών ουσιών στα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα οι αναλυτικές τεχνικές διαχωρίζονται σε μικροβιακές, ανοσολογικές και φυσικοχημικές, με τις τελευταίες να κυριαρχούν σε αυτόν τον τομέα. Ανάμεσα στις χρωματογραφικές τεχνικές, η συνδυασμένη LC-MS/MS φαίνεται να υπερτερεί καθώς χαρακτηρίζεται από μεγάλη ευαισθησία και επιλεκτικότητα, ενώ παράλληλα με μία μόνο ανάλυση καθίσταται δυνατή η ποσοτικοποίηση πολλαπλών αναλυτών στόχων σε σύνθετες μήτρες τροφίμων.

Λέξεις κλειδιά: φαρμακευτικές ουσίες, αντιβιοτικά, κτηνιατρικά φάρμακα, προετοιμασία δείγματος, αναλυτικοί μέθοδοι





## **Abstract**

In recent years, the use of veterinary drugs (such as antibiotics) and pesticides in animal husbandry, aquaculture and agriculture has been growing rapidly. By using them, the prevention and the treatment of animal diseases due to microorganisms such as parasites, bacteria etc., becomes possible. However, the appearance of drug residues in products produced by these animals and the consumption by human, can pose a serious risk to the human health. Therefore, it is necessary the identification of these substances by various methods. This paper aims to report the main and the most common methods of preparing food samples for analysis, but also the analytical techniques which are used to determine drug residues in food. More specifically, analytical techniques are divided into microbial, immunological and physico-chemical, with the last one dominating in this sector. Among the chromatographic techniques, the combined LC-MS/MS seems to be superior, as it is characterized by great sensitivity and selectivity, while in parallel, only one analysis is capable of quantifying multiple target analyzers in complex food matrices.

Key words: pharmaceutical substances, antibiotics, veterinary drugs, sample preparation, analytical methods

# Περιεχόμενα

Δήλωση συγγραφέα προπτυχιακής διπλωματικής εργασίας.....	IV
Ευχαριστίες.....	V
Αφιερώσεις.....	VI
Περίληψη.....	VIII
Abstract.....	X
Συνομογραφίες.....	XIV
Πρόλογος.....	1
Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή στις φαρμακευτικές ουσίες.....	3
1.1. Φαρμακευτικές ουσίες.....	3
1.1.1. Αντιπαρασιτικά – Αντιελμινθικά φάρμακα.....	3
1.1.2. Αντιοξυδωσικά φάρμακα.....	4
1.1.3 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα.....	4
1.1.4 Φυτοφάρμακα.....	5
1.2. Κατάλοιπα φαρμακευτικών ουσιών.....	6
Κεφάλαιο 2. Αντιβιοτικά – Αντιμικροβιακά φάρμακα.....	9
2.1 Δράση και ταξινόμηση αντιβιοτικών.....	9
2.2 Αντίσταση στα αντιβιοτικά.....	10
2.2.1. Μικροβιακή αντίσταση και τρόφιμα.....	11
Κεφάλαιο 3. Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων.....	14
3.1 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction – SPE).....	14
3.1.1. Αρχή μεθόδου.....	14
3.1.2. Οργανολογία.....	15
3.1.3. Επιλογή φυσιγγίων.....	16
3.1.4. Κατηγορίες στατικής φάσης.....	16
3.1.5. Επιλογή κατάλληλου προσροφητικού υλικού.....	16
3.2 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid-Phase Microextraction – SPME).....	17
3.2.1 Αρχή μεθόδου.....	18
3.2.2 Οργανολογία.....	18
3.2.3 Κατηγορίες τρόπου εκχύλισης SPME.....	19
3.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα.....	20

3.3. Τεχνολογία μοριακής αποτύπωσης (Molecular Imprinting Technology – MIT) .....	21
3.3.1 Παρασκευή MIPs .....	22
3.3.2. Είδη μοριακής αποτύπωσης .....	23
3.3.3 Εφαρμογή MIT σε SPE και SPME .....	24
3.4 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction – LLE) .....	26
3.4.1. Αρχή μεθόδου.....	26
3.4.2. Επιλογή διαλύτη εκχύλισης.....	27
3.4.3 Μειονεκτήματα και παραλλαγές της LLE.....	28
3.5 QuEChERS.....	29
3.5.1 Ιστορικά στοιχεία.....	29
3.5.2. Σύγκριση QuEChERS με άλλες τεχνικές προετοιμασίας .....	30
3.5.3 Αρχή μεθόδου.....	30
3.5.4. Τροποποιήσεις μεθόδου .....	31
3.5.5. Εφαρμογές.....	32
Κεφάλαιο 4. Αναλυτικές μέθοδοι .....	33
4.1. Δοκιμασία Μικροβιακής Αναστολής (Microbial Inhibition Test – MIT).....	33
4.1.1 Κατηγορίες δοκιμασιών μικροβιακής αναστολής.....	33
4.1.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα .....	34
4.1.3 Εφαρμογές.....	34
4.2 Ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) 36	
4.2.1 Ιστορικά στοιχεία ανοσοδοκιμασιών .....	36
4.2.2. Αρχή μεθόδου.....	37
4.2.3 Αντιδραστήρια – Συστατικά .....	37
4.2.4. Ένζυμα και υποστρώματα ανίχνευσης κτηνιατρικών καταλοίπων.....	38
4.2.5 Κατηγορίες ELISA .....	39
4.2.6 Εφαρμογές στα τρόφιμα.....	44
4.2.7. Ανάπτυξη nano-ELISA.....	46
4.3. Βιοαισθητήρες (Biosensors).....	46
4.3.1. Οργανολογία και αρχή μεθόδου .....	47
4.3.2. Ταξινόμηση βιοαισθητήρων .....	47
4.3.3. Κατηγορίες Βιοϋποδοχέων .....	48
4.3.4 Κατηγορίες μεταλλακτών σήματος .....	51

4.3.5. Εφαρμογές.....	53
4.3.6. Νέες Προοπτικές.....	54
4.4 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis – CE) .....	55
4.4.1. Αρχή μεθόδου.....	56
4.4.2. Οργανολογία .....	57
4.4.3 Εισαγωγή δείγματος .....	58
4.4.4 Κατηγορίες CE.....	58
4.4.5. Ανιχνευτές .....	59
4.4.6. Εφαρμογές.....	59
4.5 Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry – MS).....	60
4.5.1 Αρχή μεθόδου.....	61
4.5.2. Οργανολογία .....	61
4.5.3. Διαδοχική φασματομετρία μάζας (Tandem mass spectrometry – MS/MS).....	62
4.5.4 CE – MS.....	62
4.6 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC).....	63
4.6.1 Εισαγωγή στις χρωματογραφικές τεχνικές .....	63
4.6.2. Αρχή μεθόδου.....	65
4.6.3. Οργανολογία .....	65
4.6.4 Ανιχνευτές .....	66
4.6.5. Συζευγμένες τεχνικές (Hyphenated Techniques) .....	67
4.6.6. Εφαρμογές.....	69
4.7 Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography – LC) .....	69
4.7.1. Σύνομη σύγκριση GC με LC.....	70
4.7.2 Αρχή μεθόδου HPLC.....	71
4.7.3. Οργανολογία HPLC.....	72
4.7.4 Συζευγμένες τεχνικές .....	73
4.7.5 Εφαρμογές.....	74
Συμπεράσματα.....	76
Αναφορές.....	79
Πηγές Εικόνων .....	88

## Συντομογραφίες

	<b>Αγγλική Ορολογία</b>	<b>Ελληνική Ορολογία</b>
<b>CE</b>	Capillary Electrophoresis	Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση
<b>CZE</b>	Capillary Zone Electrophoresis	Ηλεκτροφόρηση Τριχοειδών Ζωνών
<b>Cp-ELISA</b>	Competitive ELISA	Ανταγωνιστικού τύπου ELISA
<b>DI-SPME</b>	Direct immersion solid phase microextracton	Άμεση μικροεκχύλιση στερεής φάσης
<b>EOF</b>	Electroosmotic Flow	Ηλεκτροωσμωτική ροή
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	Ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration	Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων
<b>FPT</b>	Four-Plate Test	Δοκιμή τεσσάρων τρυβλίων
<b>GC</b>	Gas Chromatography	Αέρια Χρωματογραφία
<b>HS-SPME</b>	Headspace solid phase microextraction	Μικροεκχύλιση στερεής φάσης στον υπερκείμενο χώρο
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης
<b>HRMS</b>	High Resolution Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας υψηλής ανάλυσης
<b>ic-ELISA</b>	Indirect competitive ELISA	Έμμεση ELISA ανταγωνιστικού τύπου
<b>LC</b>	Liquid Chromatography	Υγρή Χρωματογραφία
<b>LLE</b>	Liquid-Liquid Extraction	Εκχύλιση υγρού-υγρού
<b>MS</b>	Mass Spectrometry	Φασματομετρία Μάζας
<b>MRL</b>	Maximum Residue Levels	Μέγιστα όρια υπολειμμάτων
<b>MEKC</b>	Micellar Electrokinetic Capillary Electrophoresis	Μικκυλιακή Ηλεκτροκινητική Τριχοειδική Χρωματογραφία
<b>MIT</b>	Microbial Inhibition Test	Δοκιμασία μικροβιακής αναστολής
<b>MIT</b>	Molecular imprinting technology	Τεχνολογία μοριακής αποτύπωσης
<b>MIP</b>	Molecularly Imprinted Polymers	Μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή
<b>MT-MIP</b>	Multiple-template MIP	Πολλαπλά πρότυπα

		αποτύπωσης
<b>NSAIDs</b>	Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs	Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα
<b>QuEChERS method</b>	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe method	Γρήγορη, εύκολη, οικονομική, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής μέθοδος
<b>SPE</b>	Solid Phase Extraction	Εκχύλιση στερεής φάσης
<b>SPME</b>	Solid-phase Microextraction	Μικροεκχύλιση στερεής φάσης
<b>MS/MS</b>	Tandem mass spectrometry	Συζευγμένη φασματομετρία μαζών
<b>UHPLC</b>	Ultra-high performance liquid chroma- tography	Υγρή Χρωματογραφία υπερ-υψηλής απόδοσης

## Πρόλογος

Η ανθρώπινη ανακάλυψη των φαρμακολογικά δραστικών ουσιών αποτελεί ένα από τα παλαιότερα χρονολογικά επιτεύγματα, με εφαρμογή στις βιοϊατρικές επιστήμες και με προέλευση μεγαλύτερη των 3.500 χρόνων (Kinter & DeGeorge, 2016). Φαρμακευτικές ουσίες όπως τα αντιβιοτικά, τα αντιπαρασιτικά, τα αντικοκκιδιακά και τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα, αποτελούν τις πιο συχνές κατηγορίες φαρμάκων που χορηγούνται σε ζώα που παράγουν βρώσιμα προϊόντα για τον άνθρωπο (Rana, et al., 2019). Τα αντιβιοτικά πρωτοεμφανίστηκαν τη δεκαετία του 1930 και επέφεραν σημαντικές αλλαγές στην ανθρώπινη υγεία, αλλά και στην παραγωγή των τροφίμων. Η χρήση τους στην κτηνοτροφία, στην υδατοκαλλιέργεια και στη γεωργία είχε ως στόχο τη θεραπεία και την πρόληψη ζωικών ασθενειών, αλλά και τη συντήρηση των παραγόμενων προϊόντων (Kirchhelle, 2018).

Τα κτηνιατρικά φάρμακα, ειδικά οι αντιμικροβιακές ουσίες, χρησιμοποιούνται ευρέως στην παραγωγή ζώων και ειδικά για την επιτάχυνση της ανάπτυξης τους. Ως αποτέλεσμα της εκτεταμένης χρήσης τους, τα κατάλοιπα των αντιβιοτικών ανιχνεύονται συχνά σε ζωικά προϊόντα καθώς και στο περιβάλλον (Clauben, et al., 2013). Επιπλέον, η επίδραση της υπέρμετρης χρήσης αντιμικροβιακών ουσιών στα βρώσιμα ζώα οδηγεί σε βακτηριακή αντίσταση (Prescott, 2018). Παράλληλα, η μη τήρηση των προτεινόμενων οδηγιών δοσολογίας και του συνιστάμενου χρόνου αναμονής μετά τη χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών στα ζώα (που εξασφαλίζει ότι τα τρόφιμα ζωικής προέλευσης δεν περιέχουν κατάλοιπα των ουσιών αυτών), καθώς και η ακατάλληλη και υπέρμετρη χρήση γεωργικών φυτοφαρμάκων, αποτελούν απειλή για την υγεία του ανθρώπου (Beyene, 2016). Για την πρόληψη αυτών των προβλημάτων και κυρίως για τη διαφύλαξη της υγείας των καταναλωτών, τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια καταλοίπων αντιβιοτικών και κτηνιατρικών φαρμάκων εφαρμόστηκαν από την Ευρωπαϊκή Ένωση και προτάθηκαν και από άλλους διεθνείς οργανισμούς.

Η χρήση δοκιμών διαλογής για την ανίχνευση καταλοίπων στα τρόφιμα είναι επομένως σημαντική. Αυτές περιλαμβάνουν μια μεγάλη ποικιλία μεθόδων ανίχνευσης, οι οποίες περιλαμβάνουν φυσικοχημικές αναλύσεις ή ανοσολογικές ανιχνεύσεις, αλλά και μικροβιολογικές μεθόδους, με μερικές διαθέσιμες στο εμπόριο ως αντιδραστήρια



δοκιμών (Clauβen, et al., 2013). Οι παραδοσιακές μέθοδοι για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων και κτηνιατρικών φαρμάκων συνήθως βασίζονται σε οργανικές τεχνικές όπως οι χρωματογραφίες και παρέχουν πολύτιμες ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για τα κατάλοιπα ουσιών που επρόκειτο να αναλυθούν.

Ωστόσο, οι κοινές ταχείες μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν ένα μόνο στόχο με υψηλή ειδικότητα, ενώ τα πραγματικά δείγματα τροφίμων περιέχουν πάντα περισσότερα από ένα φυτοφάρμακα ή κτηνιατρικά φάρμακα. Επομένως, οι μέθοδοι ανίχνευσης πολλαπλών καταλοίπων δίνουν την ταυτόχρονη ανίχνευση και ανάλυση περισσότερων του ενός καταλοίπου και επιπλέον χαρακτηρίζονται από ευκολία στη χρήση τους, υψηλή απόδοση και χαμηλό κόστος ανά δείγμα (Jia, et al., 2020).

Οι μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων και οι αναλυτικές τεχνικές αποτελούν τα δύο κύρια μέρη της ανάλυσης υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων. Στις μεθόδους προετοιμασίας δειγμάτων παρουσιάζονται μέθοδοι όπως η εκχύλιση στερεής φάσης (Solid-phase extraction – SPE) και παραλλαγές της όπως η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid-phase microextracton – SPME), η εφαρμογή της τεχνολογίας μοριακής αποτύπωσης (Molecular imprinting technology – MIT) και η εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-liquid extraction – LLE) (Li, et al., 2020). Αναμφίβολα, η προετοιμασία του δείγματος είναι ένα από τα πιο σημαντικά βήματα στην αναλυτική δοκιμασία και υπολογίζεται ότι περίπου το 60% του φόρτου εργασίας, του κόστους και του χρόνου αφιερώνεται σε αυτό το μέρος της ανάλυσης (Zacharis & Tzanavaras, 2020).

Τέλος, στην κατηγορία των αναλυτικών τεχνικών ανήκουν μικροβιολογικές μέθοδοι όπως η δοκιμή μικροβιακής αναστολής, ανοσολογικές μέθοδοι όπως η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) και η τεχνολογία βιοαισθητήρων (Biosensors), φυσικοχημικές μέθοδοι όπως η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση (Capillary electrophoresis – CE), η αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC) και η υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography – LC), ενώ είναι δυνατός και ο συνδυασμός των παραπάνω τεχνικών όπως η σύζευξη Τριχοειδούς Ηλεκτροφόρησης με Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry – MS) γνωστή ως CE – MS, η σύζευξη LC – MS και LC – MS/MS (Li, et al., 2020).

## Κεφάλαιο 1. Εισαγωγή στις φαρμακευτικές ουσίες

### 1.1. Φαρμακευτικές ουσίες

Διάφορες φαρμακευτικές ουσίες, όπως είναι τα αντιβιοτικά, τα αντιπαρασιτικά ή αντιελμινθικά φάρμακα, τα αντικοκκιδιακά ή τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (Nonsteroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) χρησιμοποιούνται ευρέως στη κτηνοτροφία ζώων (Rana, et al., 2019). Η υπέρμετρη χρήση αυτών αλλά και των φυτοφαρμάκων (Jia, et al., 2020) έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση καταλοίπων των ουσιών αυτών σε διάφορα ζωικά προϊόντα όπως το γάλα, το κρέας και τα αυγά.

#### 1.1.1. Αντιπαρασιτικά – Αντιελμινθικά φάρμακα

Οι μολύνσεις από έλμινθες έχουν σοβαρό αντίκτυπο στη παραγωγικότητα των εκτρεφόμενων ζώων μέσω:

- α) της βλάβης των μολυσμένων ιστών, κάτι που οδηγεί σε μειωμένη απόδοση του προσβεβλημένου οργάνου,
- β) της κατανάλωσης της ενέργειας που υποτίθεται θα χρησιμοποιούταν για την ανάπτυξη των ανοσοποιητικών και αμυντικών μηχανισμών και
- γ) της μείωσης κατανάλωσης της ζωοτροφής από τα εκτρεφόμενα ζώα (Dyary, 2016).

Εξαιτίας των μεγάλων οικονομικών απωλειών που προκαλούνται από παρασιτικές μολύνσεις, τα αντιελμινθικά φάρμακα χρησιμοποιούνται συχνά στα ζώα και επομένως έχουν συσχετισθεί με την ανεύρεση καταλοίπων σε βρώσιμα ζωικά προϊόντα (Rana, et al., 2019).

Τα κτηνιατρικά αντιελμινθικά που διατίθενται για τη θεραπεία της ελμινθίασης ανήκουν στις κατηγορίες των προ-βενζιμιδαζολών, των βενζιμιδαζολών, των μακροκυκλικών λακτονών, των ιμιδαζοθιαζολών κ.α. (Dyary, 2016). Ενδεικτικά, η ιβερμεκτίνη, η οποία ανήκει στις μακροκυκλικές λακτόνες, χρησιμοποιείται ευρέως για την πρόληψη και τη θεραπεία παρασιτικών λοιμώξεων σε ζώα τα οποία παράγουν τρόφιμα. Η ιβερμεκτίνη είναι λιπόφιλη. Αυτό σημαίνει ότι έχει μια εκτενή περίοδο απόσυρσης και βρίσκεται στα βρώσιμα μέρη των ζώων που υποβλήθηκαν σε αγωγή, ειδικά εκείνων που είναι υψηλής περιεκτικότητας σε λιπαρά (Rana, et al., 2019).

### **1.1.2. Αντικοκκιδιακά φάρμακα**

Η κοκκιδίωση προκαλείται από πρωτόζωα και παράσιτα του γένους *Eimeria* και η ασθένεια αυτή επηρεάζει διάφορα ζωικά είδη, κυρίως τα πουλερικά, και ειδικά τα κοτόπουλα (Kadykalo, et al., 2018). Τα κοκκιδιοστατικά είναι ενώσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως ως πρόσθετα ή φάρμακα για την πρόληψη και τη θεραπεία των ζώων με κοκκιδίωση. Τα κοκκιδιοστατικά είναι ισχυρά κτηνοτροφικά φάρμακα, τα οποία προκαλούν συσώρευση καταλοίπων σε βρώσιμα ζωικά προϊόντα και κατά συνέπεια, δημιουργούν σοβαρούς κινδύνους για την υγεία του καταναλωτή. Έχει αποδειχθεί ότι τα ζώα μεταβολίζουν γρήγορα τα αντικοκκιδιακά, οδηγώντας σε επιβλαβείς συνέπειες. Για παράδειγμα, ο μεταβολισμός της διμετριδαζόλης προκαλεί την απελευθέρωση του κύριου μεταβολίτη, 2-υδροξυδιμετριδαζόλη, η οποία συσσωρεύεται σε ιστούς και αυγά (Rana, et al., 2019).

Τα αντικοκκιδιακά χωρίζονται σε 2 κατηγορίες. Η πρώτη περιλαμβάνει τα συνθετικά αντικοκκιδιακά και σε αυτή ανήκει η ροβενιδίνη, η δικλαζουρίλη κ.α. Ο μηχανισμός δράσης τους στηρίζεται στην καταστροφή του παρασίτου όταν αυτό βρίσκεται στα ενδοκυτταρικά του στάδια, δηλαδή μόλις έχει εισβάλλει στα κύτταρα του ξενιστή στο έντερο. Η επίμονη χρήση συνθετικών αντικοκκιδιακών οδηγεί στην ανάπτυξη ανθεκτικών παρασίτων, περιορίζοντας έτσι την αποτελεσματικότητα αυτών των φαρμάκων. Η δεύτερη κατηγορία περιέχει τα ιονοφόρα αντικοκκιδιακά, τα οποία έχουν περιπλοκότερο τρόπο δράσης και σε αυτά ανήκουν η λασαλοσίδη, η μαδουραμικίνη, η σαλινομυκίνη, η μονενσίνη και η σεμδουραμυκίνη. Επειδή αυτός ο μηχανισμός δράσης τους στρέφεται εναντίον των σποροζωϊτών (το παρασιτικό στάδιο στον εντερικό αυλό, πριν από τη διείσδυση στα κυττάρων του ξενιστή), τα ιονοφόρα αντικοκκιδιακά δεν οδηγούν σε πλήρη εξάλειψη των παρασίτων (Kadykalo, et al., 2018).

### **1.1.3 Μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα**

Τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα (ΜΣΑΦ) περιλαμβάνουν μια μεγάλη κατηγορία φαρμάκων τα οποία χαρακτηρίζονται από έντονη δομική και λειτουργική ποικιλομορφία. Αυτά είναι κυρίως ασθενή οργανικά οξέα, τα οποία περιλαμβάνουν ένα όξινο τμήμα (καρβοξυλικό οξύ ή ενόλες) ενωμένα με μια αρωματική λειτουργική ομάδα (Bindu, et al., 2020).

Στην κτηνιατρική πρακτική, τα ΜΣΑΦ χρησιμοποιούνται ευρέως (μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με αντιβιοτικά) για τη θεραπεία της φλεγμονής, του πόνου, των αναπνευστικών παθήσεων, του πυρετού και των μυοσκελετικών διαταραχών. Χρησιμοποιούνται εξίσου για τη βελτίωση της παραγωγής των ζώων, και οι δευτερογενείς φαρμακολογικές επιδράσεις τους ενισχύουν την ποιότητα του κρέατος. Τα ΜΣΑΦ χορηγούνται επίσης συχνά για τη θεραπεία της μαστίτιδας σε χοίρους και αγελάδες αρμέγατος, και τα υπολείμματα τους απεκκρίνονται μέσω του γάλακτος (Rana, et al., 2019).

#### **1.1.4 Φυτοφάρμακα**

Τα φυτοφάρμακα αφορούν ουσίες ή μείγματα που προορίζονται για την καταστροφή και τον μετριασμό οποιασδήποτε ομάδας παρασίτων, όπως τα έντομα. Τις τελευταίες δεκαετίες, χρησιμοποιούνται ευρέως διάφοροι τύποι φυτοφαρμάκων στη γεωργία για παραγωγές υψηλής απόδοσης. Οι εφαρμογές των φυτοφαρμάκων έχουν εξασφαλίσει την ασφάλεια σχεδόν του ενός τρίτου της παραγωγής καλλιεργειών σε ολόκληρο τον κόσμο. Οι ουσίες αυτές έχουν οδηγήσει στη βελτίωση της παραγωγής τροφίμων διασφαλίζοντας τις απαιτήσεις ενός αυξανόμενου ανθρώπινου πληθυσμού.

Τα φυτοφάρμακα διαχωρίζονται με βάση τον οργανισμό-στόχο, την προέλευση και την χημική δομή τους σε ανόργανα, συνθετικά και βιολογικά (βίο-παρασιτοκτόνα). Είναι ταξινομημένα σε δύο κύριες μεγάλες ομάδες, τα χημικά φυτοφάρμακα και τα βιοκτόνα φάρμακα. Τα χημικά φάρμακα είναι κυρίως συνθετικά υλικά τα οποία θανατώνουν ή απενεργοποιούν άμεσα το παράσιτο. Κατατάσσονται σε εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα, τρωκτικοκτόνα και νηματοκτόνα. Από την άλλη πλευρά τα βιοκτόνα είναι φυτοφάρμακα που προέρχονται από φυσικές πηγές όπως ζώα, φυτά, βακτήρια και ορισμένα μέταλλα. Τέλος, τα φυτοφάρμακα διαιρούνται σε τέσσερις κύριες οικογένειες, τις οργανοχλωρίνες, τα οργανοφωσφορικά, τα καρβαμιδικά και τα πυρεθροειδή (Samsidar, et al., 2018).

Ωστόσο, η ανεξέλεγκτη και υπερβολική χρήση τους οδηγούν σε ρύπανση του περιβάλλοντος, των τροφίμων, του νερού και των γεωργικών προϊόντων, με μακροπρόθεσμα αποτελέσματα την πρόκληση απειλητικών για τη ζωή ασθενειών και γενετικών διαταραχών που επηρεάζουν άμεσα την παραγωγικότητα και την αποδοτικότητα δισεκατομμυρίων ανθρώπων. Οι άνθρωποι απορροφούν τα

οργανοφωσφορικά φυτοφάρμακα μέσα από διάφορους οδούς, οι οποίες περιλαμβάνουν την εισπνοή, τη δερματική διείσδυση και την κατάποση άμεσα ή μέσω των τροφών (Chawla, et al., 2018). Τα φυτοφάρμακα είναι επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον λόγω της ιδιότητας της βιοσυσσώρευσης που έχουν. Οι συνεχιζόμενες χρήσεις φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα όπως λαχανικά και φρούτα, και η κατανάλωση αυτών των προϊόντων από τον άνθρωπο, οδηγεί σε συσσώρευση καταλοίπων αυτών των ουσιών στον ανθρώπινο ιστό με αποτέλεσμα να επηρεάζεται η ανθρώπινη υγεία. Παραδείγματα αρνητικών επιδράσεων αποτελούν οι γενετικές ανωμαλίες, η στειρότητα, οι ανοσολογικές, οι ενδοκρινολογικές και οι αναπνευστικές διαταραχές. Τέλος, εκτός αυτών, τα φυτοφάρμακα μπορεί να ενοχοποιηθούν και για διάφορες μορφές καρκίνου, διαβήτη και για νευροεκφυλιστικές διαταραχές, όπως η νόσος Parkinson και η νόσος Alzheimer (Samsidar, et al., 2018).

## **1.2. Κατάλοιπα φαρμακευτικών ουσιών**

Ως κατάλοιπα ορίζονται οι χημικές ουσίες ή οι μεταβολίτες φαρμακευτικών προϊόντων που μπορούν να συσσωρευτούν στους ιστούς ή στα βρώσιμα μέρη των ζώων που έχουν υποστεί αγωγή (Rana, et al., 2019). Συχνότερες θέσεις συσσώρευσης αποτελούν το ήπαρ και το νεφρό, παρά οι υπόλοιποι ιστοί. Επιπλέον, έχει σημειωθεί ότι διαφορετικές συγκεντρώσεις καταλοίπων μπορούν να βρεθούν σε διαφορετικές θέσεις του ιστού (Beyene, 2016). Τα κατάλοιπα προέρχονται από διάφορες πηγές, συμπεριλαμβανομένων των συστατικών από φυσικές τοξίνες, βιομηχανικούς ρύπους, αγχροχημικά και κτηνιατρικά φάρμακα και από την επεξεργασία και την συσκευασία των τροφίμων (Rana, et al., 2019).

Τα μέγιστα όρια υπολειμμάτων (Maximum Residue Levels– MRLs) ορίζονται ως οι μέγιστες επιτρεπόμενες συγκεντρώσεις καταλοίπων κτηνιατρικών προϊόντων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, οι οποίες επιτρέπονται νόμιμα και καθίστανται ως ασφαλείς για την υγεία του καταναλωτή. Στον Καναδά τα MRLs κτηνιατρικών φαρμάκων καθορίζονται από την Κτηνιατρική Διεύθυνση του Καναδά, ενώ στις ΗΠΑ από το Κέντρο Διαχείρισης Φαρμάκων και Τροφίμων (Food and Drug Administration – FDA). Όσον αφορά την Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων ορίζεται αυστηρώς μέσω του κανονισμού της ΕΕ 2377/90/ ΕΚ. Σε διεθνές επίπεδο τα MRLs καθορίζονται από τον διατροφικό κώδικα (Codex Alimentarius) (Khaled, et al., 2019). Ο

διατροφικός κώδικας είναι μια επιτροπή οργανωμένη από τον Οργανισμό Τροφίμων και Γεωργίας και από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (ΠΟΥ), η οποία δημιουργήθηκε το 1962 για τη ρύθμιση του εμπορίου τροφίμων ζωικής προέλευσης. Επιπλέον, αποτελεί τον κύριο ρυθμιστικό οργανισμό που καθορίζει τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια κατάλοιπων ουσιών κτηνιατρικής χρήσης σε τρόφιμα προερχόμενα από μια ζωική μήτρα (Oliveira, et al., 2020). Ο Διατροφικός Κώδικας αναπτύσσει εναρμονισμένα διεθνή πρότυπα τροφίμων, οδηγίες και κώδικες πρακτικής για την προστασία της υγείας των καταναλωτών.

Τα περισσότερα από τα ακατέργαστα γεωργικά προϊόντα δεν μπορούν να παραχθούν και να σταθούν οικονομικά χωρίς τη χρήση φυτοφαρμάκων, και για την απαιτούμενη προστασία πρέπει να παραμείνουν πολλές φορές τα κατάλοιπα τους στα τελικά προϊόντα. Η διαμονή των κατάλοιπων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι καιρικές συνθήκες, η αγροτεχνολογία και οι μέθοδοι εφαρμογής τους. Τα περισσότερα φυτοφάρμακα είναι τοξικά, γι' αυτό η χρήση τους ελέγχεται από πολλούς αρμόδιους κυβερνητικούς φορείς. Αυτό επιτυγχάνεται με τον προσδιορισμό των μεγίστων επιτρεπόμενων ορίων καταλοίπων στα επεξεργασμένα προϊόντα, ώστε να γίνει εκτίμηση του πιθανού κινδύνου στην ανθρώπινη υγεία. Η εκτίμηση βασίζεται στον έλεγχο της μέγιστης δοσολογίας χορήγησης, στον αριθμό των θεραπειών και στο ελάχιστο διάστημα μεταξύ τελευταίας εφαρμογής και συγκομιδής (Ambrus & Zhen, 2015). Εάν υπάρχει έλλειψη βασικών δεδομένων, όπως κάποιο από τα παραπάνω, έχει καθοριστεί ως μέγιστο επιτρεπόμενο όριο κατάλοιπων από την Ευρωπαϊκή Ένωση τα 0,01 mg/kg, λαμβάνοντας υπόψη τα βρέφη και τα μικρά παιδιά (Li, 2018).

Η πρόσληψη καταλοίπων φαρμάκων μέσω της τροφής αποτελεί δυνητικό κίνδυνο για την υγεία του καταναλωτή. Συγκεκριμένα, υπάρχει αυξημένη πιθανότητα ανάπτυξης ανθεκτικότητας σε πολλαπλά φάρμακα και καρκινογένεσης, διαταραχή της εντερικής φυσιολογικής μικροχλωρίδας (Rana, et al., 2019), αλλά και τερατογόνες αντιδράσεις, αντιδράσεις υπερευαισθησίας στο φάρμακο και μεταλλαξιογόνες δράσεις (Beyene, 2016).



## Κεφάλαιο 2. Αντιβιοτικά – Αντιμικροβιακά φάρμακα

Ο όρος αντιβιοτικά περιλαμβάνει ένα ευρύ φάσμα χημικών ουσιών, οι οποίες είναι δυνατό να παραχθούν με φυσικούς, ημι-συνθετικούς και συνθετικούς τρόπους. Τα αντιβιοτικά είναι ενώσεις που στοχεύουν βακτήρια, υπεύθυνα για λοιμώξεις ανθρώπων και ζώων και χρησιμοποιούνται για την πρόληψη και τη θεραπεία των λοιμώξεων αυτών (Manji-Loh, et al., 2018).

### 2.1 Δράση και ταξινόμηση αντιβιοτικών

Οι πέντε κύριοι τρόποι, με τους οποίους δρουν τα αντιβιοτικά είναι οι εξής:

1. Αναστολή της σύνθεσης του κυτταρικού τοιχώματος (π.χ. πενικιλίνη, κεφαλοσπορίνη, βανκομυκίνη),
2. Διαταραχή της λειτουργίας της κυτταρικής μεμβράνης,
3. Αναστολή της πρωτεϊνικής σύνθεσης (π.χ. τετρακυκλίνη, στρεπτομυκίνη, χλωραμφαινικόλη),
4. Αναστολή της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων και
5. Δράση ως αντιμεταβολίτες (Lopez Romo & Quiros, 2019).

Η φαρμακολογία πίσω από τα αντιβιοτικά περιλαμβάνει την καταστροφή του βακτηριακού κυττάρου είτε μέσω της παρεμπόδισης της αναπαραγωγής του κυττάρου είτε μέσω παρέμβασης στη λειτουργία του. Με βάση την *in vitro* επίδραση των αντιβιοτικών στα βακτήρια, προκύπτει η ταξινόμηση τους σε δύο κατηγορίες, τα βακτηριοκτόνα και τα βακτηριοστατικά (Calhoun, et al., 2020). Παράγοντες που δρουν στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα ή στην κυτταρική μεμβράνη ταξινομούνται ως βακτηριοκτόνοι, ενώ παράγοντες που εμποδίζουν την σύνθεση πρωτεϊνών, νουκλεϊκών οξέων ή επηρεάζουν το μεταβολισμό του κυττάρου ταξινομούνται ως βακτηριοστατικοί. Ωστόσο, αυτές οι κατηγορίες είναι πιθανό να αλληλεπικαλύπτονται ανάλογα με το υπεύθυνο βακτήριο και τη δοσολογία του αντιβιοτικού (Lopez Romo & Quiros, 2019).

Τα βακτηριοκτόνα δρουν θανατώνοντας τα κύτταρα, ενώ τα βακτηριοστατικά αποτρέπουν την ανάπτυξη των βακτηρίων. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν οι αμινογλυκοσίδες (π.χ. τομπραμυκίνη, γενταμυκίνη, αμικακίνη), οι β-λακτάμες, στις οποίες ανήκουν τάξεις όπως οι πενικιλίνες, οι κεφαλοσπορίνες και οι καρβαπενέμες (π.χ. αμοξυκυλλίνη, κεφαζολίνη, μεροπενέμη), οι φλουροκινολόνες (π.χ. κiproφλοξακίνη,



λεβοφλοξασίνη, μοξιφλοξασίνη), τα γλυκοπεπτιδία (π.χ. βανκομυκίνη), τα κυκλικά λιποπεπτιδία (π.χ. δαπτομυκίνη) και οι νιτροιμιδαζόλες (π.χ. μετρονιδαζόλη), ενώ στην δεύτερη κατηγορία, αυτή των βακτηριοστατικών αντιβιοτικών, εντάσσονται οι γλυκυκυκλίνες (π.χ. τιγκεκυκλίνη), οι τετρακυκλίνες (π.χ. δοξυκυκλίνη, μινοκυκλίνη), οι λινκοσαμίδες (π.χ. κλινδαμυκίνη), οι μακρολίδες (π.χ. αζιθρομυκίνη, κλαριθρομυκίνη, ερυθρομυκίνη, οι οξαζολιδονόνες (π.χ. λινεζολίδη) και οι σουλφοναμίδες (π.χ. σουλφαμεθοξαζόλη) (Calhoun, et al., 2020). Οι φαινόλες είναι μια κατηγορία βακτηριακών αντιβιοτικών φαρμάκων που αναστέλλουν τη σύνθεση βακτηριακών πολυπεπτιδίων. Η χλωραμφαινικόλη είναι ένα αντιβιοτικό ευρέος φάσματος, η οποία κατά κύριο λόγο δρα κατά των παθογόνων Gram αρνητικών βακτηρίων (Oliveira, et al., 2020).

## **2.2 Αντίσταση στα αντιβιοτικά**

Η βακτηριακή αντίσταση είναι ένα φυσικό φαινόμενο, το οποίο είναι δυνατό να επιταχυνθεί από τον άνθρωπο λόγω της έντονης και αδιάκριτης χρήσης αντιβιοτικών για την αντιμετώπιση μικροβιακών ασθενειών τόσο στον άνθρωπο όσο και στα ζώα (Oliveira, et al., 2020). Με την ανακάλυψη των αντιβιοτικών, η κοινότητα της υγειονομικής περίθαλψης θεώρησε ότι τα προβλήματα με τις μολυσματικές ασθένειες περιορίστηκαν. Ωστόσο, η ανθεκτικότητα των βακτηρίων σε πληθώρα αντιβιοτικών παραγόντων οδήγησε σε παγκόσμια αύξηση νοσηρότητας και θνησιμότητας από αυτές τις μολυσματικές ασθένειες (Reygaert, 2018).

Οι κύριοι μηχανισμοί αντίστασης των βακτηρίων περιλαμβάνουν την παραγωγή τροποποιημένων αντιβιοτικών ενζύμων, τη μείωση της διαπερατότητας του φαρμάκου, τη σύνθεση ριβονουκλεϊκού οξέος (RNA), δεοξυριβονουκλεϊκού οξέος (DNA), πρωτεϊνών ή συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία τροποποιούν το στόχο των αντιβιοτικών φαρμάκων, και την ενεργή εξώθηση του φαρμάκου μέσω αντλιών εκροής (Lopez Romo & Quiros, 2019). Η μείωση των φαινομένων αντίστασης των βακτηρίων σε αντιβιοτικά μπορεί να προληφθεί με την επιλογή του πιο κατάλληλου φαρμάκου, σε σωστή δοσολογία και για συγκεκριμένη χρονική διάρκεια χορήγησης. Με τον τρόπο αυτό, εξαλείφεται το βακτήριο το οποίο προκάλεσε τη λοίμωξη, ενώ παράλληλα ελαχιστοποιούνται και οι ανεπιθύμητες ενέργειες για τον ασθενή.

Η σωστή χρήση των αντιβιοτικών απαιτεί τη λεπτομερή εξοικείωση του ανθρώπου με το ευρύ φάσμα αντιβιοτικών που υπάρχει, δηλαδή τη γνώση της δραστικότητας, της φαρμακοκινητικής και της φαρμακοδυναμικής τους. Με τη μελέτη της φαρμακοκινητικής επιβεβαιώνεται ότι το φάρμακο φθάνει στον τόπο της λοίμωξης, ενώ με τη πλήρη κατανόηση της φαρμακοδυναμικής του, επικυρώνεται ότι η συγκέντρωση που χορηγήθηκε οδηγεί στο επιθυμητό αντιμικροβιακό αποτέλεσμα. Αλλεργίες στα φάρμακα, αλληλεπιδράσεις φαρμάκων και διάφορα άλλα τυπικά ζητήματα είναι πιθανό να επηρεάσουν τη σωστή επιλογή αντιβιοτικού για ένα συγκεκριμένο ασθενή (Zinner, 2007).

### **2.2.1. Μικροβιακή αντίσταση και τρόφιμα**

Φαρμακευτικές χημικές ουσίες όπως τα αντιβιοτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην κτηνοτροφία, στην γεωργία και στην ιχθυοκαλλιέργεια για την πρόληψη (προφυλακτική χρήση), τη θεραπεία ασθενειών (θεραπευτική χρήση) καθώς και για την προώθηση της ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ζώων (Clauβen, et al., 2013). Ωστόσο, αυτές οι πρακτικές συμβάλλουν στην εξάπλωση των ανθεκτικών στα φάρμακα παθογόνων σε ζώα και ανθρώπους, κάτι που αποτελεί σημαντική απειλή για τη δημόσια υγεία (Van Boeckel , et al., 2015).

Υπάρχουν στοιχεία τα οποία υποστηρίζουν ότι η χορήγηση αντιβιοτικών σε ζώα συσχετίζεται με την ανάπτυξη μικροβιακών ανθεκτικών οργανισμών σε αυτά αλλά και στον άνθρωπο, καθώς μπορούν να μολύνουν τον άνθρωπο μέσω της κατανάλωσης ζωικών προϊόντων τα οποία προέρχονται από αυτά τα ζώα. Τα αντιμικροβιακά πρότυπα αντοχής στα ζώα κατοπτρίζουν τον τύπο και την ποσότητα του αντιβιοτικού που χορηγήθηκε. Η μετάδοση της αντιμικροβιακής αντοχής από τα ζώα στον άνθρωπο μπορεί να συμβεί με διάφορους τρόπους, με την άμεση στοματική οδό να αποτελεί τον συχνότερο τρόπο. Αυτή η οδός αφορά την κατανάλωση κρέατος και την κατάποση περιττωμάτων μέσω μολυσμένων τροφών ή νερού. Μια άλλη διαδρομή, λιγότερο συχνή, αποτελεί η άμεση επαφή του ζώου με τον άνθρωπο (Reygaert, 2018).

Η ζωοτροφή αυτών των ζώων συχνά περιέχει αντιβιοτικά, τα οποία ανήκουν στις προαναφερθέντες κατηγορίες και είναι δυνατή η χρήση τους και στους ανθρώπους. Συγκεκριμένα για τη ζωική παραγωγή τα συχνότερα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται είναι οι β-λακτάμες, οι φαινόλες και οι αμινογλυκοσίδες.

Η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών στα ζώα εκτιμάται περίπου σε 63.000 έως 240.000 μετρικούς τόνους ετησίως, φαινόμενο το οποίο θα αυξηθεί λόγω των υψηλών επιπέδων κατανάλωσης που καταγράφεται στις αναδυόμενες κοινωνίες (Oliveira, et al., 2020). Η ζήτηση για ζωικές πρωτεΐνες προς ανθρώπινη κατανάλωση αυξάνεται παγκοσμίως με ταχύ ρυθμό. Οι σύγχρονες πρακτικές ζωικής παραγωγής σχετίζονται με την τακτική χρήση αντιμικροβιακών ουσιών στα ζώα, κάτι που οδηγεί σε ανθεκτικότητα των βακτηρίων προς αυτές τις ουσίες. Μελέτες που διεξάχθηκαν το 2010, συνέβαλαν στην χαρτογράφηση του κόσμου όσον αναφορά την κατανάλωση αντιβιοτικών μέσω ζωικών τροφών, ενώ παράλληλα έγιναν και προβλέψεις για το έτος 2030. Η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών μέσω της πρόσληψης τροφής προερχόμενης από ζώα, το 2010, εκτιμήθηκε σε 65.151 ( $\pm$  1,560) τόνους και αναμένεται να αυξηθεί κατά 67%, δηλαδή σε 105.596 ( $\pm$  3,605) τόνους το 2030. Το 66% της αντιμικροβιακής αύξησης φάνηκε να οφείλεται στον αυξανόμενο αριθμό των ζώων που εκτρέφονται για παραγωγή τροφίμων, ενώ το υπόλοιπο 34% προέρχεται από τις αλλαγές που συμβαίνουν στις κτηνοτροφικές πρακτικές, όπως τα εντατικά συστήματα εκτροφής που αναμένεται να χρησιμοποιηθούν έως το 2030.

Το 2010, οι πέντε χώρες, σε παγκόσμιο επίπεδο, με τη μεγαλύτερη κατανάλωση αντιμικροβιακών ουσιών μέσω κατανάλωσης ζωικών προϊόντων ήταν η Κίνα (23%), οι Ηνωμένες Πολιτείες (13%), η Βραζιλία (9%), η Ινδία (3%) και η Γερμανία (3%). Μέχρι το 2030, αυτή η κατάταξη προβλέπεται να τροποποιηθεί στα εξής ποσοστά: η Κίνα (30%), οι Ηνωμένες Πολιτείες (10%), η Βραζιλία (8%), η Ινδία (4%) και το Μεξικό (2%). Αν και η Κίνα και η Βραζιλία είναι από τους μεγαλύτερους καταναλωτές αυτών των προϊόντων, δεν βρίσκονται στις χώρες με την μεγαλύτερη προβλεπόμενη αύξηση στην αντιμικροβιακή κατανάλωση, στοιχείο που αποδεικνύει ότι αυτές οι χώρες έχουν ήδη ξεκινήσει να στρέφονται σε πιο εντατικά συστήματα ζωικής παραγωγής, τα οποία χρησιμοποιούν αντιβιοτικά για τη διατήρηση της υγείας των ζώων και της αύξησης της παραγωγικότητας (Van Boeckel , et al., 2015).

Η χρήση αντιβιοτικών ουσιών δεν αφορά μόνο την κτηνοτροφία, αλλά και την υδατοκαλλιέργεια. Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί μια αναπτυσσόμενη βιομηχανία στον κόσμο και μάλιστα σύμφωνα με έκθεση του Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (Food and Agriculture Organization – FAO) το 2014, η παγκόσμια παραγωγή υδατοκαλλιέργειας

διπλασιάστηκε την τελευταία δεκαετία. Η Κίνα είναι ο μεγαλύτερος παραγωγός και εξαγωγέας υδρόβιων προϊόντων με την παραγωγή 41,4 εκατομμυρίων τόνους ψαριών το 2012. Για τους ίδιους λόγους εφαρμογής με την κτηνοτροφία τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρέως στην υδατοκαλλιέργεια για την πρόληψη και τη θεραπεία ασθενειών. Κατά συνέπεια αυτών, τα κατάλοιπα των αντιβιοτικών αυτών έχουν εμφανιστεί και διεγείρουν μεγάλες ανησυχίες διότι με την διατροφική τους κατανάλωση ο ανθρώπινος οργανισμός εκτίθεται σε οργανικούς ρύπους.

Σύμφωνα με μελέτη, καταγράφηκαν συνολικά 234 περιπτώσεις καταλοίπων αντιβιοτικών σε υδρόβια κινέζικα προϊόντα συμπεριλαμβανομένων είκοσι τεσσάρων ειδών ψαριών, οχτώ ειδών καρκινοειδών και τεσσάρων ειδών μαλακίων. Τα πέντε πρώτα, σε κατάταξη, είδη μολυσμένα με αντιβιοτικά αποτέλεσαν δύο είδη ψαριών (*Carassius auratus* και *Trachinotus onatus*), τρία είδη καρκινοειδών, οι γαρίδες και το σαλιγκάρι του ποταμού (*Viviparus*). Είκοσι ένα αντιβιοτικά βρέθηκαν σε γλυκά και αλμυρά νερά, με την πλειοψηφία αυτών στα γλυκά νερά. Οι κινολόνες αποτέλεσαν την πιο συχνά ανιχνεύσιμη κατηγορία, και κυρίως η νορφλοξασίνη, ακολουθούμενη από τις σουλφοναμίδες και τις μακρολίδες (Liu, et al., 2017).

## **Κεφάλαιο 3. Μέθοδοι προετοιμασίας δειγμάτων**

Το πρώτο στάδιο για τον έλεγχο ύπαρξης καταλοίπων ουσιών, κτηνιατρικών φαρμάκων και φυτοφαρμάκων αφορά την προετοιμασία του δείγματος. Η ανάλυση χημικών ενώσεων που βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις μέσα σε μια πολύπλοκη μήτρα δείγματος (π.χ. υπολείμματα και ρύποι δειγμάτων τροφίμων), συνήθως απαιτεί και μια ιδιαίτερη προσέγγιση που θα περιλαμβάνει τη δειγματοληψία, την προετοιμασία του δείγματος, την απομόνωση του επιθυμητού συστατικού και τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό του (Fumes, et al., 2015). Η προετοιμασία αυτή, η οποία χρησιμοποιείται κυρίως για τον εμπλουτισμό των αναλυτών και για την απομάκρυνση των παρεμβαλλόμενων στοιχείων της μήτρας του δείγματος, είναι ένα κρίσιμο βήμα στην επιστήμη του διαχωρισμού και παίζει σημαντικό ρόλο στην αναλυτική χημεία (Xu, et al., 2016).

### **3.1 Εκχύλιση στερεής φάσης (Solid Phase Extraction – SPE)**

Η τεχνική εκχύλισης στερεής φάσης (SPE) παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1970 και έγινε εμπορικά διαθέσιμη το 1978 με την προμήθεια SPE φυσιγγίων και δίσκων (Pico, et al., 2007).

Μέσω της SPE εξάγονται αναλύτες στηριζόμενοι στην αρχή της επιλεκτικής προσρόφησης και της έκλυσης. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιηθεί ο κατάλληλος διαλύτης, ο οποίος διαλύει επιλεκτικά την ενδιαφερόμενη ένωση και όχι το υπόστρωμα (Σαμανίδου , 2015). Χρησιμοποιείται κυρίως για τον διαχωρισμό, τον καθαρισμό και τον εμπλουτισμό των δειγμάτων. Τα πλεονεκτήματά της περιλαμβάνουν την μείωση παρεμβολών της μήτρας, την αύξηση της ευαισθησίας καθώς επίσης διευκολύνει την αναγνώριση και επιβεβαίωση του αποτελέσματος. Ωστόσο, είναι ιδιαίτερα χρονοβόρα και κουραστική (Li, et al., 2020). Αποτελεί κατάλληλη τεχνολογία για συνδυασμό με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας όπως είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής συγγένειας (HPLC) και η αέρια χρωματογραφία (GC) (Σαμανίδου , 2015).

#### **3.1.1. Αρχή μεθόδου**

Η αρχή μεθόδου της SPE στηρίζεται στο διαχωρισμό του αναλύτη σε δύο φάσεις:

α) τη στερεή στατική (ακίνητη) φάση, που περιλαμβάνει το ακινητοποιημένο προσροφητικό υλικό και

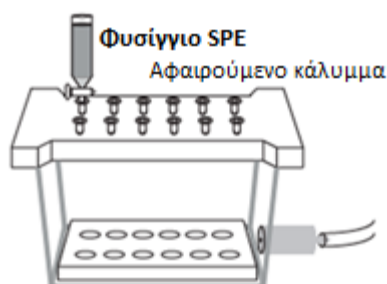
β) την υγρή (κινητή) φάση, η οποία αποτελεί το υπόστρωμα μαζί με τις προσμίξεις (Σαμανίδου , 2015). Τα στάδια της μεθόδου είναι τα ακόλουθα:

1. Ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του προσροφητικού υλικού μέσω της διαβίβασης ενός διαλύτη,
2. Φόρτωση του διαλύματος του δείγματος, ώστε η επιθυμητή ουσία και πιθανώς και άλλες ουσίες του δείγματος να κατακρατηθούν στο προσροφητικό υλικό,
3. Έκπλυση με διαλύτη για την απομάκρυνση των ανεπιθύμητων ουσιών.
4. Εκλεκτική έκλυση της επιθυμητής ουσίας του δείγματος με τον κατάλληλο διαλύτη (ο διαλύτης αυτός δεν πρέπει να εκλύει τις άλλες ουσίες) (Χατζηιωάννου & Κούππαρης, 2005)

Συνοπτικά, λόγω της διανομής με προσρόφηση ή με διείσδυση των μορίων στη στερεά επιφάνεια, ένας ρυθμιστής ισορροπίας έχει τοποθετηθεί ώστε να διατηρηθεί ο αναλύτης στη στερεή επιφάνεια. Η εκρόφηση των ενώσεων με το κατάλληλο υγρό ή με άλλες τεχνικές, εκτελείται μέσω της διέλευσης του αναλύτη στην υγρή φάση και της εξόδου του από το σύστημα SPE. Μετά από το βήμα της έκλυσης ή μεταξύ των σταδίων συγκράτησης και έκλυσης, πραγματοποιείται το στάδιο της έκπλυσης, ώστε να αφαιρεθούν ανεπιθύμητες ενώσεις οι οποίες συγκρατήθηκαν μαζί με τις αναλυόμενες ουσίες στη στερεή φάση ή στη φάση της έκλυσης (Otlés & Kartal, 2016).

### 3.1.2. Οργανολογία

Μια πλήρης εμπορική στήλη SPE ή αλλιώς φυσιγγιο, αποτελείται από ένα πλαστικό σώμα (παρόμοιο με το σώμα σύριγγας), μια στατική φάση, ένα πώμα για να συγκρατεί τη στατική φάση και μια στρόφιγγα (**Εικόνα 1**) (Tissue, 2013).



Εικόνα 1. Εμπορική στήλη SPE.

### **3.1.3. Επιλογή φυσιγγίων**

Το μέγεθος του φυσιγγίου εξαρτάται από την ποσότητα της διαλυμένης ουσίας που επρόκειτο να συγκρατηθεί. Σε περίπτωση που ένα φυσίγγιο που περιέχει ανεπαρκή ποσότητα στατικής φάσης υπερφορτωθεί με τον ενδιαφερόμενο αναλύτη, θα προκληθεί η απώλεια του αναλύτη αυτού λόγω υπερφόρτωσης (Tissue, 2013).

Διαφορετικοί τύποι φυσιγγίων χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιβιοτικών και κτηνιατρικών καταλοίπων. Για παράδειγμα τα φυσίγγια Oasis HLB SPE χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση αντιβιοτικών καταλοίπων σε κρέας πάπιας, τα φυσίγγια ENVI-Carb SPE για την εκχύλιση αντιβιοτικών από τρόφιμα όπως το κοτόπουλο, το συκώτι κοτόπουλου, τα αυγά και το γάλα ταυτόχρονα, ενώ με τα φυσίγγια Strata C18-E SPE πραγματοποιείται εκχύλιση για ίχνη φλουβενταμίδης σε μέλι διαφορετικής βοτανικής καταγωγής (Li, et al., 2020).

### **3.1.4. Κατηγορίες στατικής φάσης**

Η SPE κανονικής φάσης περιλαμβάνει μια πολική στατική φάση και η κατακράτηση του αναλύτη επιτυγχάνεται από την αλληλεπίδραση μεταξύ των πολικών λειτουργικών ομάδων του αναλύτη με τις πολικές ομάδες της απορροφητικής επιφάνειας. Η SPE αντίστροφης φάσης περιλαμβάνει μια μη πολική στατική φάση και μια πολική ή μέτρια πολική κινητή φάση και γενικά χρησιμοποιείται για υδατικά δείγματα των οποίων η κύρια δύναμη αλληλεπίδρασης είναι οι δυνάμεις Van der Waals. Τέλος, η SPE ιοντοανταλλαγής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για ενώσεις οι οποίες φορτίζονται όταν βρίσκονται σε υδατικό διάλυμα, ενώ κατά την SPE με μικτή λειτουργία χρησιμοποιούνται δύο διαφορετικές λειτουργικές ομάδες στο ίδιο προσροφητικό υλικό (Otlés & Kartal, 2016).

### **3.1.5. Επιλογή κατάλληλου προσροφητικού υλικού**

Τα προσροφητικά υλικά βρίσκονται είτε μέσα σε κλειστά μικροφυσίγγια μιας χρήσεως (ser-pak), είτε έχουν στερεωθεί σε πλαστικές θήκες συρίγγων (bond elut) (Χατζηγιάννου & Κούππαρης, 2005). Το μέγεθος των σωματιδίων του προσροφητικού υλικού κυμαίνεται συνήθως από 10 έως 60 μm και οι μορφές του μπορεί να βρίσκονται σε σύριγγες, φυσίγγια, δίσκους ή πιπέτες. Μεταξύ των προσροφητικών τύπων όπως η αλουμίνα, ο γραφίτης και το πυρίτιο, το πυρίτιο είναι το πιο κοινό λόγω των ιδιοτήτων της τροποποίησης και της σταθερότητας του (Otlés & Kartal, 2016).

Πιο συγκεκριμένα υλικά στατικής φάσης αποτελούν:

- Η πυριτία ( $\text{SiO}_2$ ), σκέτη ή χημικά τροποποιημένη με πολικές ομάδες, και πρόκειται για SPE κανονικής φάσης.
- Η πυριτία στην επιφάνεια της οποίας έχουν προσδεθεί με ομοιοπολικούς δεσμούς αλκύλια ή αρύλια (κυρίως C18) πρόκειται για SPE αντίστροφης φάσης. Χαρακτηριστική εφαρμογή αποτελεί η εκχύλιση παρασιτοκτόνων.
- Η πυριτία συνδεδεμένη με κατιονικές ή ανιονικές ομάδες, αφορά τη κατηγορία της SPE με ιοντοανταλλαγή και χρησιμοποιείται αποκλειστικά για απομόνωση συστατικών με θετικά ή αρνητικά φορτία.
- Τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (Τσόπελας, Αθήνα, 2018)

### **3.2 Μικροεκχύλιση στερεής φάσης (Solid-Phase Microextraction – SPME)**

Αν και η τεχνική SPE χρησιμοποιείται ευρέως για την προετοιμασία των δειγμάτων, δεν εξαλείφει πάντα αποτελεσματικά τις πιθανές επιδράσεις της μήτρας και μπορεί μερικές φορές να κατακρατήσει τον αναλύτη-στόχο, οδηγώντας σε απώλεια του αναλύτη. Επιπλέον, λόγω των πολλαπλών βημάτων που ακολουθούνται, η διαδικασία προετοιμασίας έχει μεγάλη διάρκεια με αποτέλεσμα την παρουσία σφαλμάτων και το μεγάλο οικονομικό κόστος για την διεκπεραίωσή της (Khaled, et al., 2019).

Οι αναλύσεις τροφίμων είναι σημαντικές για την αξιολόγηση των θρεπτικών ουσιών, τον ποιοτικό έλεγχο των νωπών και μεταποιημένων προϊόντων, αλλά και για την παρακολούθηση των προσθέτων τροφίμων και άλλων τοξικών παραγόντων. Συγκριτικά με τις παραδοσιακές τεχνικές όπως η SPE, η SPME παρουσιάζει μια σειρά πλεονεκτημάτων καθώς χαρακτηρίζονται από μια μοναδική μορφή και μικροσκοπική σχεδίαση που επιτρέπει τον συνδυασμό με άλλες τεχνικές διαχωρισμού όπως η GC, η HPLC και η CE, και από μια πλήρη αυτοματοποίηση (Xu, et al., 2016). Αναπτύχθηκε από την ερευνητική ομάδα του Pawliszyn το 1989 και παρουσιάζει μεγάλη ευελιξία, αξιοπιστία, χαμηλό κόστος και ευκολία στη δειγματοληψία (δηλαδή επιτόπια δειγματοληψία) (Zacharis & Tzanavaras, 2020). Η διαδικασία SPME απαρτίζεται από δύο βασικά βήματα:

1. Διαχωρισμός αναλυτών μεταξύ της φάσης εκχύλισης και των συστατικών του δείγματος και



2. Εκρόφιση των συμπυκνωμένων εκχυλισμάτων σε ένα αναλυτικό όργανο.

Λόγω του συνδυασμού δειγματοληψίας, εξαγωγής και εισαγωγής του δείγματος σε ένα αναλυτικό όργανο σε ένα μόνο βήμα, η SPME έχει κερδίσει δημοτικότητα σε πολλούς τομείς εφαρμογής τα τελευταία χρόνια.

### 3.2.1 Αρχή μεθόδου

Η βασική αρχή της μεθοδολογίας SPME βασίζεται στην κατανομή των αναλυτών μεταξύ μιας επικαλυμμένης ίνας και ενός δείγματος. Η επαναχρησιμοποιούμενη ίνα είναι επικαλυμμένη με μια στατική φάση, η οποία μπορεί να είναι ένα υγρό πολυμερές, ένα στερεό προσροφητικό ή ένας συνδυασμός και των δύο. Μια μαζική μεταφορά ξεκινά μετά την έκθεση στη φάση ατμού (αέρια φάση) πάνω από ένα διάλυμα (HS – SPME) ή με απευθείας βύθιση στο διάλυμα (DI – SMPE). Αυτή η διαδικασία στηρίζεται στον δεύτερο νόμο της θερμοδυναμικής. Με αυτόν τον τρόπο το χημικό δυναμικό κάθε ένωσης πρέπει να είναι ίδιο. Μόλις επιτευχθεί η ισορροπία, οι εκχυλισμένες ενώσεις στην ίνα απορροφώνται και εισέρχονται στη θύρα έγχυσης ενός χρωματογράφου. Η απελευθέρωση των αναλυτών πραγματοποιείται με την GC μέσω θερμικής εκρόφισης ή με την HPLC με διάλυση και μετέπειτα έγχυση του διαλύτη έκλυσης.

Ο στόχος της SPME είναι η επίτευξη της ισορροπίας μεταξύ της μήτρας του δείγματος και της επίστρωσης, στη συσκευή SPME, όσο το δυνατό γρηγορότερα. Περαιτέρω έκθεση της ίνας μετά την επίτευξη της ισορροπίας δεν αυξάνει την συγκέντρωση των εκχυλισμένων ενώσεων (Merkle, et al., 2015).

### 3.2.2 Οργανολογία

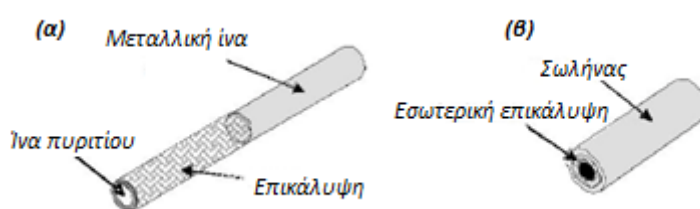
#### Μικροεκχύλιση στερεής φάσης με ίνες

Η παραδοσιακή τεχνική αφορά την επικαλυμμένη με ίνες SPME (**Εικόνα 2α**). Η συσκευή αυτή είναι κατασκευασμένη από μια λεπτή ίνα πηκτής διοξειδίου πυριτίου, η οποία είναι επικαλυμμένη με ένα στρώμα προσροφητικού υλικού που λειτουργεί ως η φάση εκχύλισης (Jalili, et al., 2020). Οι συσκευές ινών SPME περιλαμβάνουν μια βάση ινών και ένα συγκρότημα ινών. Το συγκρότημα ινών αποτελείται από πτυσσόμενες ίνες 1 έως 2 cm, οι οποίες ομοιάζουν με μικροσύριγγες. Αφού το δείγμα τοποθετηθεί σε φιαλίδιο σφραγισμένο με πώμα, η βελόνα SPME διαπερνά το διάφραγμα και η ίνα εκτείνεται στο φιαλίδιο (Merkle, et al., 2015). Σε αυτή την τεχνική, η φάση εξαγωγής εκτίθεται στη

μήτρα του δείγματος για ανάλυση για συγκεκριμένη χρονική περίοδο, μετά την επίτευξη της κατάλληλης ισορροπίας και οι προσροφημένες ενώσεις αναλύονται τοποθετώντας την ίνα στη θύρα έγχυσης ενός αεριοχρωματογράφου (Jalili, et al., 2020).

### Μικροεκχύλιση στερεής φάσης σε σωλήνα

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί ένα ανοιχτό σωληνοειδές τριχοειδές από πυρίτιο, του οποίου τη φάση εκχύλισης αποτελεί είτε η επίστρωση της εσωτερικής επιφάνειας του είτε κάποιο προσροφητικό υλικό (**Εικόνα 2β**) (Merkle, et al., 2015). Λίγα μικρόλιτρα του δείγματος μεταναστεύουν στο τριχοειδές με ρυθμό ανάλογο της γραμμικής ταχύτητας του δείγματος. Αν και οι εμπορικές πυριτικές στήλες τριχοειδών της GC αποτελούνται συνήθως από λεπτά υγρά ή πορώδη σωματίδια, άλλοι τύποι τριχοειδικών σωλήνων αποτελούνται από συσκευασμένο προσροφητικό υλικό, συσκευασμένες ίνες και μονόλιθους σε σχήμα ράβδου (Queiroz, et al., 2019). Κατά συνέπεια, οι συσκευές SPME σε σωλήνα παρουσιάζουν μια σημαντικά μεγαλύτερη μηχανική σταθερότητα από τις συσκευές SPME ινών (Merkle, et al., 2015).



Εικόνα 2. Απεικόνιση συσκευής SPME (α) ινών και (β) σωλήνα (με εσωτερική επίστρωση)

### 3.2.3 Κατηγορίες τρόπου εκχύλισης SPME

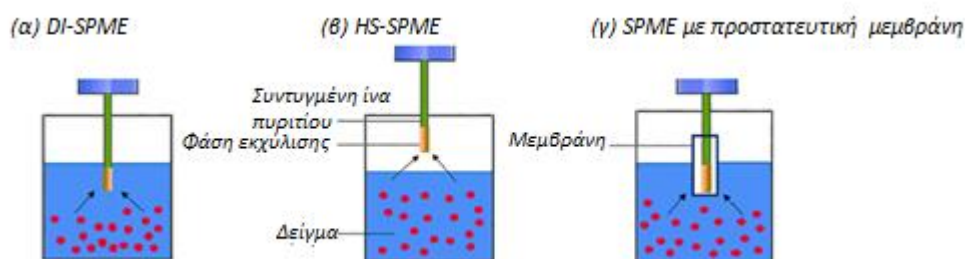
Η SPME είναι δυνατό να εκτελεστεί με τρεις διαφορετικούς τρόπους:

1. Απευθείας/άμεση SPME (Direct immersion solid phase microextracton – DI-SPME)
2. SPME στον υπερκείμενο χώρο (Headspace solid phase microextraction – HS-SPME)
3. SPME με τη χρήση προστατευτικής μεμβράνης.

Στην DI-SPME, η ίνα επικαλύπτεται με ένα προσροφητικό υλικό και εισέρχεται μέσα στη μήτρα του δείγματος. Οι αναλύτες μεταφέρονται απευθείας από το δείγμα στην φάση εξαγωγής. Η HS-SPME κυκλοφόρησε για πρώτη φορά το 1990 και προτιμάται για πτητικές ενώσεις και συνήθως για βιολογικά δείγματα. Στην HS-SPME μία ίνα πυριτίου επικαλυμμένη με ένα προσροφητικό υλικό εκτίθεται στον υπερκείμενο χώρο

επάνω από το δείγμα. Στη συνέχεια πτητικές ή ημι-πτητικές ενώσεις κατανέμονται μεταξύ του δείγματος του υπερκείμενου χώρου και του προσροφητικού υλικού, οι ενώσεις ισορροπούν μεταξύ του δείγματος και του υπερκείμενου χώρου και παγιδεύονται από την επίστρωση ινών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την παραλαβή με αυτόν τον τρόπο καθαρότερων εκχυλισμάτων και με μεγαλύτερη επιλεκτικότητα. Επιπλέον, επειδή η μήτρα του δείγματος δεν έρχεται σε άμεση επαφή με την επικαλυπτόμενη ίνα η διάρκεια ζωής του προσροφητή αυξάνεται.

Η εφαρμογή της DI-SPME και της HS-SPME είναι περιορισμένη για μη πτητικές ενώσεις και για ενώσεις με υψηλές μοριακές παρεμβολές όπως είναι οι πρωτεΐνες και τα λιπαρά υλικά. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, μια προστατευτική μεμβράνη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάλυση αυτών των ενώσεων. Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιείται η DI-SPME μαζί με μια κοίλη προστατευτική μεμβράνη, η οποία αποτρέπει τη διάχυση μεγάλων μορίων στη φάση της εκχύλισης, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει τη μαζική μεταφορά αναλυτών (**Εικόνα 3**) (Jalili, et al., 2020).



Εικόνα 3. Κατηγορίες μεθόδων εκχύλισης SPME

#### 3.2.4. Παράγοντες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα

Για την επίτευξη της υψηλής ποιότητας της τεχνικής SPME είναι σημαντική η βελτιστοποίηση των παραμέτρων που επηρεάζουν την απόδοση της εξαγωγής όπως η χημεία της φάσης εκχύλισης, ο τρόπος εξαγωγής, η μέθοδος ανάδευσης, η τροποποίηση του δείγματος (pH, ιοντική ισχύς, περιεχόμενο οργανικού διαλύτη), η θερμοκρασία του δείγματος, ο χρόνος εξαγωγής και οι συνθήκες εκρόφησης.

Μέσα σε αυτές τις παραμέτρους, η επίστρωση ινών αποτελεί ένα κρίσιμο παράγοντα για την απόδοση των μεθόδων SPME (Xu, et al., 2016). Το αν είναι κατάλληλη η επιστρωμένη ίνα που μας ενδιαφέρει προσδιορίζεται από την πολικότητα της επικάλυψης και την επιλεκτικότητά της προς τους αναλύτες. Επιπλέον, οι ιδιότητες του

προσροφητή παίζουν σημαντικό ρόλο στην απόδοση του. Ωστόσο, μειονεκτήματα όπως ο περιορισμένος αριθμός εμπορικά διαθέσιμων επικαλύψεων προσροφητικού υλικού, η σχετικά χαμηλή θερμοκρασία λειτουργίας λόγω της φτωχής θερμικής σταθερότητας, η προκαλούμενη αστάθεια και διόγκωση της επικάλυψης σε οργανικούς διαλύτες και η σύντομη διάρκεια ζωής της φυσικά συγκρατημένης επίστρωσης του προσροφητικού υλικού, μπορούν να παρεμποδίσουν την εφαρμογή της SPME στην ανάλυση δειγμάτων τροφίμων (Souza-Silva, et al., 2015).

Η τεχνολογία λύματος-πηκτής (sol-gel) είναι ένας ευέλικτος τρόπος για να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα και για τη βελτίωση της επιλεκτικότητας της επίστρωσης. Για τη σύνθεση του χρησιμοποιείται ένα διάλυμα που περιέχει υδρόξυ-τερματική πολυδιμεθυλοσιλοξάνη (OH-PDMS) και μεθυλ-τριμεθοξυσιλάνιο (MTMOS), το οποίο σχηματίζει μια επικάλυψη στην εξωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς σωλήνα. Αυτό το νέο προσροφητικό υλικό έδειξε θερμική σταθερότητα σε θερμοκρασία άνω των 320° C, επιτρέποντας αποτελεσματικότερη θερμική εκρόφηση λιγότερο πτητικών αναλυτών (Fumes, et al., 2015).

Ομοίως με την τεχνική sol-gel, η χρήση ιοντικών υγρών (Ionic liquids – IIs) ως φάση εκχύλισης αναπτύχθηκε σημαντικά. Το κύριο χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής το οποίο την κάνει ελκυστική επιλογή είναι ότι μπορεί να ρυθμιστεί κατάλληλα για μια δεδομένη συσκευή. Είναι επίσης συμβατή με την GC και δεδομένης της θερμικής σταθερότητάς της παρουσιάζει αμελητέα τάση ατμών, υψηλό ιξώδες και η δομή της προσαρμόζεται στην υδροφοβικότητα ή/ και την υδροφιλία του δείγματος ρυθμίζοντας τη λειτουργία των ανιόντων και των κατιόντων. Βελτιστοποιώντας τις ιδιότητες αυτές μπορεί να σχεδιαστεί η επιθυμητή φάση εκχύλισης, η οποία θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό ιχνών διαφορετικών αναλυτών σε δείγματα τροφίμων (Souza-Silva, et al., 2015).

### **3.3. Τεχνολογία μοριακής αποτύπωσης (Molecular Imprinting Technology – MIT)**

Τις δύο τελευταίες δεκαετίες οι διαδικασίες ανάπτυξης και εφαρμογής νέων τύπων μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών (Molecularly Imprinted Polymers – MIPs) ως προσροφητικά υλικά στον κλάδο της αναλυτικής χημείας έχουν περιγράψει

εκτεταμένως. Τα προσροφητικά αυτά υλικά χρησιμοποιούνται ως στατική φάση σε τεχνικές διαχωρισμού (Rutkowska, et al., 2018). Η τεχνολογία μοριακής αποτύπωσης (MIT) εφαρμόζεται ευρέως για την παραγωγή σταθερών, αξιόπιστων και φθηνών μοριακών αποτυπωμάτων πολυμερούς, τα οποία διαθέτουν επιλεκτικές θέσεις σύνδεσης που αναγνωρίζουν τους αναλύτες-στόχους σε τρόφιμα όπως είναι διάφορα κτηνιατρικά φάρμακα, μυκοτοξίνες, παράνομα ναρκωτικά κ.α. Τα MIPs λόγω της μεγάλης επιλεκτικότητας και εξειδίκευσης χρησιμοποιούνται στον τομέα της ασφάλειας των τροφίμων.

### 3.3.1 Παρασκευή MIPs

Τα MIPs παρασκευάζονται από εγκάρσια συνδεδεμένα πολυμερή, τα οποία περιέχουν ειδικές κοιλότητες για τους αναλύτες-στόχους. Αυτές οι κοιλότητες δημιουργούνται από τον συν-πολυμερισμό διασταυρωμένων μονομερών και λειτουργικών μονομερών μαζί με ένα μόριο ή πρότυπο αποτύπωσης (template). Μετά τον πολυμερισμό, το πρότυπο αποτύπωσης απομακρύνεται, αφήνοντας μια κοιλότητα ειδική προς έναν αναλύτη (Wang, et al., 2016), εμφανίζονται δηλαδή τα λεγόμενα μοριακά αποτυπώματα. Οι κοιλότητες αυτές είναι συμπληρωματικές με το πρότυπο αποτύπωσης καθώς έχουν το ίδιο μέγεθος, σχήμα και χωρική διάταξη (Tarannum, et al., 2020).

Τα MIPs μπορούν να δημιουργηθούν χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό διαφορετικών τεχνικών. Ο κύριος τύπος αποτύπωσης είναι ο μη ομοιοπολικός **(Εικόνα 4α)** και στηρίζεται στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του λειτουργικού μονομερούς και του template που πολυμερίζονται. Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν τον μαζικό πολυμερισμό, τον πολυμερισμό καθίζησης, τον πολυμερισμό γαλακτώματος, την αποτύπωση στερεής φάσης και τα αποτυπώματα πυρήνα (core shell imprinting). Η επιλογή της μεθόδου αποτύπωσης εξαρτάται από το σχήμα και το μέγεθος του επιθυμητού MIP (δηλαδή λεπτές μεμβράνες, νανοσωματίδια κ.λπ.). Για παράδειγμα, για την προετοιμασία δειγμάτων τροφίμων χρησιμοποιείται συνήθως ο μαζικός πολυμερισμός.

Ο μαζικός πολυμερισμός είναι μια από τις πιο απλές μεθόδους αποτύπωσης και περιλαμβάνει το σχηματισμό μεγάλου μεγέθους μονόλιθων MIPs οι οποίοι μπορούν να μετατραπούν σε μικροσφαιρίδια ακανόνιστου σχήματος. Ωστόσο, η μέθοδος μπορεί να οδηγήσει σε παρτίδες υψηλών διακυμάνσεων και σε σχηματισμό σωματιδίων χωρίς

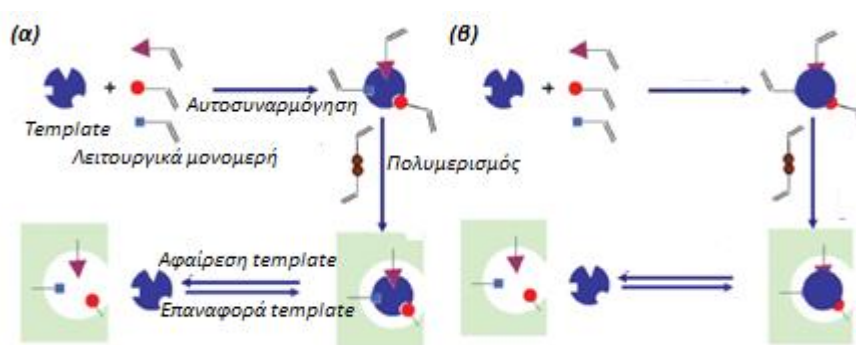
θέσεις δέσμευσης. Επιπροσθέτως, η τεχνική αυτή απαιτεί μεγάλο αριθμό templates, υπάρχει κίνδυνος διαρροής του template και είναι δύσκολο να επεξεργαστεί (Ashley, et al., 2017).

### 3.3.2. Είδη μοριακής αποτύπωσης

Ο σχηματισμός του συμπλόκου μετά τον πολυμερισμό των λειτουργικών μονομερών και του template οφείλεται στην αλληλεπίδραση των MIPs με το template μέσω ομοιοπολικών ή μη ομοιοπολικών προσεγγίσεων.

Οι τυπικές μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις περιλαμβάνουν ιοντικούς δεσμούς, δεσμούς υδρογόνου, δεσμούς π-π, δυνάμεις van der Waals, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις κ.α. Η διαδικασία της μη ομοιοπολικής αποτύπωσης είναι χειριστικά απλούστερη και δεν περιορίζει αυστηρά την επιλογή των λειτουργικών μονομερών και των μοριακών αποτυπωμάτων, δηλαδή δίνεται η δυνατότητα επιλογής από μια ευρεία κατηγορία μονομερών. Κατά τη διάρκεια της, ο πολυμερισμός του συμπλόκου δημιουργείται από την αυτό-σύνδεση του μορίου μέσω ενός συστήματος ισορροπίας.

Η ομοιοπολική προσέγγιση (**Εικόνα 4β**), η οποία προτείνεται από τον Wulff, στηρίζεται στην χημική σύνθεση του συμπλόκου. Συγκριτικά με τη μη ομοιοπολική μέθοδο, η ομοιοπολική εξασφαλίζει τη δημιουργία περισσότερων ομοιογενών θέσεων σύνδεσης και πιο συχνά σχηματίζονται οξέα, κετάλες, εστέρες βορονικού ή καρβοξυλικού οξέος και ιμίνες (βάσεις Schiff). Ωστόσο, ένα από τα μειονεκτήματα της αποτελεί η δυσκολία εξαγωγής του προτύπου αποτύπωσης και συγκεκριμένα ο βαθμός της εξαγωγής δεν υπερβαίνει το 90% (Tarannum, et al., 2020).



Εικόνα 4. Είδη μοριακής αποτύπωσης (α) μη ομοιοπολικός τύπος (β)ομοιοπολικός τύπος

### 3.3.3 Εφαρμογή MIT σε SPE και SPME

Η μέθοδος SPE είναι μια διαδικασία ουσιαστικής σημασίας καθώς επιτρέπει την ανάλυση πολύ μικρών συγκεντρώσεων και ιχνών χημικών συστατικών σε ένα σύνθετο δείγμα τροφίμων. Συνήθως, κατά τη μέθοδο της SPE χρησιμοποιούνται προσροφητικά υλικά με βάση το πυρίτιο όπως τα C18 και C19, και άλλα πολυμερή ή νανοϋλικά. Όμως, η τεχνική αυτή συχνά δεν έχει την επιλεκτική ικανότητα εκχύλισης των ενώσεων-στόχων.

Αντιθέτως, τα MIPs ως προσροφητικά υλικά είναι γνωστό ότι προσδίδουν ακρίβεια, επιλεκτικότητα και ευαισθησία στη μέθοδο ανίχνευσης ουσιών. Η χρήση των MIPs στην SPE αναφέρθηκε πρώτα από τον Sellergen και ώθησε στη δημιουργία εφαρμογών με μεγαλύτερη ικανότητα αναγνώρισης του μορίου-στόχου, κάτι που προκάλεσε σημαντική προέγκυση και ενδιαφέρον ως προς αυτή τη μέθοδο (Wang, et al., 2016). Επιπλέον πλεονεκτήματα αποτελούν οι υψηλότερες δυνατότητες φόρτωσης και η υψηλότερη απόδοση για τη συγκράτηση αναλυτών (Ashley, et al., 2017).

Η χρήση MIPs στην SPE (MIP-based SPE) είναι από τις πιο δημοφιλείς μεθόδους προετοιμασίας δειγμάτων τροφίμων διότι είναι βολική, γρήγορη, καταναλώνει λιγότερη ποσότητα διαλύτη και είναι ικανή για την απομόνωση επιλεκτικών αναλυτών. Στην κλασική MIP-SPE, το αποτυπωμένο πολυμερές συσκευάζεται σε ένα φυσιγγιο, στήλη ή πλάκα εκχύλισης (για ανάλυση υψηλής απόδοσης). Πρόσφατα, εναλλακτικές μορφές MIP όπως λεπτές μεμβράνες και νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται ως προσροφητικά υλικά στην SPE.

Δύο διαφορετικές προσεγγίσεις έχουν εξεταστεί για την εκχύλιση αναλυτών με MIPs. Ο τύπος «κανονικής φάσης» χρησιμοποιείται για την επεξεργασία δειγμάτων τροφίμων διαλυμένων σε κάποιο διαλύτη χαμηλής πολικότητας. Η προσρόφηση του αναλύτη στο MIP υπόστρωμα γίνεται μέσω αλληλεπιδράσεων ειδικού σχήματος των αναλυτών με τη μήτρα του πολυμερούς. Ο αναλύτης διατηρείται επιλεκτικά στη στήλη εκχύλισης ενώ ταυτόχρονα τα παρεμβαλλόμενα μόρια μπορούν να περάσουν ελεύθερα διαμέσου της στήλης. Η αύξηση της ισχύος της κινητής φάσης έχει ως αποτέλεσμα την έκλυση του αναλύτη. Η δεύτερη προσέγγιση της μεθόδου στηρίζεται στο τύπο της «αντίστροφης φάσης», η οποία αφορά υδατικά δείγματα τροφίμων. Με αυτή τη μέθοδο οι αναλύτες στα υδατικά διαλύματα απορροφώνται από το MIP μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Μεταγενέστερη πλύση με διαλύτη μπορεί να απομακρύνει τις

παρεμβαλλόμενες ενώσεις που εξέρχονται από τον αναλύτη. Η έκλυση του αναλύτη μπορεί να συμβεί όταν η στήλη πλένεται με το κατάλληλο μέσω διάλυσης, το οποίο θα πρέπει να είναι ικανό να ελαχιστοποιεί τις μη ειδικές θέσεις δέσμησης και τις διαταραχές μεταξύ των μορίων στόχων στα δείγματα τροφίμων και του MIP.

Υπάρχουν αρκετές αναφορές στη βιβλιογραφία οι οποίες παρουσιάζουν την εφαρμογή της μεθόδου MIP-SPE στην εκχύλιση αντιβιοτικών, φυτοφαρμάκων και μυκοτοξινών σε δείγματα τροφίμων. Για παράδειγμα, η ανίχνευση φθοροκινολονών σε παιδικές τροφές επιτεύχθηκε επιτυχώς μετά την φόρτωση του δείγματος σε αποτύπωμα πολυμερούς μάζας. Παλαιότερα ήταν δύσκολη η ανάλυση αρκετών διαφορετικών συστατικών την ίδια χρονική στιγμή. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίστηκε με την ανάπτυξη καινοτόμων πολλαπλών προτύπων αποτύπωσης (multiple-template MIPS – MT-MIP). Αυτά αποδείχθηκε ότι μπορούσαν να ανιχνεύσουν ταυτόχρονα μέσω εκχύλισης, για παράδειγμα ιχνοστοιχεία και οιστρογόνα σε δείγματα γάλακτος.

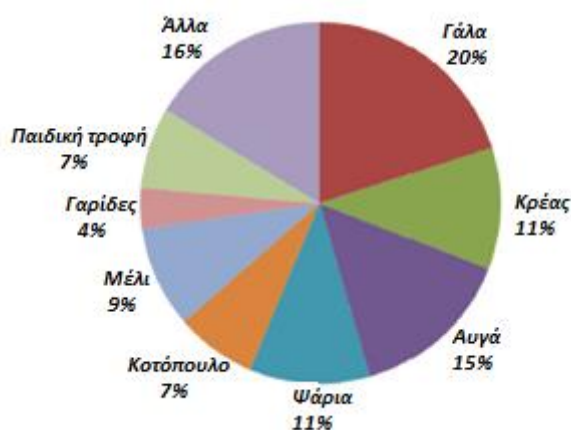
Όσον αφορά την μέθοδο SPME όπως έχει ήδη αναφερθεί αποτελεί μέθοδο προετοιμασίας δειγμάτων με τη χρήση σύριγγας η οποία περιέχει μια ίνα επικαλυμμένη από πυρίτιο. Πλεονεκτεί συγκριτικά με την SPE λόγω του μειωμένου χρόνου προετοιμασίας δείγματος, τη μη χρήση οργανικών διαλυτών, το χαμηλό κόστος και την ευκολία αυτοματισμού. Ωστόσο, το κύριο μειονέκτημα της, όπως και της SPE, είναι η έλλειψη επιλεκτικότητας, κάτι που μπορεί να αντιμετωπιστεί με την επικάλυψη των ακρών των ινών με MIPS. Η ενέργεια αυτή προσδίδει ανώτερη ευαισθησία και επιλεκτικότητα.

Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες ιδέες που εμφανίστηκε πρόσφατα είναι ο συνδυασμός των τεχνολογιών MIP και sol-gel. Με την εφαρμογή επίστρωσης sol-gel στο MIP και με τη παράλληλη χρήση πολυαιθυλενικής γλυκόλης ως λειτουργικό μονομερές και της ουσίας διαζινόν ως template, επιτεύχθηκε η επιλεκτική ανίχνευση της ουσίας διαζινόν και των αναλόγων της σε λαχανικά όπως το λάχανο, η μελιτζάνα, η πράσινη πιπεριά και δείγματα αγγουριού και μαρουλιού. Εκτός από την χημική και θερμική σταθερότητα, η ικανότητα εκχύλισης ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με τις εμπορικές ίνες και τα μη αποτυπωμένα πολυμερή, λόγω της επιλεκτικής προσρόφησης και της πορώδους επιφάνειας του υλικού (Ashley, et al., 2017).



### 3.4 Εκχύλιση υγρού-υγρού (Liquid-Liquid Extraction – LLE)

Η LLE είναι μια από τις πιο κοινές τεχνικές για την προετοιμασία δειγμάτων, η οποία χαρακτηρίζεται από υψηλότερη επιλεκτικότητα από ότι οι απλές μέθοδοι εκχύλισης. Η LLE, μαζί με την SPE, είναι από τις πιο παλιές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό μιας μεγάλης ποικιλίας χημικών ενώσεων στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Κατά τη διάρκεια των ετών 2015 έως 2020, διάφορα αντιβιοτικά έχουν βρεθεί με την τεχνική LLE σε προϊόντα όπως το γάλα και τα αυγά, ενώ λιγότερο συχνά σε κοτόπουλα, γαρίδες και παιδικές τροφές (**Εικόνα 5**) (Khatibi, et al., 2020).



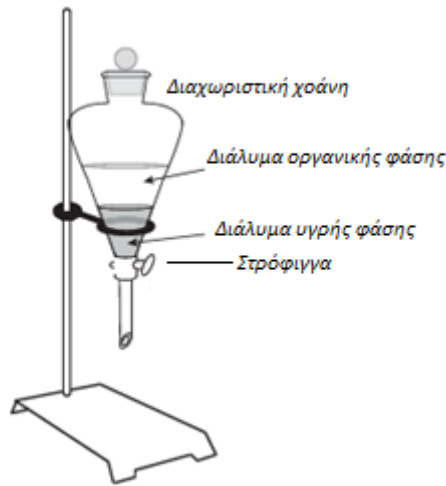
Εικόνα 5. Δείγματα τροφίμων που χρησιμοποιήθηκαν για την εκχύλιση αντιβιοτικών με την τεχνική LLE, κατά τη διάρκεια των ετών 2015-2020

#### 3.4.1. Αρχή μεθόδου

Στην LLE οι αναλύτες μεταφέρονται από ένα υδατικό δείγμα σε ένα διάλυμα το οποίο δεν αναμιγνύεται με νερό. Η διαφορά της διαλυτότητας μεταξύ των δύο φάσεων επηρεάζει την εξαγωγή του αναλύτη και τη μεταφορά του από την πρώτη υγρή φάση στην δεύτερη (Khatibi, et al., 2020).

Πιο αναλυτικά, στην τεχνική LLE χρησιμοποιούνται δύο μη μιγνυόμενες φάσεις ώστε να επιτευχθεί η μεταφορά ενός ή περισσοτέρων διαλυτών από τη μία φάση στην άλλη (Tissue, 2013), δηλαδή οι επιθυμητές ενώσεις κατανέμονται στον κατάλληλο διαλύτη ανάλογα με τις ιδιότητες τους (Σαμανίδου, 2015). Πιο συγκεκριμένα με την τεχνική αυτή, μια ποσότητα όγκου του δείγματος που επρόκειτο να εκχυλιστεί έρχεται σε επαφή με ένα ορισμένο όγκο διαλύτη εκχυλίσεως, μέσα σε μια διαχωριστική χοάνη, και αναταράσσεται μέχρι η ισορροπία να αποκατασταθεί (**Εικόνα 6**). Όταν επέλθει η ισορροπία οι δύο φάσεις διαχωρίζονται μέσω εκροής της κατώτερης στοιβάδας από το

κάτω μέρος της χοάνης. Ωστόσο, εάν το εκχυλιστικό μέσο έχει μικρότερη πυκνότητα από τον αναλύτη προτιμώνται συστήματα που απομακρύνουν την ανώτερη στοιβάδα της χοάνης (Χατζηιωάννου & Κούππαρης, 2005).



Εικόνα 6. Απεικόνιση διαχωριστικής χοάνης εκχύλισης

### 3.4.2. Επιλογή διαλύτη εκχύλισης

Διάφοροι διαλύτες εκχύλισης χρησιμοποιούνται στην LLE όπως το εξάνιο, το αιθανονιτρίλιο και ο αιθανικός αιθυλεστέρας, το οποίο είναι ένας από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους διαλύτες μέσης πολικότητας για την εκχύλιση φυτοφαρμάκων σε δείγματα τροφίμων (Narendran, et al., 2020). Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης γίνεται με βάση τα παρακάτω κριτήρια:

1. Ο διαλύτης εκχύλισης δεν πρέπει να αντιδρά με την εκχυλιζόμενη ουσία.
2. Ύστερα από την έντονη ανακίνηση του διαλύτη και του υδατικού διαλύματος, οι δύο στοιβάδες πρέπει να διαχωρίζονται γρήγορα.
3. Να επιτρέπεται η εύκολη ανάκτηση της ουσίας από το εκχυλιστικό μέσο.
4. Οι δύο φάσεις δεν πρέπει να εμφανίζουν τάση σχηματισμού γαλακτωμάτων.
5. Αποφυγή επιλογής τοξικού ή εύφλεκτου διαλύτη.
6. Ο διαλύτης πρέπει να είναι οπτικά διαφανής, ώστε να πραγματοποιηθούν φασματοφωτομετρικές μετρήσεις.
7. Η πυκνότητα  $d$  του διαλύτη πρέπει να εμφανίζει αξιόλογη διαφορά (μικρότερη ή μεγαλύτερη) σε σχέση με τη πυκνότητα του ύδατος (Χατζηιωάννου & Κούππαρης, 2005).

### 3.4.3 Μειονεκτήματα και παραλλαγές της LLE

Παρά την ευρεία χρήση και την καλή αναλυτική απόδοση της LLE, η μέθοδος παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα όπως ο σχηματισμός γαλακτώματος, η απώλεια του αναλύτη, η μόλυνση του δείγματος, η χαμηλή ευαισθησία, δυσκολίες στον αυτοματισμό, η ανάγκη μεγάλου όγκου δείγματος. Στις μέρες μας θεωρείται αρκετά δαπανηρή, χρονοβόρα και μη φιλική προς το περιβάλλον τεχνική (Khatibi, et al., 2020). Επιπλέον, καθίσταται δυνατή η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του δείγματος, όπως προσμίξεις, λόγω του ότι έχουν παρόμοιες ιδιότητες και η τεχνική αυτή εμφανίζει δυσκολίες που αφορούν την αυτοματοποίηση της κλασικής μορφής της (Σαμανίδου , 2015).

Ένα άλλο αρνητικό της μεθόδου είναι η απαίτηση μιας μεγάλης σχετικά ποσότητας οργανικών διαλυτών. Για το λόγο αυτό τροποποιημένες μέθοδοι αναπτύχθηκαν ώστε να μειώσουν τον όγκο αυτό. Για παράδειγμα, η δυναμική μικρο-εκχύλιση υγρού-υγρού, η οποία βασίζεται σε μεμβράνες ινών (hollow fiber-HF), προτάθηκε για την ανάλυση των τετρακυκλινών στο γάλα. Η ταχεία εκχύλιση με διαλύτη (Accelerated solvent extraction– ASE) ή αλλιώς γνωστή ως εκχύλιση υγρού υπό πίεση (Pressurized liquid extraction – PLE), είναι ένα είδος εκχύλισης υγρής φάσης που μπορεί να μειώσει το χρόνο εκχύλισης υπό την επίδραση υψηλής θερμοκρασίας και υψηλής πίεσης. Η ASE χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της αμιτράζης και του μεταβολίτη της, της λινκομυκίνης και της σπεκτινομυκίνης σε ζωικούς ιστούς και ακολουθήθηκε από την τεχνική SPE για τον καθαρισμό του αναλύτη. Επιπρόσθετα, η ASE σε συνδυασμό με τη μέθοδο SPE εφαρμόστηκε για την εξαγωγή φθοροκινολονών από ζωικά τρόφιμα συμπεριλαμβανομένων των μυών, του ήπατος και των νεφρών χοίρων και βοοειδών, των μυών και του συκωτιού κοτόπουλου και των μυών ψαριών (Li, et al., 2020).

Άλλες παραλλαγές της τεχνικής LLE όπως η μικροεξαγωγή υγρής φάσης (Liquid-phase microextraction – LPME), η τεχνική εξαλάτωσης (Salting-out LLE – SALLE) και η εκχύλιση σε υδατικά διφασικά συστήματα (Aqueous two-phase system – ATPS), έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση αντιβιοτικών στα τρόφιμα τα τελευταία 5 χρόνια. (Khatibi, et al., 2020).

### 3.5 QuEChERS

Η διαδικασία προετοιμασίας του δείγματος προς ανάλυση καταναλώνει συνήθως υψηλές ποσότητες πόρων, όπως διαλύτες, χημικές ουσίες, ενέργεια, χρόνο κ.λπ. και γι' αυτό το λόγο πραγματοποιήθηκαν μεγάλες προσπάθειες για την ανάπτυξη μια νέας αποτελεσματικής μεθοδολογίας. Μεταξύ των ποικίλων διαθέσιμων διαδικασιών, η μέθοδος QuEChERS φάνηκε να αποκτά ευρεία δημοτικότητα (Santana-Mayor, et al., 2019). Η τεχνική ονομάστηκε έτσι λόγω παρακάτω χαρακτηριστικών της: Γρήγορη (Quick), εύκολη (Easy), οικονομική (Cheap), αποτελεσματική (Effective), ανθεκτική (Rugged) και ασφαλής (Safe) (Musarurwa, et al., 2019), και αποτελεί μια μορφή της τεχνικής SPE (Vijay, et al., 2021). Αυτές οι ιδιότητες της, την κατέστησαν ιδιαίτερα δημοφιλή για τον προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος ουσιών κυρίως φυτοφαρμάκων, αλλά και κτηνιατρικών φαρμάκων, σε διάφορες μήτρες όπως οι χυμοί, το μέλι, το κρασί, τα αυγά, το γάλα, το γιαούρτι και το βόειο κρέας (Pszczolińska & Monika, 2016).

#### 3.5.1 Ιστορικά στοιχεία

Οι επιστήμονες που ασχολούνταν με την αναλυτική χημεία έθεσαν ως στόχο την ανάπτυξη πιο γρήγορων και ακριβών μεθόδων, οι οποίες θα ήταν ικανές να εγγυηθούν την ποιότητα, την αυθεντικότητα, την ασφάλεια και την ιχνηλασιμότητα του αναλύτη στόχου σε μια μεγάλη ποικιλία δειγμάτων (Perestrelo, et al., 2019). Το 2003, ο Michelangelo Anastassiades και ο Steven J. Lehotay, δημοσίευσαν μαζί με τους συνεργάτες τους μια μελέτη για μια γρήγορη και εύκολη μέθοδο, η οποία ανιχνεύει πολλαπλά υπολείμματα ουσιών. Η τεχνική QuEChERS χρησιμοποιούσε αιθανονιτρίλιο για την εξαγωγή/ διαχωρισμό των επιθυμητών αναλυτών και τη μέθοδο εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης (dispersive Solid-Phase Extraction – dSPE) για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε διάφορα προϊόντα.

Για ορισμένους επιστήμονες, η διαδικασία που καθιερώθηκε το 2003 δεν ήταν ένα εντελώς νέο επίτευγμα. Προφανώς, ο διαχωρισμός στερεού-υγρού (το πρώτο βήμα της μεθόδου) ήταν γνωστό και εφαρμόστηκε στην εξαγωγή μιας ευρείας ποικιλίας αναλυτών σε δείγματα. Όσον αφορά το βήμα με τη μέθοδο d-SPE, τα προσροφητικά υλικά είχαν ήδη εφαρμοστεί για τον καθαρισμό δειγμάτων. Ωστόσο, ο μοναδικός συνδυασμός των διαδικασιών της εξαγωγής και του καθαρισμού, οι διαλύτες, τα άλατα και τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται αποδείχθηκαν πολύ αποτελεσματικά,

με απόρροια, σήμερα, η μέθοδος QuEChERS να αποτελεί πρότυπο για τη διαδικασία προετοιμασίας δειγμάτων για ανάλυση φυτοφαρμάκων σε φρούτα και λαχανικά (González-Curbelo, et al., 2015).

### **3.5.2. Σύγκριση QuEChERS με άλλες τεχνικές προετοιμασίας**

Η μέθοδος QuEChERS προωθεί την «πράσινη» όψη της αναλυτικής χημείας. Αυτό συμβαίνει διότι η τεχνική αυτή χρησιμοποιεί πολύ μικρή ποσότητα δείγματος, τοξικών ενώσεων και ενέργειας, και παράγει λιγότερα απόβλητα. Ένα ακόμη πλεονέκτημα της μεθόδου είναι επίσης η υψηλή ευελιξία της, γιατί μπορεί και χρησιμοποιείται ως πρότυπο τροποποιήσεων ανάλογα με τις ιδιότητες του εκάστοτε αναλύτη, τη σύνθεση της μήτρας, τον εξοπλισμό και την αναλυτική τεχνική που είναι διαθέσιμη στο κάθε εργαστήριο. Γι' αυτούς τους λόγους η μέθοδος QuEChERS είναι ιδιαίτερα δημοφιλής όσον αφορά τον προσδιορισμό ενός μεγάλου φάσματος φυτοφαρμάκων σε διάφορες μήτρες τροφίμων (Pszczolińska & Monika, 2016).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της μεθόδου είναι η ικανότητα επεξεργασίας μεγάλων αριθμών δειγμάτων. Για παράδειγμα, για μια παρτίδα 10 έως 20 δειγμάτων απαιτούνται για τη διεξαγωγή της ανάλυσης τους, από έναν και μόνο αναλύτη, 30 με 40 λεπτά (Rejczak & Tuzimski, 2015). Η μέθοδος χρησιμοποιεί αιθανονιτρίλιο, το οποίο επιτρέπει την εκχύλιση πολικών αναλυτών και παρέχει αυξημένο βαθμό επιλεκτικότητας, ανιχνευσιμότητας και άμεσης συμβατότητας με τις τεχνικές GC-MS και LC-MS. Συγκριτικά με άλλες τεχνικές όπως η SPE και η LLE, η QuEChERS ελαχιστοποιεί τον αριθμό των απαιτούμενων σταδίων της προετοιμασίας του δείγματος, καθώς περιλαμβάνει μόνο δύο βήματα (Musarurwa, et al., 2019).

### **3.5.3 Αρχή μεθόδου**

Η μέθοδος QuEChERS είναι μια απλοποιημένη έκδοση των συμβατικών μεθόδων εκχύλισης για την ανάλυση πολλαπλών υπολειμμάτων. Η πλήρης ομογενοποίηση του δείγματος στόχου είναι ένα πολύ σημαντικό πρώτο βήμα για την αποτελεσματική εκτέλεση της μεθόδου. Μετά την ομογενοποίηση του δείγματος ακολουθεί η εκχύλιση και ο διαχωρισμός του χρησιμοποιώντας ένα διαλύτη, και ο καθαρισμός του μέσω της τεχνικής d-SPE με στόχο την απομάκρυνση παρεμβολών της μήτρας του δείγματος (Kim, et al., 2019).

Γενικότερα, η QuEChERS χωρίζεται σε δύο στάδια. Το πρώτο περιλαμβάνει την εκχύλιση με βιολογικούς διαλύτες και ανόργανα άλατα (π.χ.  $MgSO_4$ ,  $NaCl$  ή/και ρυθμιστικό διάλυμα αλάτων), ώστε να επιτευχθεί ο διαχωρισμός της υδατικής και της οργανικής φάσης. Στο δεύτερο στάδιο, με τη μέθοδο d-SPE πραγματοποιείται η αφαίρεση παρεμβολών της μήτρας όπως χρωστικές ουσίες, σάκχαρα και οργανικά και λιπαρά οξέα (Pajewska-Szmyt, et al., 2019).

#### **3.5.4. Τροποποιήσεις μεθόδου**

Κατά τη διάρκεια ανάπτυξης της μεθόδου οι ερευνητές έπρεπε να ασχοληθούν με ορισμένες θεμελιώδεις πτυχές της. Για παράδειγμα, ήταν σημαντική η εξέταση των παραμέτρων του πρώτου σταδίου της μεθόδου, δηλαδή αυτό που αφορούσε τον διαχωρισμό των επιθυμητών αναλυτών. Οι παράμετροι αυτοί αφορούσαν την επιλογή του διαλύτη εκχύλισης, την αναλογία δείγματος προς διαλύτη, την ποσότητα του δείγματος προς ανάλυση, την επίδραση του pH του δείγματος στο ανακτώμενο προϊόν και τον τύπο και την ποσότητα των αλάτων που χρησιμοποιούνταν κατά την πρώτη φάση του διαχωρισμού. Σχετικά με το στάδιο του καθαρισμού με τη μέθοδο d-SPE, ο τύπος και η ποσότητα του προσροφητικού υλικού και του  $MgSO_4$  που θα επιλέγονταν, ήταν τα προβλήματα που τους απασχολούσαν (Rejczak & Tuzimski, 2015).

Η μείωση των παρεμβολών της μήτρας, η αύξηση της ευαισθησίας η ανάκτηση των αναλυτών στόχων από σύνθετες μήτρες, αποτελούν στοιχεία που βελτιώνουν την αναλυτική απόδοση της QuEChERS και είναι μερικοί από τους λόγους που δικαιολογούν τη βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου. Στην αρχική μέθοδο, το πρώτο βήμα της πειραματικής διάταξης εκτελέστηκε χωρίς τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων. Υπό αυτές τις συνθήκες η ανάλυση ευαίσθητων ενώσεων, οι οποίες αποικοδομούνται σε τιμές υψηλού ή χαμηλού pH, ήταν περιορισμένη. Για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος, η μέθοδος τροποποιήθηκε με τη χρήση κιτρικού ρυθμιστικού διαλύματος και/ ή τη χρήση οξικού ρυθμιστικού διαλύματος, ώστε να ενισχυθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας της εκχύλισης. Και οι δύο επιλογές χρησιμοποιούνται σήμερα από πολλούς ερευνητές και έχουν αποτελέσει την επίσημη μέθοδο για την ανάλυση καταλοίπων φυτοφαρμάκων (Perestrelo, et al., 2019). Σύμφωνα με μια μελέτη, η χρήση οξικού διαλύματος απέδειξε υψηλότερες ανακτήσεις φυτοφαρμάκων εξαρτώμενων από το pH, και επομένως γι' αυτό χρησιμοποιείται συχνά.

Από την άλλη πλευρά, καλύτερα αποτελέσματα ανακτήθηκαν χρησιμοποιώντας το διάλυμα κιτρικών, για το λόγο ότι αυτή η τροποποίηση προσέφερε υψηλότερη επιλεκτικότητα. Ωστόσο, μετά από σύγκριση και των τριών μεθόδων αποδείχθηκε ότι η επιλογή της μεθόδου QuEChERS εξαρτάται από την αλληλεπίδραση αναλύτη και μήτρας, και δεν υπάρχει μόνο μία κατάλληλη μέθοδος για όλα τα φυτοφάρμακα (Alcântara, et al., 2019).

### **3.5.5. Εφαρμογές**

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει αυξανόμενη ανησυχία για τους κινδύνους που σχετίζονται με την παρουσία διαφόρων υπολειμμάτων στα τρόφιμα. Έχοντας αυτό κατά νου, και λαμβάνοντας υπόψη ότι η QuEChERS αναπτύχθηκε για την ανάλυση φυτοφαρμάκων σε λαχανικά και φρούτα, δεν εκπλήσσει η μεγάλη εξέλιξη που αναπτύχθηκε στον τομέα της ανάλυσης των τροφίμων. Εκτός από τα φυτοφάρμακα και τα ζιζανιοκτόνα, η τεχνική εφαρμόστηκε και την ανίχνευση καταλοίπων μυκοτοξινών, κτηνιατρικών φαρμάκων και φαρμακευτικών ενώσεων, όπως είναι τα αντιφλεγμονώδη φάρμακα, τα αντιβιοτικά και τα αντιπαρασιτικά (Santana-Mayor, et al., 2019).

Η πρώτη αναφορά της εφαρμογής της QuEChERS σε ζωικούς ιστούς πραγματοποιήθηκε για την ανάλυση του β-λακτάμης σε νεφρά βοοειδούς . Επιπλέον, με τη τεχνική αυτή ανιχνεύονται κτηνιατρικά φάρμακα σε δείγματα γάλακτος, αυγών, μελιού, ψαριών και άλλων τροφίμων ζωικής προέλευσης (Garcia & Gotah, 2017).

## **Κεφάλαιο 4. Αναλυτικές μέθοδοι**

Μετά το βήμα της προετοιμασίας του δείγματος, ακολουθεί η ανίχνευση των αναλυτών σε ζωικά τρόφιμα με τη χρήση ειδικών οργάνων. Την τελευταία δεκαετία, πολλές αναλυτικές μέθοδοι έχουν ταχέως αναπτυχθεί για τον έλεγχο και τον προσδιορισμό καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων σε δείγματα τροφίμων που προέρχονται από ζώα (Wang, et al., 2021). Αυτές περιλαμβάνουν τρεις τύπους μεθόδων: α) μικροβιολογικές, β) ανοσολογικές και γ) φυσικοχημικές (Li, et al., 2020).

Ως αποτέλεσμα της ευρείας χρήσης των αντιβιοτικών στην κτηνιατρική, κατάλοιπα των φαρμάκων αυτών είναι δυνατό να παραμείνουν σε τρόφιμα που προέρχονται από αυτά τα ζώα και ενδεχομένως να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στην υγεία του καταναλωτή. Ένας από τους τρόπους παρακολούθησης των προϊόντων ζωικής προέλευσης για τον έλεγχο αντιμικροβιακών υπολειμμάτων περιλαμβάνει τη χρήση μικροβιολογικών μεθόδων.

### **4.1. Δοκιμασία Μικροβιακής Αναστολής (Microbial Inhibition Test – MIT)**

Οι δοκιμασίες μικροβιακών αναστολών ήταν οι πρώτες μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την ανίχνευση καταλοίπων αντιβιοτικών, και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως (Pikkemaat, 2009). Οι μικροβιολογικοί προσδιορισμοί είναι ποιοτικοί ή ημι-ποσοτικοί μέθοδοι και εφαρμόζονται βάση μιας συγκεκριμένης αντίδρασης μεταξύ ενός ευαίσθητου οργανισμού (βακτήριο) και του αντιβιοτικού που υπάρχει στο δείγμα (Chafer-Pericas, et al., 2010).

#### **4.1.1 Κατηγορίες δοκιμασιών μικροβιακής αναστολής**

Οι δοκιμασίες σωλήνων και πλακών (τρυβλίων) αποτελούν τις δύο πιο κοινές μορφές για τον έλεγχο της μικροβιακής αναστολής. Η τεχνική του σωλήνα περιλαμβάνει ένα μέσο ανάπτυξης εμβολιασμένο με σπόρια βακτηρίου και ένα δείκτη pH ή ένα δείκτη οξειδοαναγωγής (redox indicator). Εάν δεν υπάρχουν συγκεκριμένα αντιβιοτικά, τα βακτήρια αρχίζουν να αναπτύσσονται και να παράγουν οξέα, τα οποία θα προκαλέσουν μια ανιχνεύσιμη αλλαγή χρώματος. Αντίθετα, αν τα αντιβιοτικά είναι παρόντα, θα ανασταλεί η ανάπτυξη των βακτηρίων και δεν παρατηρηθεί αλλαγή χρώματος στον σωλήνα.



Η μέθοδος της πλάκας αποτελείται από ένα στρώμα με θρεπτικό άγαρ (θρεπτικό υλικό) εμβολιασμένο με σπόρια από βακτήρια. Το δείγμα μεταφέρεται στην επιφάνεια του τρυβλίου. Εφόσον δεν υπάρχουν συγκεκριμένα αντιβιοτικά, τα βακτήρια αρχίζουν να αναπτύσσονται μέσα στο τρυβλίο. Εάν υπάρχει ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, καμία βακτηριακή ανάπτυξη δε θα πραγματοποιηθεί γύρω από το δείγμα και απεναντίας θα παρατηρηθεί μια ζώνη αναστολής χωρίς βακτήρια (Ibrahim, et al., 2016). Οι περισσότερες από τις δοκιμές διάχυσης του αντιβιοτικού σε άγαρ βασίζονται στη μέτρηση της διαμέτρου αναστολής με τη χρήση παχυμέτρου Vernier (ή αλλιώς βερνιέρος) (Pikkemaat, 2009).

#### **4.1.2 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα**

Μερικά πλεονεκτήματα της δοκιμασίας είναι η αξιοπιστία τους, η καλή σχέση κόστους και αποτελεσματικότητας και η απλότητα της εφαρμογής της. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός αντιδραστηρίων είναι εμπορικά διαθέσιμος. Συγκριτικά με τα συστήματα LC-MS, οι δοκιμασίες μικροβιολογικής αναστολής μπορούν να ανιχνεύσουν οποιοδήποτε αντιβιοτικό ή μεταβολίτη με αντιβακτηριακή δραστηριότητα, ενώ η φυσικοχημική μέθοδος LC-MS εφαρμόζεται συνήθως σε ενώσεις που έχουν προηγουμένως οριστεί ως στόχοι, παρεμποδίζοντας έτσι την ανίχνευση άλλων αντιβιοτικών (Chafer-Pericas, et al., 2010). Το ίδιο ισχύει γενικότερα για τις οργανικές μεθόδους, και για τις ανοσολογικές.

Στα μειονεκτήματα των μικροβιολογικών δοκιμών ανήκει η έλλειψη επιλεκτικότητας, ειδικά για τη δοκιμή που πραγματοποιείται στο σωλήνα, και ο εκτεταμένος χρόνος επώασης. Ως αποτέλεσμα των παραπάνω, οι δοκιμές μικροβιακής αναστολής δεν καθίσταται κατάλληλες για την ανίχνευση απαγορευμένων αντιβιοτικών ενώσεων, όπως είναι η χλωραμφαινικόλη (Ibrahim, et al., 2016).

#### **4.1.3 Εφαρμογές**

Σύμφωνα με μελέτες, μια στρατηγική βασισμένη στη μικροβιακή αναστολή έχει εφαρμοσθεί για την ταχεία ανίχνευση υπολειμμάτων φθοροκινολόνης και κινολόνης σε τρόφιμα προερχόμενα από ζώα. Στην τεχνική αυτή ένα στέλεχος *Escherichia coli* (*E.coli*) επιλέχθηκε για την ευαισθησία του σε ένα μεγάλο εύρος ενώσεων-στόχων. Τα υπολείμματα κινολόνης σε γάλα αγελάδας ανιχνεύθηκαν με βιο-οπτική μέθοδο βασισμένη στην χρήση του αντιδραστηρίου *E.coli* ATCC 11303. Η παρακολούθηση της προκαλούμενης αναστολής ανάπτυξης πραγματοποιήθηκε μέσω μέτρησης της οπτικής

πυκνότητας (Optical Density – OD) σε ένα αυτοματοποιημένο σύστημα. Για την ανίχνευση καταλοίπων σουλφαμεθαζίνης στους βρώσιμους ιστούς κουνελιού έχουν εφαρμοστεί τρεις δοκιμές μικροβιακής αναστολής βασισμένες σε διαφορετικούς οργανισμούς και με τη μέθοδο HPLC να αποτελεί την τεχνική για την ποσοτικοποίηση των καταλοίπων. Τέλος, η ανάπτυξη δοκιμασίας μικροβιακής αναστολής με χρήση δύο τρυβλίων ανίχνευσε κατάλοιπα αντιβιοτικών σε ιστούς γαρίδας (Li, et al., 2020).

Η δοκιμή των τεσσάρων τρυβλίων (Four-plate test – FPT) σχεδιάστηκε για την ανάλυση κρέατος και έχει αναγνωριστεί στην Ευρώπη ως πολύτιμη μέθοδος για τον εντοπισμό υπολειμμάτων αντιβιοτικών στα τρόφιμα. Στην FPT δημιουργούνται διαφορετικές οικογένειες αντιμικροβιακών παραγόντων σε διαφορετικά πρότυπα ζωνών αναστολής μεταξύ τεσσάρων τρυβλίων. Τροποποίηση του αρχικού μοντέλου FPT με βάση την ανάπτυξη της μικροβιακής αναστολής του *Bacillus subtilis* και του *Micrococcus luteus* πραγματοποιήθηκε για την ανίχνευση αντιβιοτικών καταλοίπων σε κατεψυγμένους, αποψυγμένους και φρέσκους ιστούς (Samsonova, et al., 2012). Στη δοκιμή FFP χρησιμοποιούνται τρία τρυβλία εμβολιασμένα με *Bacillus subtilis* σε διαφορετικές τιμές pH (6, 7.2, 8) και ένα τέταρτο με σπόρους του βακτηρίου *Micrococcus luteus* (Kilinc, et al., 2007).

Μια ακόμη δοκιμασία ευρέος φάσματος είναι η δοκιμή Premi (Premi test), η οποία είναι ειδικά σχεδιασμένη για την ανίχνευση αντιμικροβιακών ενώσεων, όπως τα κατάλοιπα αντιβιοτικών και της σουλφοναμίδης στο κρέας και σε προϊόντα του. Στηρίζεται στην αναστολή της ανάπτυξης του *B.stearothermophilus*, ένα βακτήριο το οποίο είναι πολύ ευαίσθητο σε πολλά αντιβιοτικά και σουλφιδικές (sulpha) ενώσεις. Ένας ορισμένος αριθμός σπορίων εμβολιάζεται σε ένα τρυβλίο με άγαρ και άλλα θρεπτικά συστατικά. Στη δοκιμασία αυτή όταν προστεθεί το δείγμα κρέατος, θερμαίνεται στους 64 °C και τα σπόρια βλαστάνουν. Στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται και παράγουν ένα οξύ όταν δεν υπάρχουν ανασταλτικές ουσίες. Αυτό μπορεί να γίνει ορατό μέσω παρατήρησης αλλαγής χρώματος, με τη βοήθεια ειδικού δείκτη, από μοβ σε κίτρινο. Όταν αντιμικροβιακές ουσίες είναι παρούσες σε επαρκή ποσότητα (μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης), δεν θα παρατηρηθεί ανάπτυξη και το χρώμα θα παραμείνει μοβ. Το Premi test αποτέλεσε μια εύχρηστη μικροβιακή δοκιμή για την ανίχνευση

ευρέως φάσματος αντιβακτηριακών ενώσεων στο κρέας αλλά και σε προϊόντα κρέατος από βοοειδή, χοίρους και κοτόπουλα, δηλαδή χερσαία ζώα. (Kilinc & Cakli, 2008).

## **4.2 Ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

Η ELISA αποτελεί μια τεχνολογία ανίχνευσης με υψηλή ευαισθησία και εξειδίκευση και συνδυάζει τις σύγχρονες μεθόδους ανίχνευσης με την ανοσολογία. Η μέθοδος αυτή έχει τα πλεονεκτήματα της εύκολης λειτουργίας της, της υψηλής απόδοσης και της ισχυρής ειδικότητας, αλλά και του χαμηλού κόστους. Γι' αυτό και χρησιμοποιείται ευρέως για την ανίχνευση υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης (Wang, et al., 2021).

### **4.2.1 Ιστορικά στοιχεία ανοσοδοκιμασιών**

Πριν από την ELISA, προτάθηκε πρώτα η μέθοδος ραδιοανοσοδοκιμασίας από τους Yalow και Berson το 1960, η οποία ήταν η μόνη βιολογική αναλυτική μέθοδος εκείνη τη περίοδο. Στις ραδιοανοσοδοκιμασίες, αντισώματα επισημαίνονται με Ιώδιο 131, ένα στοιχείο ασθενούς ακτινοβολίας, το οποίο όμως θα μπορούσε να προκαλέσει προβλήματα που σχετίζονται με την υγεία και με τα ραδιενεργά απόβλητα. Επομένως, ήταν αναγκαία η αντικατάσταση του ραδιενεργού αυτού στοιχείου με κάποιο μη ραδιενεργό. Αργότερα, το 1966 οι Avrameas και Piece ανέφεραν τη σήμανση αντισωμάτων με ένζυμα, χρησιμοποιώντας τη σχέση αντιγόνου – αντισώματος, κάτι που έλυσε ως ένα βαθμό το παραπάνω πρόβλημα. Ωστόσο, απαραίτητη ήταν και η παρασκευή ενός ανοσοπροσροφητικού υλικού για τη δέσμευση του συμπλόκου αντιγόνου-αντισώματος.

Από το 1967 έως το 1969, οι Nakane και Avrameas συνέβαλαν στην περαιτέρω βελτίωση της διαδικασίας επισήμανσης και πραγματοποίησαν το συνδυασμό ενζύμων με αντιγόνα/αντισώματα μέσω της γλουταραλδεϋδης. Το ένζυμο επισήμανε βιομόρια για την ανίχνευση ενός συμπληρωματικού βιομορίου μέσω του ανοσοφθορισμού. Το 1971, οι Engvall και Perlmann χρησιμοποίησαν για πρώτη φορά ένα αντίσωμα επισημασμένο με ένζυμο μαζί με ένα προσροφητικό υπόστρωμα για την ποσοτική

ανίχνευση IgG αντισωμάτων, κάτι που απέδειξε την επιτυχία της κατασκευής και της εφαρμογής της ELISA στον ανοσοπροσδιορισμό.

Αργότερα το 1980, εφαρμόστηκε η στρατηγική αλληλεπίδρασης βιοτίνης – αβιδίνης στην ανοσοχημεία και στον ανοσοφθορισμό, η οποία διευκόλυνε την ανάπτυξη της BSA – ELISA με την εισαγωγή του συμπλόκου ενζύμων βιοτίνης και στρεπταβιδίνης. Μετά από αυτό, τεχνικές που ομοιάζουν με την στρατηγική της ELISA, όπως ο ανοσοφθορισμός, οι ηλεκτροχημικοί μέθοδοι και αναφορές στη PCR έχουν προταθεί ευρέως για τη δημιουργία εξαγωγής ποσοτικών σημάτων. Το 2012, χρησιμοποιώντας νανοσωματίδια χρυσού (Gold nanoparticle – Au NPs) ως χρωμογόνα για τη παραγωγή διαφόρων χρωματιστών διαλυμάτων, τέθηκε η άφιξη μια νέας εποχής της nano-ELISA (Wu, et al., 2019).

#### **4.2.2. Αρχή μεθόδου**

Για τη διεξαγωγή της μεθόδου απαιτείται τουλάχιστον ένα αντίσωμα με συγκεκριμένη ανοσολογική απάντηση έναντι του αντιγόνου που μας ενδιαφέρει. Η διαδικασία σύνδεσης του αντιγόνου με το στερεό υπόστρωμα μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικές μεθόδους και εξαρτάται από το πρωτόκολλο που εφαρμόζεται. Τα ενδιαφερόμενα μόρια μπορούν να σταθεροποιηθούν σε ένα υπόστρωμα είτε άμεσα με μη ειδική απορρόφηση είτε μέσω ενός άλλου αντισώματος με ειδική σύνδεση.

#### **4.2.3 Αντιδραστήρια – Συστατικά**

Τα κύρια συστατικά που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο ELISA είναι τα ακόλουθα:

- Σταθερή φάση (Solid phase): Αυτή μπορεί να είναι μικροπλάκα 96 φρεατίων φτιαγμένη από πολυστυρένιο, ένα οικονομικό, διαφανές, σχετικά υδρόφιλο υλικό, ιδανικό για την απορρόφηση των πρωτεϊνών.
- Προσροφητικό υλικό: Υπάρχουν διάφοροι τύποι και χρησιμοποιούνται ανάλογα με το πρωτόκολλα ELISA, με κύριους από αυτούς τα αντισώματα που παράγονται σε απόκριση ενός αντιγονικού ερεθίσματος και τα αντιγόνα.
- Διάλυμα πλύσης (Buffer Agent): Μετά τη φόρτωση και την εκκένωση των φρεατίων με συγκεκριμένη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος πλύσης, τα αντιδραστήρια που δεν αντέδρασαν απομακρύνονται. Έτσι στο φρεάτιο της μικροπλάκας παραμένει μόνο ο αναλύτης που μας ενδιαφέρει και έχει αντιδράσει με το υπόστρωμα.

- Διάλυμα μπλοκαρίσματος (Blocking Agent): Προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή επιλεκτικότητα και να αποφευχθεί η μη ειδική σύνδεση, είναι απαραίτητο το βήμα μπλοκαρίσματος, μετά την ακινητοποίηση του πρώτου βιομορίου στην επιφάνεια του φρεατίου.
- Ένζυμα και υποστρώματα: Τα ένζυμα είναι μακρο-βιομοριακοί καταλύτες που επιταχύνουν χημικές αντιδράσεις με άλλους τύπους μορίων γνωστών ως υποστρωμάτων. Κατά την αντίδραση το ένζυμο τροποποιεί χημικά το υπόστρωμα σε ένα μετρήσιμο προϊόν, ώστε να είναι δυνατή η ανάγνωση του παραγόμενου σήματος.
- Διάλυμα διακοπής της αντίδρασης: Η διαδικασία διακοπής πραγματοποιείται με την εισαγωγή ενώσεων στην αντίδραση που αποτρέπουν την οποιαδήποτε περαιτέρω αλλαγή στα αναπτυγμένα χρώματα ως αποτέλεσμα της ενζυμικής αντίδρασης (Hosseini, et al., 2018).

#### **4.2.4. Ένζυμα και υποστρώματα ανίχνευσης κτηνιατρικών καταλοίπων**

Τα ένζυμα που θα χρησιμοποιηθούν πρέπει να χαρακτηρίζονται από υψηλή καθαρότητα, υψηλό ρυθμό μετατροπής, ειδικότητα, υψηλή σταθερότητα καθώς επίσης και καταλυτική ικανότητα μετά τη σύζευξη (Hosseini, et al., 2018). Η ευαισθησία ανίχνευσης εξαρτάται από την ισχύ των παραγόμενων σημάτων κατά τη διάρκεια της αντίδρασης.

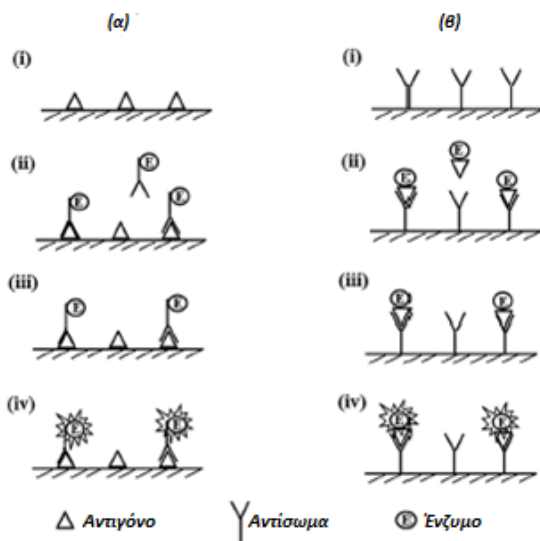
Η κύρια χρησιμοποιούμενη τεχνική για την ταχεία εξέταση καταλοίπων ενός κτηνιατρικού φαρμάκου είναι ο ενζυμικός ανοσολογικός προσδιορισμός στον οποίο η γλυκοζοξειδάση (glucose oxidase), η υπεροξειδάση του χρένου (Horseradish Peroxidase – HRP), η πυροσταφυλική αφυδρογονάση, η αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase – ALP) και η ανασυνδυασμένη β-γαλακτοσιδάση χρησιμοποιούνται ως ένζυμα επισήμανσης. Η χρωματική αντίδραση εμφανίζεται όταν το ένζυμο καταλύει το υπόστρωμα, ενώ η ποσοτική ή ποιοτική ανάλυση πραγματοποιείται σύμφωνα με το βάθος χρώματος του ενζύμου. Τα υποστρώματα για την οξειδάση της γλυκόζης είναι ένας συνδυασμός της HRP και της γλυκόζης, ενώ η τετραμεθυλβενζιδίνη (Tetra-methylbenzidine – TMB) αποτελεί υπόστρωμα για το ένζυμο HRP, το πινιτροφαινυλοφωσφορικό για την ALP και η 4-νιτριφαινυλ-N-ακετυλο-βητα-D-γαλακτοζαμίνη για το ένζυμο β-γαλακτοσιδάση (Ahmed, et al., 2020).

#### 4.2.5 Κατηγορίες ELISA

Οι ενζυματικές μέθοδοι ανοσοδοκιμασίας κατηγοριοποιούνται σε ομογενείς και ετερογενείς. Στις ομογενείς μεθόδους, τα ένζυμα απενεργοποιούνται όταν συνδέονται με το αντίσωμα, και έτσι, απουσιάζει το στάδιο του πλυσίματος. Οι τεχνικές αυτές συνήθως χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση ουσιών σε μικρές ποσότητες, όπως για τον προσδιορισμό φαρμάκων. Ωστόσο, χαρακτηρίζονται από υψηλό κόστος και χαμηλή ευαισθησία. Οι ετερογενείς ενζυματικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται πιο συχνά, διότι χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη ευαισθησία και εφαρμόζονται για την ανίχνευση συγκεκριμένων αντισωμάτων και αντιγόνων. Σε αυτές ανήκει η μέθοδος ELISA, κατηγορίες της οποίας περιγράφονται παρακάτω (Aydin, 2015).

#### Άμεση ELISA

Το 1971, οι Engvall, Perlmann, Schuurs και Weemen ήταν οι πρώτοι που ανέπτυξαν την άμεση ELISA η οποία αποτέλεσε τη βασική μορφή και για άλλους τύπους ELISA. Αρχικά, ένα αντιγόνο ή ένα αντίσωμα ακινητοποιείται στην επιφάνεια πλάκας μικροτιτλοδότησης. Αφού η επιφάνεια μπλοκαριστεί με άλλες πρωτεΐνες (π.χ. αλβουμίνη, ζελατίνη, καζεΐνη ή αποβουτυρωμένο γάλα), για την αποφυγή των μη ειδικών προσροφήσεων άλλων πρωτεϊνών, το αντίστοιχο σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα ή αντιγόνο αντιδράει με τους ακινητοποιημένους στόχους και ακολουθεί η ανάπτυξη χρώματος μετά την αντίδραση του ενζύμου με το κατάλληλο υπόστρωμα (**Εικόνα 7**). Όσο αυξάνεται ο αριθμός των ενδιαφερόμενων στόχων, αυξάνεται και το παραγόμενο σήμα. Η άμεση ELISA είναι κατάλληλη για την ποιοτική ανάλυση μακρομορίων.



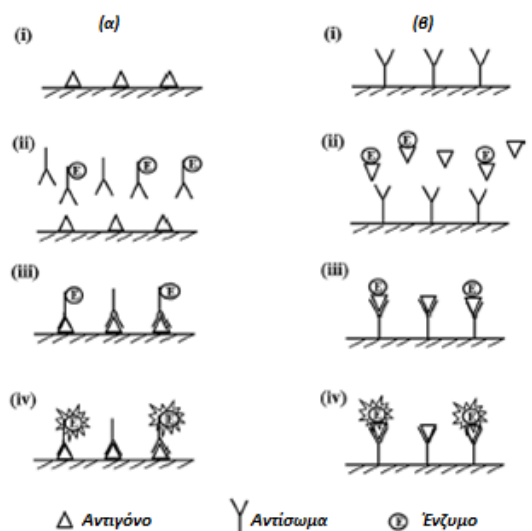
Εικόνα 7. Βήματα Άμεσης ELISA για την ανίχνευση (α) αντιγόνου (β) αντισώματος.

### Ανταγωνιστική ELISA

Το 1973, αναπτύχθηκε η ανταγωνιστική ELISA, για την ανίχνευση της α-φετοπρωτεΐνης αρουραίου, η οποία ώθησε στην ανάπτυξη της έμμεσης ELISA και της sandwich ELISA. Αυτό που συμβαίνει στις ανταγωνιστικού τύπου ELISA είναι η ανταγωνιστική αντίδραση μεταξύ στόχων (αντιγόνου ή αντισώματος) στο δείγμα και ενζυμικά σημασμένων στόχων (αντιγόνων ή αντισωμάτων), έναντι αντίστοιχων ακινητοποιημένων αντισωμάτων ή αντιγόνων (Sakamoto, et al., 2018).

Το βασικό γεγονός που πραγματοποιείται στην ανταγωνιστικού τύπου ELISA, είναι η διαδικασία της ανταγωνιστικής αντίδρασης μεταξύ του αντιγόνου του δείγματος και του αντιγόνου-ιχνηθέτη με το αντίσωμα που είναι δεσμευμένο στα φρεάτια μιας πλάκας μικροτιλοδότησης (Gan & Patel, 2013). Όσο μεγαλύτερη είναι η συγκέντρωση του αντιγόνου στο δείγμα, τόσο μικρότερη είναι η ποσότητα του ιχνηθέτη που συνδέεται με το αντίσωμα (Θεοδωρίδης, 2015). Το σήμα που λαμβάνεται από το προ-συζευγμένο αντίσωμα συσχετίζεται αντιστρόφως με την παρουσία του ενδιαφερόμενου αναλύτη **(Εικόνα 8)** (Hosseini, et al., 2018). Με μια αυξανόμενη ποσότητα αντιγόνου στόχου, το εκπεμπόμενο σήμα μειώνεται. Σε αυτή την περίπτωση, η ανταγωνιστικού τύπου ELISA είναι κατάλληλη για την μέτρηση μακρομορίων μόνο επειδή ένα επισημασμένο ένζυμο απαιτείται για τη μέτρηση του αντιγόνου.

Οι άμεσες και οι ανταγωνιστικού τύπου μέθοδοι ELISA είναι απλές επειδή απαιτείται μόνο ένα αντίσωμα και χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό εξειδίκευσης. Ωστόσο, το στάδιο επισημάνσης απαιτείται για κάθε μία από αυτές τις μεθόδους οδηγώντας πιθανώς σε απενεργοποίηση του αντισώματος (Sakamoto, et al., 2018), καθώς επίσης στα μειονεκτήματα της εντάσσεται και η κατανάλωση μεγάλων ποσοτήτων δειγμάτων (Hosseini, et al., 2018).

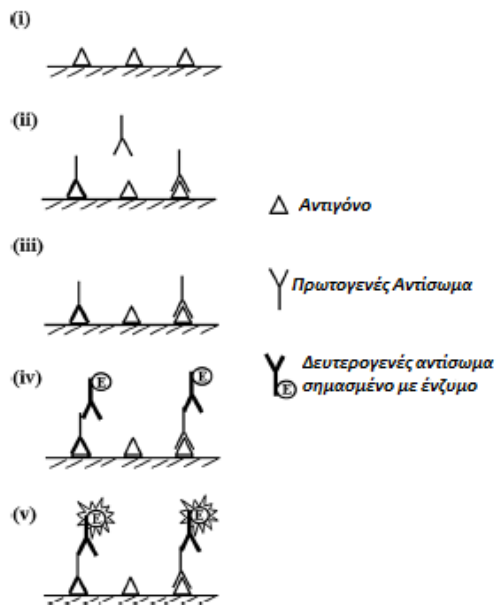


Εικόνα 8. Βήματα ανταγωνιστικής ELISA για την ανίχνευση (α) αντισώματος (β) αντιγόνου.

### Έμμεση ELISA

Η βασική αρχή της έμμεσης ELISA είναι η διπλή σύνδεση, αυτή του πρωτογενούς αντισώματος και του σημασμένου με ένζυμο δευτερογενούς αντισώματος. Αυτό σημαίνει ότι το αντιγόνο στόχος ανιχνεύεται έμμεσα από το δευτερογενές αντίσωμα. Το αντιγόνο είναι ακινητοποιημένο στην επιφάνεια την πλάκας μικροτιτλοδότησης, η οποία μπλοκάρει από πρωτεΐνες όπως αναφέρεται παραπάνω. Ακολουθεί η πρωτογενής σύνδεση του αντισώματος στο ακινητοποιημένο αντιγόνο και στη συνέχεια αφήνεται να αντιδράσει με το δευτερογενές σημασμένο με ένζυμο αντίσωμα ώστε να επέλθει η αλλαγή χρώματος. Το σήμα αυξάνεται με την αύξηση του ακινητοποιημένου αντιγόνου στόχου (**Εικόνα 9**). Η έμμεση ELISA είναι κατάλληλη για τη μέτρηση μακρομορίων.





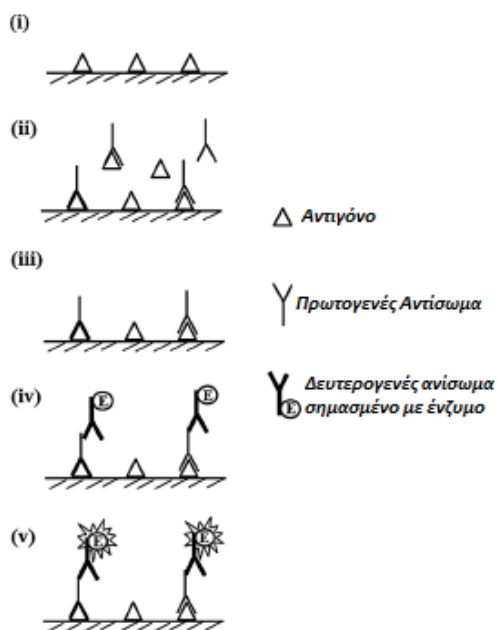
Εικόνα 9. Βήματα Έμμεσης ELISA.

### Έμμεση ELISA ανταγωνιστικού τύπου

Η έμμεση ELISA ανταγωνιστικού τύπου (Indirect competitive ELISA – icELISA) αφορά τον συνδυασμό της έμμεσης και της ανταγωνιστικής ELISA. Σε αυτή τη μέθοδο, το αντιγόνο στόχος ακινητοποιείται σε μια στερεή φάση στην πλάκα μικροτιτλοδότησης και ακολουθεί το στάδιο του μπλοκαρίσματος. Έπειτα, ένα «ελεύθερο» αντιγόνο-στόχος και ένα αντίσωμα επωάζονται ώστε να επιτευχθεί ο ανταγωνισμός μεταξύ του ακινητοποιημένου και του ελεύθερου αντιγόνου έναντι των αντισωμάτων. Το πρωτογενές αντίσωμα που συνδέεται με το ακινητοποιημένο αντιγόνο ανιχνεύεται από το δευτερογενές αντίσωμα το οποίο έχει σημασθεί με ένα ένζυμο. Ομοίως με την ανταγωνιστική ELISA, στην icELISA το σήμα μειώνεται όταν αυξάνεται η ποσότητα του ελεύθερου αντιγόνου (**Εικόνα 10**). Η ic-ELISA μπορεί να εφαρμοστεί για τη μέτρηση μακρομορίων και απτενίων, όταν τα δεύτερα εκτίθεται στην επιφάνεια της πλάκας.

Η χρήση δευτερογενών αντισωμάτων σημασμένων με ένζυμο σε έμμεσες μεθόδους παρουσιάζει πλεονεκτήματα συγκριτικά με τις άμεσες, όσο αφορά την ευαισθησία και την ευελιξία. Τα πολυκλωνικά αντισώματα είναι ένας τύπος δευτερογενών επισημασμένων με ένζυμο αντισωμάτων που αναγνωρίζει διαφορετικούς επιτόπους του πρωτογενούς αντισώματος, κάτι που δικαιολογεί την αυξημένη ευαισθησία των έμμεσων μεθόδων. Ωστόσο, η έμμεση ELISA εμφανίζει και

μειονεκτήματα λόγω της χρήσης του δευτερογενούς αντισώματος, όπως η πιθανότητα διασταυρούμενης αντίδρασης.

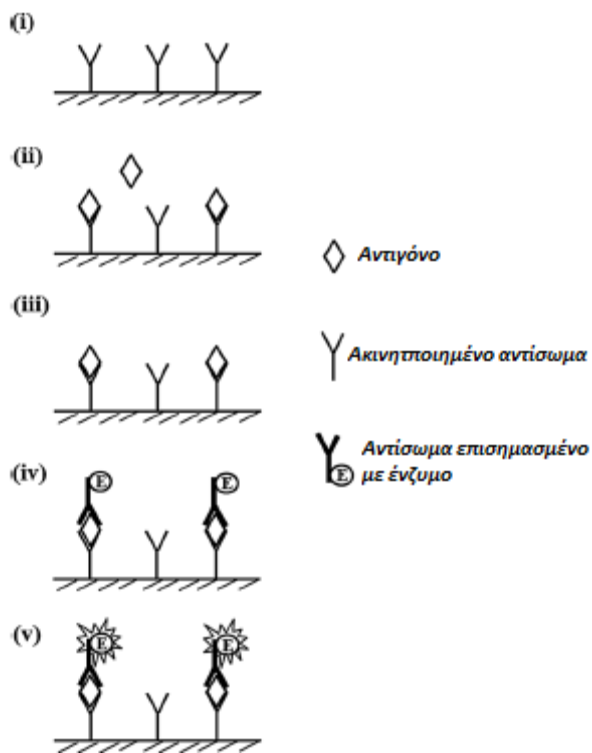


Εικόνα 10. Βήματα Έμμεσης ELISA ανταγωνιστικού τύπου.

### Sandwich ELISA

Στη μέθοδο Sandwich ELISA , το αντιγόνο στόχος ανιχνεύεται μέσω της πρόσδεσης του μεταξύ δύο αντισωμάτων, τα οποία αναγνωρίζουν διαφορετικούς επιτόπους. Αρχικά πραγματοποιείται η ακινητοποίηση του ενός αντισώματος στην πλάκα μικροτιτλοδότησης και στη συνέχεια με το στάδιο του μπλοκαρίσματος εμποδίζονται οι μη ειδικές συνδέσεις άλλων πρωτεϊνών, ενώ το αντιγόνο του δείγματος αντιδρά με το ακινητοποιημένο αντίσωμα. Τέλος, γίνεται η σύνδεση με το επισημασμένο με ένζυμο αντίσωμα και επέρχεται η ανάπτυξη χρώματος (**Εικόνα 11**).

Αυτή η άμεση μέθοδος μπορεί να τροποποιηθεί σε έμμεση με τη χρήση πρωτογενούς και ενζυμικά επισημασμένου δευτερογενούς αντισώματος. Το παραγόμενο σήμα αυξάνεται, καθώς αυξάνεται και η ποσότητα του αντιγόνου στο δείγμα. Και με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατή η ανίχνευση μακρομορίων, με μερικές εξαιρέσεις. Ωστόσο, μειονεκτεί ως μέθοδος διότι είναι αρκετά δαπανηρή και απαιτητική για την προετοιμασία δύο αντισωμάτων, αλλά και επειδή απαιτεί αυξημένο χρόνο ανάλυσης (Sakamoto, et al., 2018). Η μέθοδος ELISA sandwich έχει αναφερθεί ότι είναι δύο έως πέντε φορές πιο ευαίσθητη από όλες τις άλλες ELISA (Aydin, 2015).



Εικόνα 11. Βήματα Sandwich ELISA.

#### 4.2.6 Εφαρμογές στα τρόφιμα

Τα περισσότερα χημικά συστατικά είναι γνωστό ότι είναι μικρές ενώσεις με μοριακό βάρος μικρότερο των 1000 Da και συνήθως διαθέτουν μόνο ένα αντιγονικό επίτοπο, γι' αυτό και ανιχνεύονται χρησιμοποιώντας την ανταγωνιστικού τύπου ELISA (Competitive ELISA – Cr-ELISA) (Xiong, et al., 2020) και την Sandwich ELISA (Ahmed, et al., 2020). Η Cr-ELISA εφαρμόστηκε για την ανίχνευση φλουροκινολόνης με τη χρήση συζεύγματος αλβουμίνης βόειου ορού και ειδικού πολυκλωνικού αντισώματος, ενώ η ανίχνευση της χλωραμφαινικόλης και της τετρακυκλίνης στηρίχθηκε στη χρήση συγκεκριμένου μονοκλωνικού αντισώματος.

Η μέθοδος ELISA έχει χρησιμοποιηθεί επίσης για την πολλαπλή ανάλυση καταλοίπων αντιβιοτικών σε διαφορετικές μήτρες τροφίμων. Αυτό επιτεύχθηκε με την ανάπτυξη μιας νέας χρωματομετρικής και διπλής-χρωματομετρικής ELISA για την ταυτόχρονη αυτή ανίχνευση, συγκεκριμένα για κατάλοιπα φλουροκινολόνης και σουλφοναμίδης. Η έμμεση ανταγωνιστική ELISA έχει αναπτυχθεί για τον έλεγχο υπολειμμάτων σουλφοναμίδης και σε συνδυασμό με τα απαιτούμενα αντιδραστήρια εφαρμόστηκε με επιτυχία για την ανίχνευση συγκεκριμένων κατηγοριών

σουλφοναμιδίων σε δείγματα ζωοτροφών και τροφίμων όπως στο γάλα, στα αυγά και στο μέλι.

Η ευαισθησία της μεθόδου ELISA αυξήθηκε με την προσθήκη του συστήματος βιοτίνης-στρεπταβιδίνης (Biotin-streptavidin ELISA – BA-ELISA). Αυτό το σύστημα βασίζεται στην ισχυρή συγγένεια και την υψηλή ειδικότητα μεταξύ της βιοτίνης και της στρεπταβιδίνης για τη διευκόλυνση περισσότερων μορίων του ενζύμου να καταλύσουν το υπόστρωμα. Έχει αναφερθεί η καθιέρωση μιας ευαίσθητης μεθόδου BA-ELISA για τον προσδιορισμό τετρακυκλίνης, χλωραμφαινικόλης και λινκοσαμίδης.

Μια ακόμη μέθοδος ELISA έχει αναπτυχθεί για την ανίχνευση πενικιλίνης σε δείγματα γάλακτος. Αυτή η ανάλυση βασίζεται στις ανοιχτές δακτυλιωμένες μορφές της πενικιλίνης που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με υβριδικά μαγνητικά σωματίδια, τα οποία επιτρέπουν την ανίχνευση δύο τύπων πενικιλίνης ταυτόχρονα. Επιπλέον έχει δημιουργηθεί ένα πρωτόκολλο για μια ειδική και ευαίσθητη ELISA, για την ανίχνευση υπολειμμάτων 1-αμινο-υδαντοΐνης σε δείγματα ψαριών, γαρίδων, χοιρινού κρέατος και δείγματα κοτόπουλου, με τη προετοιμασία ενός ειδικού αντισώματος, το οποίο παρασκευάστηκε με βάση τη γνώση του μονοκλωνικού αντισώματος κατά της 1-αμινο-υδαντοΐνης. Η αναπτυγμένη μέθοδος ήταν γρήγορη, απλή και ακριβής για την ανίχνευση υπολειμμάτων σε βρώσιμους ζωικούς ιστούς.

Σε μια άλλη μελέτη, ένα άλλο πρωτόκολλο ELISA εφαρμόστηκε για τον έλεγχο ύπαρξης υπολειμμάτων απαγορευμένων αντιβακτηριακών φαρμάκων σε δείγματα ζωοτροφών. Αυτή η ανάλυση βασίστηκε στην ποιοτική ανάλυση της βακιτρακίνης και της βιργινιαμυκίνης και έχει προταθεί ως μέθοδος διαλογής για χρήση σε αναλύσεις ρουτίνας. Ομοίως, εφαρμόζεται για τον έλεγχο της παράνομης χρήσης αντιβιοτικών σε δείγματα υδατοκαλλιέργειας και ζωοτροφών.

Επιπροσθέτως, τα αντιβιοτικά μπορούν να ανιχνευθούν μέσω της ανταγωνιστικής ELISA, όπως έχει παρουσιαστεί παραπάνω, η οποία έχει εφαρμοστεί για την ανίχνευση της β-λακτάμης σε πολλά δείγματα τροφίμων. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αρχή της άμεσης ανταγωνιστικής πρωτεϊνικής δραστηριότητας από την αμπικιλίνη και την ελεύθερη β-λακτάμη. Η τεχνική της χημειοφωταύγειας σε συνδυασμό με την ELISA, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση καταλοίπων αντιβιοτικών. Η έμμεση

χημειοφωταύγεια μαζί με την ELISA (Chemiluminescent enzyme-linked immunoassay – CL-ELISA) εφαρμόστηκε ως μέθοδος διαλογής για την ανίχνευση χλωραμφαινικόλης σε δείγματα γάλατος και μυών κοτόπουλων (Ahmed, et al., 2020).

#### **4.2.7. Ανάπτυξη nano-ELISA**

Για τη βελτίωση της απόδοσης της παραδοσιακής μεθόδου ELISA, έχουν καταβληθεί μεγάλες προσπάθειες για την ενίσχυση της σταθερότητας, της ευαισθησίας και του εύρους ανίχνευσης. Με την εισαγωγή των νανοϋλικών, η απόδοση της παραδοσιακής ELISA έχει προοδεύσει σε μεγάλο βαθμό, γεγονός που την καθιστά διαθέσιμη στην έρευνα και σε διάφορες εφαρμογές. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται νανο-ίνες, MIPs και μαγνητικά νανο-σφαιρίδια για την τροποποίηση του προσροφητικού υποστρώματος της ELISA. Για τη βελτίωση των στοιχείων αναγνώρισης, τα νανοϋλικά και τα απταμερή αποτελούν υποκατάστατα για την ELISA. Λόγω της δράσης υπεροξειδάσης που έχουν, τα νανο-φύλλα CuS, τα νανοσωματίδια CeO<sub>2</sub>, το οξείδιο γραφενίου και τα σύμπλοκα Au-Pt και SiO<sub>2</sub>, γνωστά ως μιμητές υπεροξειδάσης χρησιμοποιούνται ευρέως ως ένζυμα επισήμανσης. Επίσης, τα μεταλλικά νανοσωματίδια (ασήμι ή χρυσός) και οι πολύχρωμοι παράγοντες μπορούν να δράσουν ως χρωμογόνα αντιδραστήρια στην ELISA (Wu, et al., 2019).

Η 19-νορτεστερόνη (19-NT) είναι ένα συνθετικό στεροειδές αναβολικό που είναι ευρέως διαδεδομένο και χρησιμοποιείται ως θεραπευτικός παράγοντας στην αναιμία, στην οστεοπόρωση και σε πρωτεϊνικής ανεπάρκειας ασθένειες. Σύμφωνα με μια μελέτη, η χρήση βιοσυζεύγματος νανοσωματιδίων χρυσού και σημασμένων με ένζυμο αντισωμάτων έχει αυξήσει την ευαισθησία της παραδοσιακής ELISA για την ανίχνευση καταλοίπων 19-NT σε ζωικούς ιστούς, κατά 10 φορές. Η μελέτη αυτή εφαρμόστηκε με επιτυχία για την ανίχνευση υπολειμμάτων 19-NT σε δείγματα βοδινού κρέατος (Peng, et al., 2014). Η ίδια μέθοδος nano-ELISA αναπτύχθηκε και εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό σουλφαδιμεθοξίνης (SDM) σε ιστούς συκωτιού κοτόπουλου (Peng, et al., 2013).

#### **4.3. Βιοαισθητήρες (Biosensors)**

Οι παραδοσιακές προσεγγίσεις, όπως οι μικροβιολογικές και οι ανοσολογικές μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως. Αν και οι μικροβιολογικές είναι απλές, γρήγορες και με

χαμηλό κόστος μειονεκτούν ως προς την ευαισθησία και την ειδικότητα. Οι σύγχρονες προσεγγίσεις βασίζονται σε νέες τεχνολογίες και στοιχεία αναγνώρισης. Για την αντιμετώπιση αυτών των περιορισμών έγιναν τεράστιες προσπάθειες για την ανάπτυξη γρήγορων, οικονομικών, ευαίσθητων και επιλεκτικών βιοαισθητήρων για την ανίχνευση καταλοίπων αντιβιοτικών (Majdinasab, et al., 2020). Οι βιοαισθητήρες είναι ένας νέος τύπος αναλυτικών οργάνων, ικανών να ανιχνεύσουν υπολείμματα σε τρόφιμα και προσφέρουν τη δυνατότητα ποσοτικής και υψηλής απόδοσης ανάλυσης, χωρίς την απαίτηση για χειρισμό τους από ειδικούς χρήστες (Chen, et al., 2017). Η χρήση των βιοαισθητήρων στον τομέα ελέγχου των τροφίμων άρχισε να εμφανίζεται στη βιβλιογραφία περίπου το 1980, ενώ οι πρώτες δημοσιεύσεις για την ανίχνευση καταλοίπων αντιβιοτικών φαρμάκων έγιναν από το 1980 έως το 1990 (Gaudin, 2017).

Οι βιοαισθητήρες αφορούν τρία μεγάλα μέρη στην ανάλυση τροφίμων: την ασφάλεια, την ποιότητα και την αυθεντικότητα. Ο έλεγχος της ασφάλειας των τροφίμων εστιάζει στην ανίχνευση ανεπιθύμητων ρύπων στα τρόφιμα, όπως υπολείμματα φυτοφαρμάκων και αντιβιοτικών, αλλεργιογόνων, βιολογικών τοξινών και παθογόνους μικροοργανισμούς. Η ανάλυση αυθεντικότητας έχει ως σκοπό την επιδίωξη της επιβεβαίωσης της προέλευσης των τροφίμων (Bunney, et al., 2017).

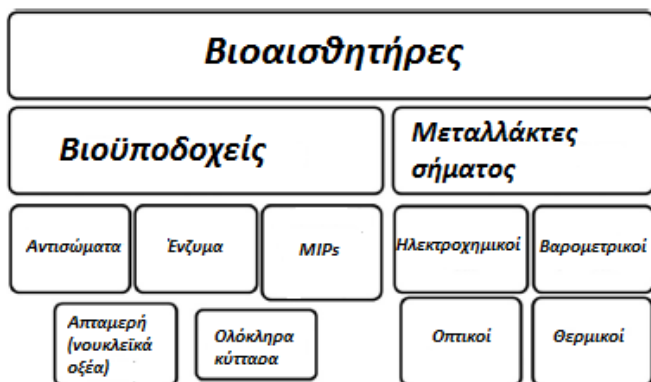
#### **4.3.1. Οργανολογία και αρχή μεθόδου**

Οι βιοαισθητήρες απαρτίζονται από τρία στοιχεία: ένα στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης, ένα μεταλλάκτη σήματος (transducer) και μια συσκευή καταγραφής δεδομένων. Το στοιχείο αναγνώρισης που βασίζεται σε βιομόρια αλληλοεπιδρά με ένα συγκεκριμένο αναλύτη, σε κοντινή απόσταση με κάποιον μεταλλάκτη σήματος ο οποίος είναι ικανός να μετατρέψει το σήμα που ανιχνεύθηκε από το στοιχείο αναγνώρισης σε μετρήσιμο ηλεκτρικό, θερμικό, οπτικό ή βαρομετρικό σήμα. (Chen, et al., 2017).

#### **4.3.2. Ταξινόμηση βιοαισθητήρων**

Οι βιοαισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν είτε με βάση τον τύπο του βιοϋποδοχέα, είτε με βάση τον τύπο του μεταλλάκτη σήματος. Διαφορετικοί τύποι βιοϋποδοχέων μπορούν να ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια των βιοαισθητήρων (Gaudin, 2017). Για παράδειγμα βιοαισθητήρια όργανα αποτελούν διάφορα ένζυμα, αντισώματα, απταμερή, μικροβιακά κύτταρα και MIPs, με τα ένζυμα και τα αντισώματα να είναι τα κύρια χρησιμοποιούμενα στοιχεία για την ανίχνευση καταλοίπων αντιβιοτικών ουσιών

(Majdinasab, et al., 2020). Σύμφωνα με τη μεταγωγή σήματος οι βιοαισθητήρες διαιρούνται σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, θερμικούς και βαρυμετρικούς (**Εικόνα 12**) (Gaudin, 2017). Όπως έχει αποδειχθεί από τις πρόσφατες αναφορές που έχουν γίνει, οι ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος έχουν εστιάσει στην ασφάλεια των τροφίμων, παρά την ποιότητα και την εγκυρότητα της ανάλυσης (Mishra, et al., 2018)



Εικόνα 12.Κατηγορίες βιοαισθητήρων.

#### 4.3.3. Κατηγορίες Βιοϋποδοχέων

Οι κατηγορίες των βιοϋποδοχέων περιγράφονται συνοπτικά παρακάτω (**Εικόνα 13**).

##### Αντισώματα

Τα αντισώματα είναι ένα κοινός τύπος βιοϋποδοχέων που χρησιμοποιείται στις ανοσοδοκιμασίες, για τον διαχωρισμό του επιθυμητού αναλύτη από μια σύνθετη μήτρα δείγματος, μέσω ειδικής σύνδεσης. Οι σταθερές περιοχές σύνδεσης των αντισωμάτων τα καθιστούν αναντικατάστατα σε πολλές καθιερωμένες δοκιμασίες, καθώς και στην ανάπτυξη νέων στρατηγικών ανίχνευσης (Griesche & Baeumner, 2020).

Τα μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα χρησιμοποιούνται ως στοιχεία αναγνώρισης για τον έλεγχο αντιβιοτικών, λόγω της υψηλής ειδικότητας και επιλεκτικότητάς τους. Οι ανοσοσφαιρίνες IgG έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση αντιβιοτικών όπως η οξυτετρακυκλίνη, η σουλφοναμίδη, η ενροφλοξακίνη, οι κινολόνες κ.α. Η συγγένεια είναι ένας βασικός παράγοντας για το αντίσωμα που επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό την ευαισθησία του βιοαισθητήρα. Τα ανασυνδυασμένα αντισώματα αποτελούν ένα μονοπάτι για τη βελτίωση της συγγένειας του αντισώματος. Πιο συγκεκριμένα, τα ανασυνδυασμένα αντισώματα είναι διαφορετικά είδη γενετικά τροποποιημένων αντισωμάτων που περιέχουν μικρά θραύσματα της δομής του

αντισώματος όπως θραύσματα της περιοχής σύνδεσης με το αντιγόνο (Fab περιοχή) και θραύσματα της μονής μεταβλητής αλυσίδας (single chain variable fragments – scFvs). Τα scFvs αποτελούν ένα κοινό ανασυνδυασμό, ο οποίος προκύπτει από τη σύντηξη της βαριάς αλυσίδας και της μεταβλητής αλυσίδας ενός αντισώματος με ένα συνδετικό πεπτίδιο. Για παράδειγμα έχει αναφερθεί η ανάπτυξη ενός scFv, το οποίο μπορεί να αναγνωρίσει το αντιβιοτικό νορφλοξασίνης με μεγάλη χημική συγγένεια.

Ωστόσο, οι βιοαισθητήρες με βάση τα αντισώματα μπορεί να προκαλέσουν διασταυρούμενες αντιδράσεις με άλλα αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα την ανακριβή ποσοτικοποίηση (Majdinasab, et al., 2020). Οι ανοσοαισθητήρες αυτοί περιγράφονται συχνά σε συνδυασμό με πιεζοηλεκτρικά στοιχεία μεταγωγής σήματος, αλλά και με ηλεκτροχημικά και οπτικά. Σήμερα, τα αντισώματα χρησιμοποιούνται πιο συχνά ως βιοϋποδοχείς για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων σε πολλούς τομείς της ανάλυσης, ιδιαίτερα για τον έλεγχο των αντιβιοτικών. Τα αντισώματα κατά των αντιβιοτικών και άλλων κτηνιατρικών φαρμάκων είναι τώρα εμπορικά διαθέσιμα (Gaudin, 2017).

## **Ένζυμα**

Αν και τα ένζυμα αποτελούν στοιχεία βιοαναγνώρισης, χρησιμοποιούνται κυρίως ως δείκτες. Οι βιοαισθητήρες που στηρίζονται σε ένζυμα βασίζονται κυρίως σε δύο μηχανισμούς. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την καταλυτική μετατροπή ενός αναλύτη από το ένζυμο, δηλαδή από μια μη ανιχνεύσιμη σε μια ανιχνεύσιμη μορφή. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την ανίχνευση αναλυτών οι οποίοι αναστέλλουν ή μετριάζουν τη δραστηριότητα του ενζύμου. Οι ενζυματικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν συγκεκριμένα ένζυμα για τη δέσμευση και την καταλυτική παραγωγή του προϊόντος, το οποίο στη συνέχεια προσδιορίζεται άμεσα με τη χρήση του μεταλλάκτη σήματος (π.χ. ηλεκτροχημικός, οπτικός).

Όσον αφορά την ανάλυση των προσμίξεων, ενζυματικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται για την ανάλυση ζιζανιοκτόνων, με λιγότερες εφαρμογές να αναφέρονται στα αντιβιοτικά. Έχει αναπτυχθεί ένας βιοαισθητήρας ενζύμου για την ανίχνευση της πενικιλίνης. Η πενικιλινάση παράγεται από μετασηματισμένα βακτήρια τα οποία είναι ακινητοποιημένα σε ένα ηλεκτρόδιο ενός μετρητή pH. Ωστόσο, αυτός ο



βιοαισθητήρας δεν έχει εφαρμοστεί σε δείγματα τροφίμων που είναι περίπλοκα (Gaudin, 2017).

### **Ολόκληρα κύτταρα (Whole-cells)**

Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούν την απόκριση ολόκληρων κυττάρων για την ανίχνευση βιολογικά ενεργών παραγόντων. Οι βιοαισθητήρες ολόκληρων κυττάρων (Whole-cell biosensors) εντάσσουν τα ζωντανά κύτταρα ως στοιχεία μοριακής αναγνώρισης, και το συγκεκριμένο σήμα μπορεί να μετατραπεί σε ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα. Οι μονοκύτταροι μικροοργανισμοί, και ιδιαίτερα τα βακτήρια, είναι κατάλληλα για την κατασκευή αυτών των βιοαισθητήρων, λόγω των μεγάλων πληθυσμών τους, του χαμηλού κόστους και της εύκολης συντήρησής τους. Έρευνες έχουν δείξει ότι μόνο ένας περιορισμένος αριθμός βακτηρίων μπορεί να χρησιμοποιηθεί, όπως η *Escherichia coli* και η *Pseudomonas putida*. Οι κυτταρικοί βιοαισθητήρες έχουν αποδειχθεί εξαιρετικά εργαλεία και μπορούν να ελέγξουν πολλές διαφορετικές ενώσεις.

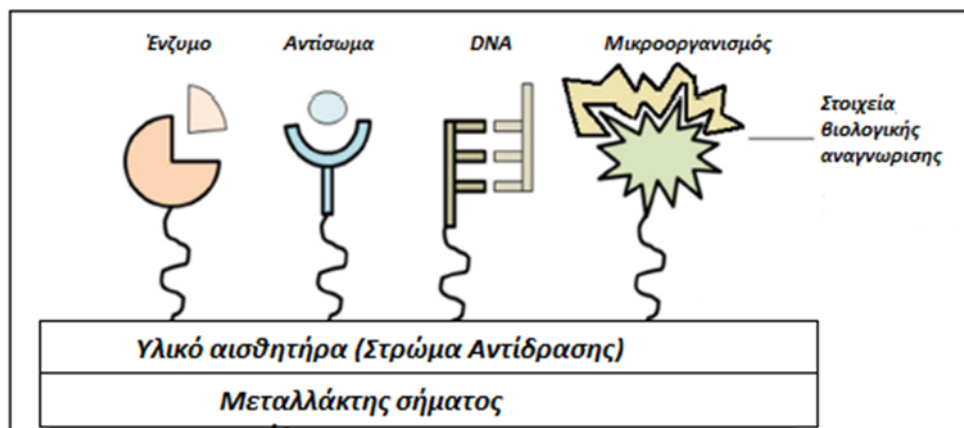
Το βασικό χαρακτηριστικό των μελλοντικών κατασκευών βιοαισθητήρων ολόκληρων κυττάρων είναι να βρεθούν γονίδια που τα αντιβιοτικά μπορούν να προκαλέσουν την έκφρασή τους. Πολλοί βιοαισθητήρες έχουν κατασκευαστεί για την ανίχνευση αντιβιοτικών υπολειμμάτων σε τροφές που προέρχονται από ζώα, αλλά υπάρχουν ακόμα κάποια πιθανά γονίδια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή τους (Chen, et al., 2017). Πιο συγκεκριμένα έχουν αναπτυχθεί βιοαισθητήρες για την ανίχνευση καταλοίπων τετρακυκλινών, β-λακταμών, κινολονών και χλωραμφαινικόλης. Πιο πρόσφατες κατασκευές έχουν επιτρέψει την ανίχνευση πολλαπλών αναλυτών μέσα σε τριάντα λεπτά έως τρεις ώρες (Gaudin, 2017).

### **Απταμερή και MIPs**

Ένας υποδοχέας ο οποίος έχει σχεδιαστεί για να μιμείται έναν βιοϋποδοχέα ονομάζεται βιομιμητικός υποδοχέας, για παράδειγμα τα απταμερή και τα MIPs. Οι βιομιμητικοί αισθητήρες είναι μια πολλά υποσχόμενη κατηγορία συνθετικών υποδοχέων, ειδικά, για την ανίχνευση καταλοίπων αντιβιοτικών (Gaudin, 2017).

Τα απταμερή αποτελούν μια πολύ γνωστή εναλλακτική κατηγορία στοιχείων βιοαναγνώρισης στην επιστημονική κοινότητα από τη δεκαετία του 2000. Το αυξανόμενο ενδιαφέρον βασίζεται στο τρόπο παραγωγής τους, ο οποίος δε στηρίζεται σε ζώα ή

κύτταρα, και στο μεγάλο ρυθμό παραγωγής. Τα στοιχεία αυτά καθίστανται ανέξοδα για την κατασκευή τους σε σύγκριση με τα αντισώματα. Επιπλέον, τα απταμερή έχουν παρατεταμένο χρόνο ζωής, είναι σταθερά υπό μη φυσιολογικές συνθήκες και μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν ώστε να βελτιωθεί η λειτουργικότητά τους. Ειδικά για την ανίχνευση μικρών μορίων τα απταμερή πλεονεκτούν σε σχέση με τα αντισώματα και χρησιμοποιούνται σε δοκιμές ανίχνευσης μικροοργανισμών, κτηνιατρικών φαρμάκων και φυτοφαρμάκων (Griesche & Baeumner, 2020). Όσον αφορά την εφαρμογή των MIPs, αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί τόσο σε οπτικούς όσο και σε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες για την ανίχνευση διαφορετικών αντιβιοτικών σε δείγματα τροφίμων (Majdinasab, et al., 2020).



Εικόνα 13. Κατηγορίες βιοϋποδοχέων (Khansili, et al., 2018).

#### 4.3.4 Κατηγορίες μεταλλακτών σήματος

##### Οπτικοί μεταλλάκτες σήματος

Οι οπτικοί βιοπροσδιορισμοί χρησιμοποιούνται εκτενώς για την ανίχνευση αντιβιοτικών λόγω της ευαισθησίας και της ειδικότητάς τους. Βασίζονται στην αλλαγή των οπτικών χαρακτηριστικών όταν ο αναλύτης στόχος συνδεθεί ειδικά με τον βιοϋποδοχέα. Σε αυτήν την περίπτωση, το παραγόμενο φως μετريέται ως σήμα ανίχνευσης. Οι οπτικές τεχνικές χωρίζονται σε διάφορες ομάδες, οι οποίες βασίζονται σε διαφορετικές οπτικές αρχές. Οι πιο κοινές τεχνικές που χρησιμοποιούν οπτικούς μεταλλάκτες σήματος είναι οι χρωματομετρικές, ο φθορισμός και η χημειοφωταύγεια (Majdinasab, et al., 2020).

##### Βαρομετρικοί μεταλλάκτες σήματος

Οι βαρομετρικοί μεταλλάκτες σήματος (Mass-sensitive biosensors) αξιολογούν τη συγκέντρωση του αναλύτη στόχου μετρώντας τις αλλαγές στην ιδιότητα που σχετίζεται με τη μάζα που δεσμεύεται στην ευαίσθητη επιφάνεια του. Οι βαρομετρικοί βιοαισθητήρες επιτρέπουν την ανίχνευση χωρίς την χρήση ιχνηθέτη. Χρησιμοποιούν κυρίως πιεζοηλεκτρικά κρύσταλλα ως μεταλλάκτες, όπως ο χαλαζίας, οι οποίοι όταν διεγερθούν μηχανικά παράγουν τάση, δηλαδή ηλεκτρικό σήμα. Οι μέθοδοι με μηχανική μεταγωγή εξαρτώνται από την παραγωγή και την ανίχνευση μηχανικών και ακουστικών κυμάτων. Επομένως, οι πιεζοηλεκτρικοί κρύσταλλοι βασίζονται σε αισθητήρες γνωστούς ως αισθητήρες ακουστικών κυμάτων. Ένας πιεζοηλεκτρικός ανοσοαισθητήρας έχει αναπτυχθεί για την ανάπτυξη της πενικιλίνης και της αμπικιλλίνης σε δείγματα γάλατος και κρέατος (Kharewal, et al., 2020).

### **Θερμικοί μεταλλάκτες σήματος**

Οι θερμικοί βιοαισθητήρες καθιστούν δυνατό τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης ενός υποστρώματος από την αλλαγή της ενέργειας, δηλαδή την παραγωγή ή την απορρόφησή της, η οποία σχετίζεται με μια βιοχημική αντίδραση. Η απελευθερωμένη ή απορροφώμενη ενέργεια είναι ανάλογη με τον αριθμό των μορίων που παράγονται κατά την βιοχημική αντίδραση. Σε αυτούς τους βιοαισθητήρες, οι μεταλλάκτες σήματος είναι θερμοζεύγη, θερμόμετρα αντίστασης ή συσκευές τύπου thermopile (σειρά διαφόρων θερμοστοιχείων σε συνδυασμό). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι θερμικοί βιοαισθητήρες είναι ενζυμικοί βιοαισθητήρες, και μπορούν να αναπτυχθούν για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλαπλών αναλυτών. Για τον σκοπό αυτό, η χρησιμοποιούμενη στήλη μπορεί να χωριστεί σε διαφορετικές περιοχές. Σε κάθε περιοχή βρίσκεται ακινητοποιημένο ένα συγκεκριμένο ένζυμο για την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου αναλύτη. Μια συνδυασμένη ανοσοδοκιμασία θερμικού βιοαισθητήρα ονομάζεται «θερμομετρική ELISA – TELIS» (Gaudin, 2017).

### **Ηλεκτροχημικοί μεταλλάκτες σήματος**

Μεταξύ των διαφόρων αναφερόμενων βιοαισθητήρων, οι ηλεκτροχημικοί είναι πολύ δημοφιλείς και χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω της κατανοητής βιο-αλληλεπίδρασής τους και της διαδικασίας ανίχνευσης τους. Η ανάγκη για εξαιρετικά ευαίσθητες, ειδικές και γρήγορες αναλύσεις, παράλληλα και για ακρίβεια στις αναλυτικές μετρήσεις ώθησε

στην ανάπτυξη ενός πεδίου βασιζόμενο σε ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες και αποτέλεσε ένα νέο εργαλείο ανίχνευσης συστατικών των τροφίμων (Mishra, et al., 2018). Το πρώτο άρθρο για την ανάπτυξη ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση αντιβιοτικών καταλοίπων, συγκεκριμένα της αμφοτερικίνης Β και της νυστατίνης, δημοσιεύτηκε το 1979 (Gaudin, 2017). Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες μετατρέπουν βιοχημικά στοιχεία, όπως η συγκέντρωση του αναλύτη, σε ένα σήμα όπως ρεύμα ή τάση. Αυτοί οι τύποι χρησιμοποιούνται συχνά καθώς οι χημικές αντιδράσεις μπορεί να οδηγήσουν σε αλλαγές στη μέτρηση των ηλεκτρονίων ή των ιόντων, που επηρεάζουν ηλεκτρικές παραμέτρους στα διαλύματα. (Majdinasab, et al., 2020). Διαφορετικές ηλεκτροχημικές προσεγγίσεις χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση αντιβιοτικών, όπως η πενικιλίνη, για παράδειγμα οι παρακάτω:

- Ποτενσιομετρική μέθοδος (μέτρηση δυναμικού ή αλλαγή στο pH)
- Αμπερομετρική μέθοδος (μέτρηση ρεύματος)
- Αισθητήρες αντίστασης (μέτρηση αντίστασης) (Kharewal, et al., 2020).

#### **4.3.5. Εφαρμογές**

Το είδος των βιοαισθητήρων που θα εφαρμόζεται θα πρέπει να επιλέγεται με βάση τα χαρακτηριστικά των καταλοίπων και των αισθητήρων. Παραδείγματα εφαρμογών τους αναφέρονται παρακάτω.

Ένας βακτηριακός βιοαισθητήρας φωταύγειας αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών σε δείγματα πουλερικών μυών,. Προτάθηκε ένας οπτικός βιοαισθητήρας για τον έλεγχο υπολειμμάτων αντιβιοτικών αμφενικόλης σε νεφρικά δείγματα βοοειδών, αιγοπροβάτων και χοίρων. Επιπλέον, ένας αμπερομετρικός μαγνητοαισθητήρας προτάθηκε για την ανίχνευση της β-λακτάμης στο γάλα. Μια ερευνητική ομάδα ανίχνευσε σουλφοναμίδη και τετρακυκλίνη με ηλεκτροχημικούς ανοσοαισθητήρες, και τετρακυκλίνες με τη χρήση ενός αμπερομετρικού μαγνητο-ανοσοαισθητήρα σε δείγματα γάλατος (Li, et al., 2020). Αναφορικά με τα φυτοφάρμακα, για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων και καρβαμιδικών ενώσεων (carbamates), υπάρχουν καθιερωμένες αρχές που εφαρμόζονται ευρέως και χρησιμοποιούν την ακετυλοχολινεστεράση ως μη ειδικό στοιχείο βιοαναγνώρισης (Griesche & Baeumner, 2020).

#### 4.3.6. Νέες Προοπτικές

Η παρακολούθηση καταλοίπων αντιμικροβιακών φαρμάκων στα τρόφιμα έχει προκαλέσει ανησυχίες για την παραγωγή ασφαλών τροφίμων και μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί πολλές προσεγγίσεις προσδιορισμού αυτών των καταλοίπων. Πριν το 2000, η ELISA ήταν μια κοινή μέθοδος προσδιορισμού σε δείγματα τροφίμων. Μετά από αυτή την εφαρμογή πολλές τεχνολογίες σημείωσαν πρόοδο στον τομέα της φυσικής, της χημείας, της βιολογίας και της νανοτεχνολογίας όσον αφορά τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών. Τα αποτελέσματα αυτών των εξελίξεων ήταν η δημιουργία νέων τεχνικών όπως οι βιοαισθητήρες. Αν και δεν είναι όλοι οι τύποι βιοαισθητήρων ιδανικοί, παρέχουν τη βάση για την ανάπτυξη εργαλείων με μεγαλύτερη ακρίβεια (Majdinasab, et al., 2020).

Έχουν εντοπιστεί τρεις βασικοί παράγοντες που πρέπει να εξεταστούν για την ανάπτυξη βελτιωμένης απόδοσης των βιοαισθητήρων: τα βιοαισθητήρια στοιχεία, οι μεταλλάκτες σήματος και η νανοτεχνολογία. Η ανάπτυξη νέων εργαλείων, όπως οι βιοαισθητήρες και οι μεταλλάκτες σήματος έχουν ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της έντασης και συνεπώς και της ανίχνευσης του σήματος. Έχει σημειωθεί πρόοδος σε σχέση με καθένα από τις τρεις αυτές παραμέτρους, και ο συνδυασμός τους μπορεί να οδηγήσει στη μελλοντική ανάπτυξη φθηνότερων και πιο αποτελεσματικών βιοαισθητήρων

Πιο πρόσφατα, η βιοτεχνολογία έχει στραφεί σε ολοένα και πιο μικρά συστήματα, ώστε να καθίσταται δυνατή η φορητότητα, η μείωση τους κόστους και του χρόνου ανάλυσης, αλλά και η εμπορική βιωσιμότητα. Οι βελτιώσεις στα συστήματα μικροκατασκευής συνέβαλαν επίσης στην προώθηση της τεχνολογίας και της χρησιμότητας του βιοαισθητήρα. Αναδυόμενα νανοϋλικά, όπως νανοσωματίδια και νανοϊνες έχουν εμφανιστεί και ανοίγουν τον δρόμο για τη δημιουργία συστημάτων ανάλυσης μικρότερου μεγέθους. Αυτά τα λειτουργικά νανοϋλικά ενισχύουν τους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες με δύο τρόπους. Με τον πρώτο τρόπο δρουν αυξάνοντας την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και έτσι με μεγαλύτερες αναλογίες επιφάνεια προς έκτασης, τα νανοϋλικά προσφέρουν μεγαλύτερη καταλυτική ικανότητα. Αυτό σημαίνει ότι βελτιώνεται η επιλεκτικότητα, η ευαισθησία και η σχέση απόδοσης χρόνου και κόστους του βιοαισθητήρα. Ομοίως, η αύξηση της επιφάνειας του

μεταλλάκτη σήματος παρέχει μεγαλύτερη αγωγιμότητα και ευαισθησία, και μειώνει τα όρια ανίχνευσης (Bunney, et al., 2017).

#### **4.4 Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis – CE)**

Με τη μέθοδο της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (CE) είναι δυνατή η ανάλυση μιας μεγάλης ποικιλίας μορίων με βάση πολλές παραμέτρους όπως το μέγεθος, η φόρτιση και υδροφοβικότητα (Ragab & El-Kimary, 2020). Η CE έγινε δημοφιλής στις αρχές της δεκαετίας του 1980, όταν οι Jorgenson και Lucas απέδειξαν ότι η αποτελεσματικότητα της ηλεκτροφόρησης μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά εάν η διαδικασία της διεξαχθεί σε τριχοειδή χαλαζία με εσωτερική διάμετρο 75 μm. Ο όρος ηλεκτροφόρηση αφορά την κίνηση φορτισμένων σωματιδίων, με διαφορετικές ταχύτητες, κάτω από την επίδραση ηλεκτρικού πεδίου, όπου τα θετικά ιόντα (κατιόντα) οδεύουν προς το αρνητικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο (κάθοδος) και τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια (ανιόντα) οδηγούνται στο θετικά φορτισμένο ηλεκτρόδιο (άνοδος). Η χρήση τριχοειδών σωλήνων στην ηλεκτροφόρηση προσφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Για παράδειγμα, η υψηλή ηλεκτρική αντίσταση του τριχοειδούς καθιστά δυνατή τη λειτουργία της μεθόδου σε πολύ υψηλά ηλεκτρικά πεδία (έως 500 V/cm). Επιπλέον, η υψηλή αναλογία της επιφάνειας του τριχοειδούς ως προς τον όγκο του εξασφαλίζει την αποτελεσματική απομάκρυνση της απελευθερωμένης θερμότητας (Morzunova, 2006).

Αν και η HPLC, κυρίως σε συνδυασμό με την MS, εφαρμόζεται για την ανάλυση αντιβιοτικών σε δείγματα τροφίμων, παρατηρήθηκε αύξηση και στην χρήση της CE. Όπως και η HPLC, έτσι και η CE είναι κατάλληλη για επεξεργασία μεγάλων ποσοτήτων δειγμάτων, αποτελεί αυτοματοποιημένη μέθοδο και περιλαμβάνει πολλαπλές λειτουργίες ανίχνευσης. Επιπρόσθετα πλεονεκτήματα αποτελούν ή υψηλή απόδοση και η μεγάλη ευελιξία της μεθόδου, καθώς και η χαμηλή κατανάλωση δειγμάτων και αντιδραστηρίων (García-Campraña, et al., 2009).

Ωστόσο, λόγω της πολυπλοκότητας των δειγμάτων τροφίμων, τα οποία είναι πλούσια κυρίως σε λιπίδια, υδατάνθρακες και πρωτεΐνες, είναι απαραίτητο να εφαρμοστεί το στάδιο της προετοιμασίας και του προσδιορισμού της αρχικής συγκέντρωσης του δείγματος. Έτσι, καθίσταται δυνατή η ανίχνευση υπολειμμάτων φαρμάκων σε πολύ μικρές ποσότητες (ίχνη). Αυτές οι διαδικασίες έγιναν υποχρεωτικές

λόγω της κακής ευαισθησίας της CE. Ο συνδυασμός των παραδοσιακών τεχνικών εκχύλισης όπως η LLE και η SPE ή εξελιγμένες τεχνικές όπως η DLLME (Dispersive liquid-liquid microextraction), έχουν εφαρμοστεί με επιτυχία στον εντοπισμό μικρών ποσοτήτων αναλυτών και έχουν αυξήσει την ευαισθησία της CE (Colombo & Papetti, 2019).

#### **4.4.1. Αρχή μεθόδου**

Η CE αποτελεί μια μέθοδο διαχωρισμού υψηλής απόδοσης, κατά την οποία στενοί τριχοειδείς σωλήνες χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό μικρών και μεγάλων μορίων. Η χρήση υψηλών τάσεων δημιουργεί ηλεκτροωσμωτική ροή (electroosmotic flow – EOF), αλλά και ηλεκτροφορητική ροή των ρυθμιστικών διαλυμάτων και των φορτισμένων συστατικών που περιέχονται στους τριχοειδείς σωλήνες, κάτι που έχει ως αποτέλεσμα την διευκόλυνση της διαδικασίας του διαχωρισμού (Ζώτου, 2015).

Παραδοσιακά στη CE χρησιμοποιούνται τριχοειδείς σωλήνες από τηγμένη πυριτία, οι οποίοι είναι επικαλυμμένοι από ομάδες σιλανόλης στην εσωτερική τους επιφάνεια. Καθώς αυτές οι ενώσεις μπορούν να ιοντιστούν σε υδατικό διάλυμα, το αποτέλεσμα είναι μια αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια, η οποία οδηγεί σε δύο σημαντικές συνέπειες:

- α) μια αξιοσημείωτη υδρόφιλη επιφάνεια, η οποία προσροφά διάφορα είδη ενώσεων και
- β) το σχηματισμό ενός ηλεκτρικού διπλού στρώματος μεταξύ της επιφάνειας του τριχοειδούς σωλήνα και των κατιόντων του ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο είναι υπεύθυνο για την εμφάνιση της EOF.

Οι ομάδες σιλανόλης στην εσωτερική επιφάνεια του τριχοειδούς έχουν αρνητικό φορτίο και ιοντίζονται σε τιμές pH άνω του 3, οδηγώντας στο σχηματισμό μιας αρνητικά φορτισμένης επιφάνειας. Υπό αυτές τις συνθήκες, τα κατιόντα στο ρυθμιστικό διάλυμα σχηματίζουν ένα διπλό στρώμα: ένα εσωτερικό σταθερό στρώμα και ένα εξωτερικό κινητό στρώμα το οποίο κινείται προς την κάθοδο με το μεγαλύτερο μέρος του ρυθμιστικού διαλύματος.

Λαμβάνοντας υπόψη αυτά τα δύο φαινόμενα, η EOF περιγράφει την μετακίνηση των ιόντων μέσα σε ένα ρυθμιστικό διάλυμα υπό την επίδραση ενός εφαρμοσμένου

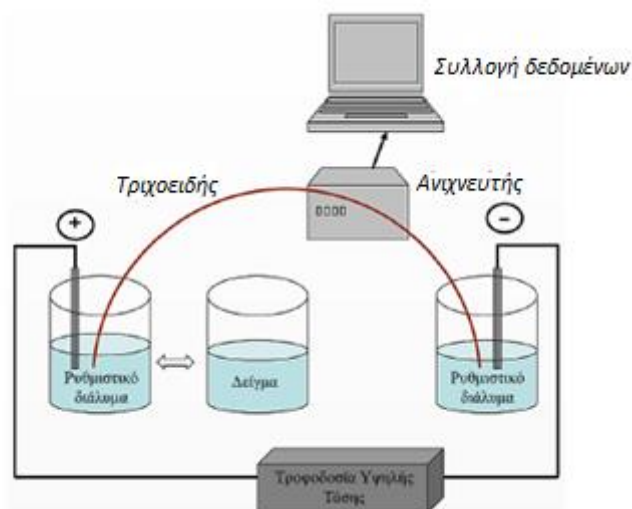
δυναμικού, με στόχο την πραγματοποίηση του ηλεκτροφορητικού διαχωρισμού και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των θετικά, των ουδέτερων και των αρνητικά φορτισμένων ενώσεων (Ramos-Payan, et al., 2018). Δεδομένου ότι η μια ομοιόμορφη ηλεκτροσωματική κινητικότητα συμβάλει στην υψηλή διαχωριστική ικανότητα της CE, οποιαδήποτε επίδραση μπορεί να μειώσει την ομοιομορφία και να επηρεάσει αρνητικά το διαχωρισμό.

Σχετικά με την μετρούμενη (ή φαινομενική) κινητικότητα, αυτή ισούται με το άθροισμα της ηλεκτροσωματικής κινητικότητας του διαλύματος και της ηλεκτροφορητικής κινητικότητας του ιόντος. Αν και στη χρωματογραφία οι αναλύτες διέρχονται από τον ανιχνευτή με την ίδια ταχύτητα, στην ηλεκτροφόρηση οι αναλύτες με διαφορετική φαινομενική κινητικότητα διέρχονται με διαφορετικές ταχύτητες (Harris, 2010).

#### 4.4.2. Οργανολογία

Ένας πλήρες σύστημα CE αποτελείται από τα παρακάτω και παρουσιάζεται στην **Εικόνα 14**:

- Τριχοειδή σωληνάκια
- Αυτόματος δειγματολήπτης
- Μονάδα ανίχνευσης
- Τροφοδοτικό υψηλής τάσης και
- Φορητός υπολογιστής



Εικόνα 14. Οργανολογία συστήματος CE.



Στην **Εικόνα 14** τα άκρα του τριχοειδούς σωλήνα τοποθετούνται σε δύο δοχεία τα οποία περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα και από ένα ηλεκτρόδιο, το οποίο είναι συνδεδεμένο με τροφοδοτικό υψηλής τάσης. Μόλις ολοκληρωθεί η πλήρωση του τριχοειδούς με το ρυθμιστικό διάλυμα, το δείγμα που επρόκειτο να αναλυθεί εισέρχεται στον τριχοειδή σωλήνα και αντικαθιστά ένα από τα δύο δοχεία. Στη συνέχεια, εφαρμόζεται ηλεκτρικό δυναμικό και επανατοποθετείται το δοχείο με το ρυθμιστικό διάλυμα. Με την επερχόμενη εφαρμογή του ηλεκτρικού δυναμικού πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος (Ζώτου, 2015).

#### **4.4.3 Εισαγωγή δείγματος**

Οι πιο συχνές τεχνικές έγχυσης του δείγματος είναι η υδροδυναμική, η οποία στηρίζεται στη διαφορά πίεσης μεταξύ των δύο άκρων του τριχοειδούς και η ηλεκτροχημική έγχυση, στην οποία χρησιμοποιείται ηλεκτρικό πεδίο για την εισαγωγή του δείγματος μέσα στον τριχοειδή (Harris, 2010). Η υδροδυναμική έγχυση χρησιμοποιείται ευρέως και μπορεί να συμβεί με έναν από τους παρακάτω τρόπους:

α) με εφαρμογή πίεσης στο άκρο του τριχοειδούς στο οποίο θα γίνει η εισαγωγή του δείγματος,

β) με εφαρμογή κενού στο άκρο εξόδου του τριχοειδούς και

γ) με σιφωνισμό, ο οποίος πραγματοποιείται με ανύψωση του άκρου του δείγματος του τριχοειδούς. Στην συμβατική CE, στην άνοδο βρίσκεται το άκρο εισόδου του τριχοειδούς, ενώ στην κάθοδο βρίσκεται το άκρο εξόδου (Ζώτου, 2015).

Κατά την ηλεκτροχημική έγχυση το ένα άκρο του τριχοειδούς και το ένα ηλεκτρόδιο που βρίσκεται σε ένα από τα δύο δοχεία που περιέχουν ρυθμιστικό διάλυμα, απομακρύνονται και εισέρχονται σε ένα δοχείο το οποίο περιέχει το δείγμα που θα αναλυθεί. Μετά την εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης γίνεται πλήρωση του τριχοειδούς με το δείγμα και επανατοποθετείται το δοχείο με το ρυθμιστικό διάλυμα για όλη τη χρονική διάρκεια του διαχωρισμού (Skoog, et al., 2015).

#### **4.4.4 Κατηγορίες CE**

Χρησιμοποιούνται κυρίως δύο διαφορετικοί τύποι της CE, η ηλεκτροφόρηση τριχοειδών ζωνών (Capillary Zone Electrophoresis – CZE) και η μικκυλιακή ηλεκτροκινητική τριχοειδική χρωματογραφία (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography – MEKC)

(García-Campraña, et al., 2009). Η CZE αποτελεί την απλούστερη μορφή της CE. Η αρχή της μεθόδου διαχωρισμού στηρίζεται στις διαφορές της αναλογίας φορτίου – μάζας των αναλυτών. Πολύ σημαντικό για την CZE είναι η ομοιογένεια του ρυθμιστικού διαλύματος και η σταθερή ένταση πεδίου σε όλη την έκταση του τριχοειδούς (Elbashir & Aboul-Enein, 2014). Αναφορικά με τη MEKC, αυτή αποτελεί ένα συνδυασμό της ηλεκτροφόρησης και της χρωματογραφίας και ενισχύει τον διαχωρισμό τόσο των ουδέτερων όσο και των φορτισμένων ενώσεων, στην ίδια μέτρηση (Ζώτου, 2015). Ο λόγος για τον οποίο η MEKC θεωρείται είδος χρωματογραφίας είναι η συμπεριφορά των μικκυλίων ως ψευδοστατική φάση (Harris, 2010).

#### **4.4.5. Ανιχνευτές**

Οι ανιχνευτές στην CE ομοιάζουν λειτουργικά και κατασκευαστικά με τους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC. Η ανίχνευση φθορισμού είναι ευαίσθητη και επιλεκτική σε φυσικά φθορίζοντες αναλύτες ή παράγωγά τους και προτιμάται η χρήση λέιζερ σε αυτή λόγω της πιο εύκολης ακτινοβολίας διέγερσης στο τριχοειδές (Skoog, et al., 2015). Οι ανιχνευτές υπεριώδους (UV) μπορούν και λειτουργούν σε χαμηλά μήκη κύματος, με αποτέλεσμα οι περισσότερες ουσίες να απορροφούν ισχυρά. Ωστόσο, λόγω της μικρής εσωτερικής διαμέτρου του τριχοειδούς και του μικρού όγκου δείγματος μειονεκτούν ως προς την ευαισθησία τους και περιορίζουν σημαντικά την εφαρμογή τους σε προσδιορισμούς όπως οι αναλύσεις υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων (Elbashir & Aboul-Enein, 2014). Η ηλεκτροχημική ανίχνευση στηρίζεται στην αμπερομετρική ανίχνευση, η οποία είναι ευαίσθητη σε αναλύτες με δυνατότητα οξειδωσης ή αναγωγής σε ένα ηλεκτρόδιο ή στην ανίχνευση αγωγιμότητας. Τέλος, η φασματομετρία μάζας με ηλεκτροψεκασμό, προσφέρει χαμηλά όρια ανίχνευσης και σημαντικές ποιοτικές πληροφορίες για τους αναλύτες (Harris, 2010). Ο συνδυασμός της ηλεκτροφόρησης τριχοειδούς με την φασματομετρία μάζας, ως μέθοδο ανίχνευσης, (CE-MS) αποτελεί σημαντική τεχνική προσδιορισμού διαφόρων ενώσεων. Η τεχνική αυτή θα αναλυθεί στο

#### **Κεφάλαιο 4.5.4.**

#### **4.4.6. Εφαρμογές**

Η CE αποτελεί μια νέα τεχνολογική μέθοδο διαχωρισμού υγρής φάσης, στην οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν, όπως προαναφέρθηκε, διαφορετικοί ανιχνευτές. Για παράδειγμα, η CE σε συνδυασμό με φθορισμό που προκαλείται από λέιζερ εφαρμόστηκε

για την ανίχνευση υπολειμμάτων σουλφοναμιδίου, ενώ η επιβεβαίωση των αναλυτών επιτεύχθηκε με τη μέθοδο LC-MS. Η CE με ανίχνευση των αναλυτή μέσω ηλεκτροχμειοφωταύγειας χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της χλωροτετρακυκλίνης, της αμπικιλλίνης και της σαραφλοξασίνης σε δείγματα γάλατος και για τον προσδιορισμό των φθοροκινολονών σε δείγματα βόειου γάλακτος (Li, et al., 2020). Επιπρόσθετα, τεχνικές CE έχουν εφαρμοστεί για την ανάλυση φλουροκινολονών σε δείγματα τροφίμων (π.χ. γάλα, νερό και ζωικοί μύες). Ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός των διαφορετικών φαρμάκων (μακρολίδες και τετρακυκλίνη) σε δείγματα τροφίμων μπορεί να πραγματοποιηθεί ταυτόχρονα με την τεχνική CZE-UV. Με την ίδια τεχνική, οι λακτάμες, οι τετρακυκλίνες, οι κινολόνες, οι αμφενικόλες και οι σουλφοναμίδες προσδιορίστηκαν ταυτόχρονα και διαχωρίστηκαν σε δείγμα βόειου γάλακτος (Colombo & Papetti, 2019).

Όσον αφορά τα φυτοφάρμακα, τα κατάλοιπα και ο μεταβολίτες τους έχουν αναλυθεί σε περιβαλλοντικά δείγματα χρησιμοποιώντας μια ποικιλία χρωματογραφικών μεθόδων όπως η GC, η HPLC και η CE. Λόγω της υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας τους οι GC και η HPLC είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για την ανίχνευση αυτών των ενώσεων. Ωστόσο, επειδή πολλά φυτοφάρμακα παρουσιάζουν θερμική αστάθεια και χαμηλή πτητικότητα απαιτούν κουραστικές διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος και μεγάλες ποσότητες δείγματος για την διεκπεραίωση της ανάλυσης μέσω της GC και της HPLC. Ως αποτέλεσμα, η CE έχει γίνει η προτιμώμενη εναλλακτική μέθοδος για τις αναλύσεις φυτοφαρμάκων προσφέροντας υψηλή απόδοση σε αυτές τις αναλύσεις (Chang, et al., 2016). Για παράδειγμα, πραγματοποιήθηκε ο διαχωρισμός και η ανάλυση ζιζανιοκτόνων τριαζίνης με τις μεθόδους CZE και MEKC (Elbashir & Aboul-Enein, 2014).

#### **4.5 Φασματομετρία Μάζας (Mass Spectrometry – MS)**

Η φασματομετρία μάζας (MS) αποτελεί βασικό εργαλείο για την ασφάλεια των τροφίμων και είναι μια από τις πιο κατάλληλες τεχνικές για την ανάλυση χημικών ουσιών στα τρόφιμα. Ο συνδυασμός της με τεχνικές διαχωρισμού, κυρίως χρωματογραφικές, συνέβαλε στην επιτυχή παρακολούθηση ενός ευρέως φάσματος μολυσμένων τροφίμων. Τα τελευταία χρόνια, η παρακολούθηση της ασφάλειας των τροφίμων έχει βελτιωθεί

λόγω του συνδυασμού αναλυτών με μεγαλύτερη ακρίβεια και ευαισθησία, και συστημάτων διαχωρισμού πιο εξελιγμένων (Dominguez, et al., 2020).

Πλεονεκτήματα της εφαρμογής αυτής της μεθόδου αποτελούν η υψηλή επιλεκτικότητα και ανιχνευσιμότητα, η ποσοτική ικανότητα, η εμπορική διαθεσιμότητα, η ευελιξία και η ταχύτητά της. Λόγω αυτών, η MS έχει αρχίσει να χρησιμοποιείται πιο συχνά σε δοκιμασίες διαλογής χωρίς το συνδυασμό της με τη χρωματογραφία (Lehotay, et al., 2015).

#### **4.5.1 Αρχή μεθόδου**

Η αρχή μεθόδου της MS στηρίζεται στην παραγωγή μοριακών ιόντων ή θραυσμάτων κατά τον ιονισμό του μορίου και στον ακόλουθο διαχωρισμό αυτών των ιόντων σύμφωνα με το λόγο της μάζας τους ως προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Αυτά τα ιόντα περιέχουν περίσσεια ενέργειας και θραύονται σε ιόντα μικρότερου μεγέθους, τα οποία στη συνέχεια επιταχύνονται με τη βοήθεια ηλεκτρικού πεδίου και εισέρχονται τον αναλύτη μαζών με σκοπό να διαχωριστούν. Η καταγραφή των ιόντων γίνεται με τη χρήση κατάλληλων ανιχνευτών. Η αποθήκευση των δεδομένων σε ηλεκτρονικό υπολογιστή βοηθά στην παραγωγή του φάσματος μάζας.

#### **4.5.2. Οργανολογία**

Ένα φασματόμετρο μάζας αποτελείται από τα εξής μέρη:

- Σύστημα εισαγωγής του δείγματος, το οποίο έχει ως στόχο την μετατροπή του δείγματος σε αέρια κατάσταση. Εάν το δείγμα βρίσκεται σε υγρή μορφή εισάγεται με σύριγγα μέσω πλαστικού παρεμβύσματος. Ως σύστημα εισαγωγής μπορεί να θεωρηθεί και ο αέριος ή υγρός χρωματογράφος στις συνδυασμένες τεχνικές GC-MS και LC – MS (Παππά, 2004). Στο στάδιο αυτό προετοιμάζεται το δείγμα για την εισαγωγή του στο χώρο ιονισμού.
- Χώρος ιονισμού ή αλλιώς την πηγή ιόντων, στον οποίο γίνεται ο ιονισμός των μορίων της προς ανάλυση ουσία.
- Αναλυτής μαζών, που χρησιμεύει στο διαχωρισμό των ιόντων που παράγονται στο χώρο ιονισμού, με βάση τις διαφορετικές τιμές του λόγου  $m/z$  κάθε ιόντος.
- Ανιχνευτής ιόντων, που είναι υπεύθυνος για τη παραγωγή ηλεκτρικού σήματος στην έξοδο του, ανάλογο με τον αριθμό και το φορτίο των ιόντων .

- Σύστημα κενού
- Ηλεκτρονικός υπολογιστής (Χατζηιωάννου & Κούππαρης, 2005).

#### **4.5.3. Διαδοχική φασματομετρία μάζας (Tandem mass spectrometry – MS/MS)**

Η διαδοχική φασματομετρία μάζας (MS/MS) είναι ένα σύστημα δύο συνδυασμένων αναλυτών του ίδιου ή διαφορετικού τύπου, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από υψηλή απόδοση διαχωρισμού (Stachniuk & Fornal, 2016). Η βασική αρχή της MS/MS περιλαμβάνει την επιλογή του πρόδρομου ιόντος, τον κατακερματισμό του, το διαχωρισμό του και τέλος τη μέτρηση της αναλογίας  $m/z$  των σχηματισθέντων ιόντων (Hird, et al., 2014). Πιο αναλυτικά τα πρόδρομα ιόντα που παράγονται από τη πηγή διαχωρίζονται στον πρώτο αναλυτή (MS1). Λόγω του διαχωρισμού των ιόντων, μια διαδικασία που αναφέρεται ως κατακερματισμός, παράγονται νέα ιόντα που αναλύονται στον δεύτερο αναλυτή (MS2), σύμφωνα με τη τιμή του λόγου  $m/z$ . Ο διαχωρισμός που προκαλείται από σύγκρουση (Collision-induced dissociation – CID) περιλαμβάνει τη σύγκρουση ουδέτερων αέριων μορίων και είναι μια τεχνική κατακερματισμού που χρησιμοποιείται συχνά σε συστήματα LC-MS/MS.

Συγκριτικά με τους προσδιορισμούς που χρησιμοποιούνται μόνο ένας αναλυτής, η MS/MS παρέχει μια σημαντική βελτίωση στις συνθήκες ανάλυσης, μέσω βελτιωμένης επιλεκτικότητας και σημαντικά αυξημένης ευαισθησίας. Υπάρχουν πολλές δυνατότητες σύνδεσης διαφορετικών τύπων αναλυτών. Για παράδειγμα τα τριπλά τετραπολικά συστήματα (QQQ), τα τετραπολικά συστήματα χρόνου πτήσης (Q-TOF) και τα γραμμικά συστήματα παγίδευσης ιόντων (Q-Trap), αποτελούν τους πιο συχνούς συνδυασμούς αναλυτών που χρησιμοποιούνται στην MS/MS, με στόχο τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φαρμάκων στα τρόφιμα (Stachniuk & Fornal, 2016).

#### **4.5.4 CE – MS**

Η τριχοειδής ηλεκτροφόρηση συζευγμένη με φασματομέτρο μάζας παρουσιάστηκε για πρώτη φορά ως εργαλείο της αναλυτικής χημείας το 1987. Η CE-MS συνδυάζει την υψηλή απόδοση διαχωρισμού της CE ως υγρή φάση και την MS ως αέρια φάση. Ο συνδυασμός αυτών των δύο τεχνικών επιτρέπει τον διαχωρισμό και την ποσοτική ανάλυση αναλυτών που δεν ήταν δυνατή η ανάλυση τους με τη μέθοδο της CE και η αναγνώριση τους από την MS (de Jong, 2016). Η CE-MS έχει εφαρμοστεί στην ανάλυση τροφίμων και έχει αποδείξει την ικανότητα εφαρμογής της στον έλεγχο της ποιότητας

και της ασφάλειας, αλλά και στην επεξεργασία και στην αποθήκευση των τροφίμων. Οι αναλύσεις που προσφέρει καλύπτουν μια μεγάλη ποικιλία ενώσεων, με διαφορετικές χημικές ιδιότητες, όπως είναι τα φυτοφάρμακα, τα κατάλοιπα φαρμακευτικών ουσιών, οι τοξίνες κ.α. (Tygova, et al., 2017).

Μια απλή και ευαίσθητη μέθοδος CE-MS εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό ανθελμινθικών βενζιμιδαζολών και των μεταβολιτών τους σε δείγματα αυγών, ενώ η ίδια τεχνική έχει παρουσιαστεί και για τον έλεγχο και την επιβεβαίωση υπολειμμάτων σουλφοναμίδης σε δείγματα γάλατος (Li, et al., 2020). Μια άλλη μελέτη, που βασιζόταν στον συνδυασμό των τεχνικών CZE και της διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (CZE-MS/MS), εφαρμόστηκε για την ταυτόχρονη ταυτοποίηση δεκαπέντε αντιβιοτικών (εφτά κινολόνες και οχτώ τετρακυκλίνες) σε δείγματα γάλατος (Moreno-González, et al., 2017). Η ίδια μέθοδος εφαρμόστηκε και τον προσδιορισμό εννιά αμινογλυκοσίδων σε δείγματα μελιού (Moreno-Gonzalez, et al., 2015). Επιπλέον, μέθοδοι CE-MS αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν για την ανάλυση υπολειμμάτων αμπρολίου (amprolium) σε δείγματα αυγών. Το αμπρόλιο είναι μια ένωση τεταρτοταγούς αμμωνίου που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της κοκκιδίωσης (Klerarnik, 2015).

## **4.6 Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography – GC)**

### **4.6.1 Εισαγωγή στις χρωματογραφικές τεχνικές**

Η αέρια χρωματογραφία (GC) είναι μια ισχυρή και ευρέως χρησιμοποιούμενη αναλυτική τεχνική διαχωρισμού σύνθετων μιγμάτων. Ο ορισμός της χρωματογραφίας σύμφωνα με τις συστάσεις από τη «Διεθνή Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας» (International Union of Pure and Applied Chemistry – IUPAC) είναι ο ακόλουθος:

*«Η χρωματογραφία είναι μια φυσική μέθοδος διαχωρισμού στην οποία τα συστατικά που θα διαχωριστούν κατανέμονται μεταξύ δύο φάσεων, μία εκ των οποίων είναι στάσιμη (στατική φάση), ενώ η άλλη (η κινητή φάση) κινείται προς μια συγκεκριμένη κατεύθυνση.»*

Η κινητή φάση μπορεί να είναι αέρια ή υγρή και κινείται λόγω της βαρύτητας, των τριχοειδικών δυνάμεων ή της πίεσης. Είναι υπεύθυνη για τη μεταφορά των αναλυτών κατά μήκος της στατικής φάσης. Η στατική φάση μπορεί να είναι ένα πορώδες ή μη πορώδες στερεό ή ένα ακινητοποιημένο υγρό, με δυνατότητα συγκράτησης των

αναλυτών σε σχέση με το ρυθμό μεταφοράς της κινητής φάσης. Οι δύο αυτές φάσεις δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους και βρίσκονται σε κοντινή απόσταση.

Οι χρωματογραφικές μέθοδοι μπορούν να ταξινομηθούν χρησιμοποιώντας διαφορετικά κριτήρια με βασικότερο από αυτά το είδος της κινητής φάσης. Όταν η κινητή φάση είναι αέρια, ονομάζεται αέρια χρωματογραφία, ενώ όταν είναι υγρή, καλείται υγρή χρωματογραφία (Dettmer-Wilde & Engewald, 2014).

Οι μέθοδοι χρωματογραφικού διαχωρισμού αναμφίβολα είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αναλυτικές τεχνικές. Η GC είναι μια μοναδική ευέλικτη τεχνική και χρησιμοποιείται για τον έλεγχο προϊόντων. Πιο αναλυτικά, συνέβαλε στον προσδιορισμό των συστατικών των τροφίμων, ανακάλυψε τις διατροφικές ανάγκες του ανθρώπου και βελτίωσε την ποιότητα των τροφίμων. Επιπλέον, αποτέλεσε κατάλληλη προσέγγιση για την μέτρηση μικρών ποσοτήτων οργανικών μολυσματικών ενώσεων σε σύνθετα τρόφιμα και περιβαλλοντικά δείγματα. Τέλος, βοήθησε στη συμμόρφωση του ανθρώπου όσον αφορά τη χρήση γεωργικών χημικών ουσιών στην γεωργία με σκοπό της αποφυγής βλαβερών επιπτώσεων στην υγεία του και στο περιβάλλον (Al-Bukhaiti, et al., 2017). Η GC χαρακτηρίζεται ως μια απλή, ευαίσθητη και γρήγορη τεχνική διαχωρισμού πολύ μικρών μορίων (Coskun, 2016). Πλεονεκτήματα της αποτελούν επίσης η υψηλή ακρίβεια που παρέχει στις ποσοτικές αναλύσεις δειγμάτων της τάξεως των  $\mu\text{L}$ , η αξιοπιστία της, το κόστος και η σχετικά απλή εφαρμογή της (McNair, et al., 2019).

Στην ανάλυση τροφίμων, η GC αντιπροσωπεύει μια από τις βασικές τεχνικές διαχωρισμού πολλών ομάδων πτητικών ενώσεων, οι οποίες είναι θερμικά σταθερές στις θερμοκρασίες που απαιτούνται για την εξάτμισή τους (Tranchida, 2019). Η υψηλής ισχύς διαχωρισμού σε συνδυασμό με μια μεγάλη ποικιλία ανιχνευτών, τη καθιστά σημαντικό εργαλείο για τον προσδιορισμό διαφόρων συστατικών σε πολύπλοκες μήτρες τροφίμων. Στη πράξη, μια μέθοδος που βασίζεται στη GC περιλαμβάνει τυπικά τα ακόλουθα βήματα:

- α) απομόνωση αναλυτών από ένα αντιπροσωπευτικό δείγμα (εκχύλιση),
- β) διαχωρισμός των επιπλέον συστατικών που εκχυλίστηκαν με τον αναλύτη (καθαρισμός),

γ) ταυτοποίηση και ποσοτικοποίηση του αναλύτη στόχου και εάν είναι σοβαρή η ανάγκη ακολουθεί το βήμα

δ) επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων με μια πρόσθετη ανάλυση (Hajslova & Cajka, 2009).

#### **4.6.2. Αρχή μεθόδου**

Στη χρωματογραφία, η μία φάση διατηρείται ακίνητη στην εσωτερική επιφάνεια της στήλης, ενώ η άλλη φάση είναι αέρια και μεταφέρει το δείγμα που πρέπει να διαχωριστεί, ενώ παράλληλα του επιτρέπει τη μετακίνηση πάνω από τη στατική φάση. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των φάσεων εξαρτάται κυρίως από τον τύπο της στατικής και της κινητής φάσης. Οι δύο φάσεις πρέπει να βρίσκονται σε επαφή για αρκετό χρόνο, έτσι ώστε να διασφαλιστεί η επαρκής αλληλεπίδραση το δείγματος με την στατική φάση. Επομένως, ο ρυθμός ροής της κινητής φάσης δεν μπορεί να είναι πολύ γρήγορος (Swinley & de Coning, 2019).

Το δείγμα το οποίο θα διαχωριστεί μετατρέπεται πρώτα σε ατμούς και έτσι αναμιγνύεται με την αέρια κινητή φάση. Τα συστατικά ενός δείγματος που είναι πιο διαλυτά στη στατική φάση μετακινούνται («ταξιδεύουν») πιο αργά, σε αντίθεση με τα λιγότερα διαλυτά τα οποία μετακινούνται γρηγορότερα. Ο διαχωρισμός των συστατικών γίνεται με βάση τον συντελεστή κατανομής τους (Kaur & Sharma, 2018).

#### **4.6.3. Οργανολογία**

Όλοι οι χρωματογράφοι αποτελούνται από τα παρακάτω 6 βασικά μέρη:

- Σύστημα έγχυσης του δείγματος: Μια θύρα για το δείγμα είναι απαραίτητη για την εισαγωγή του στη χρησιμοποιούμενη στήλη. Μια βαθμονομημένη μικροσύριγγα χρησιμοποιείται για τη μεταφορά ενός όγκου δείγματος, μέσω ενός λαστιχένιου διαφράγματος, στο θάλαμο εξάτμισης. Οι περισσότεροι από τους διαχωρισμούς απαιτούν μόνο ένα μικρό κλάσμα του αρχικού όγκου του δείγματος.
- Φέρον αέριο (carrier gas): Το φέρον αέριο παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στη GC. Θα πρέπει να είναι αδρανές, ξηρό και χωρίς οξυγόνο. Τα αέρια ηλίου, αζώτου, αργού και υδρογόνου χρησιμοποιούνται ως αέριος φορέας και συσχετίζονται με την επιθυμητή απόδοση και τον ανιχνευτή που χρησιμοποιείται (Kaur & Sharma, 2018). Το φέρον αέριο αποτελεί τη κινητή φάση του αεριοχρωματογράφου και



πρέπει να διαφέρει από τις ουσίες που επρόκειτο να διαχωριστούν, ως προς μία ιδιότητα π.χ. πυκνότητα.

- Στήλες διαχωρισμού: Οι τριχοειδείς στήλες ή στήλες ανοιχτού σωλήνα και οι πληρωμένες στήλες (packed columns) χρησιμοποιούνται στη GC, με τις δεύτερες να κυριαρχούν και να περιέχουν ένα αδρανές στερεό υπόστρωμα. Οι τριχοειδείς στήλες χαρακτηρίζονται από την συνήθη απουσία του στερεού υποστρώματος, με αποτέλεσμα η υγρή στατική φάση να είναι συγκρατημένη απ' ευθείας στο τοίχωμα του σωλήνα και συνεπώς η χωρητικότητά τους να είναι μικρή (Χατζηιωάννου & Κούππαρης, 2005).
- Θάλαμοι στηλών ή θερμοστατούμενος φούρνος: Ο θερμοστατούμενος φούρνος είναι υπεύθυνος για τον έλεγχο της θερμοκρασίας της στήλης και η λειτουργία του στηρίζεται σε δύο αρχές. Η πρώτη αποκαλείται ισοθερμικός προγραμματισμός (isothermal programming) και η θερμοκρασία της στήλης διατηρείται σταθερή καθ' όλη τη διάρκεια της διαχωριστικής μεθόδου. Αντίθετα, η αρχή της προγραμματισμένης θερμοκρασίας (temperature programming) χαρακτηρίζεται από την συνεχή ή τη βαθμιαία αύξηση της θερμοκρασίας κατά την εξέλιξη της μεθόδου. Ο θερμοστατούμενος φούρνος είναι εφοδιασμένος με ένα σύστημα εξαερισμού, ώστε να εξασφαλίζεται η ισχυρή κυκλοφορία του αέρα, διότι ο αέρας έχει κακή αγωγιμότητα θερμότητας (Kaur & Sharma, 2018).
- Ανιχνευτής: Ο ανιχνευτής είναι μια συσκευή η οποία καταγράφει τα διαλύματα που εξέρχονται από τη στήλη. Ένα ηλεκτρικό σήμα παράγεται, στις περισσότερες περιπτώσεις ενισχύεται, και αποστέλλεται στο σύστημα δεδομένων (Dettmer-Wilde & Engewald, 2014).
- Σύστημα ενίσχυσης και καταγραφής: Αυτά είναι τα τελευταία δομικά στοιχεία ενός χρωματογράφου. Προορίζονται για τη καταγραφή των σημάτων που προέρχονται από τον ανιχνευτή. Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιούν ειδικά ηλεκτρονικά κυκλώματα, τα οποία ενισχύουν τα παραγόμενα σήματα έτσι ώστε να εμφανίζονται σε κατανοητή γραφική μορφή (Kaur & Sharma, 2018).

#### 4.6.4 Ανιχνευτές

Ένας χρωματογραφικός διαχωρισμός, δεν έχει σημασία εάν δεν ανιχνευθούν τα διαχωρισμένα είδη. Μία χημική ένωση που διέρχεται μέσω ενός αεριοχρωματογραφικού

ανιχνευτή παράγει ένα ηλεκτρικό σήμα μέσω μιας μεγάλης ποικιλίας μέσων (Dettmer-Wilde & Engewald, 2014). Στα τρόφιμα, ανάλογα με τον τύπο των ενώσεων που πρόκειται να μετρηθούν, υπάρχουν διαφορετικοί ανιχνευτές καθένας από τους οποίους έχει πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα (Hajslova & Cajka, 2009). Ένας ανιχνευτής, ανιχνεύει τον αναλύτη από τη στήλη και τον καταγράφει με την μορφή χρωματογραφήματος. Τα σήματα που παράγονται είναι ανάλογα με την ποσότητα του αναλύτη, καθιστώντας έτσι δυνατή την ποσοτική ανάλυση του (McNair, et al., 2019). Οι ανιχνευτές ομαδοποιούνται με διαφορετικούς τρόπους, ανάλογα με τις χαρακτηριστικές τους ιδιότητες, σε καθολικούς και εκλεκτικούς. Οι καθολικοί ανταποκρίνονται σε όλα τα είδη ουσιών που εξέρχονται από την στήλη, ενώ οι εκλεκτικοί αφορούν καθορισμένα είδη ουσιών (Παππά, 2004).

Μερικοί από τους πιο συχνά χρησιμοποιούμενους ανιχνευτές είναι οι ανιχνευτές ιοντισμού φλόγας (Flame Ionization Detector – FID), οι θερμιοντικοί ανιχνευτές ή ανιχνευτές αζώτου-φωσφόρου (Nitrogen Phosphorus Detectors – NDP), οι ανιχνευτές φωτοϊοντισμού (Photoionization Detector – PID), οι ανιχνευτές σύλληψης ηλεκτρονίων (Electron-Capture detector – ECD) και οι ανιχνευτές θερμικής αγωγιμότητας (Thermal Conductivity Detector – TCD). Οι ανιχνευτές ιοντισμού φλόγας είναι οι πιο δημοφιλείς ανιχνευτές στη GC. Μπορούν και εντοπίζουν σχεδόν όλες τις οργανικές ενώσεις, ανταποκρίνονται σε χαμηλά όρια ανίχνευσης, χαρακτηρίζονται από μακροπρόθεσμη σταθερότητα, απλότητα λειτουργίας και γρήγορη απόκριση (Poole, 2015).

#### **4.6.5. Συζευγμένες τεχνικές (Hyphenated Techniques)**

Η ανάγκη για πιο σαφή αναγνώριση των συστατικών σύνθετων μιγμάτων αποτέλεσε κίνητρο για την ανάπτυξη διαφορετικών τεχνικών ενόργανης ζεύξης (tandem) (Guo, 2014). Η φασματομετρία μάζας (MS) αποτελεί τη βέλτιστη επιλογή ανιχνευτή στη χρωματογραφία, ωστόσο η τεχνική αυτή έχει και το μεγαλύτερο κόστος. Η ευαισθησία του φάσματος μάζας παρέχει τόσο ποιοτικές όσο και ποσοτικές πληροφορίες των προς ανάλυση ενώσεων (Harris, 2010). Με τη διασύνδεση του συστήματος της GC και του φασματόμετρου μαζών προκύπτει η τεχνική που είναι γνωστή ως GC/MS . Η αποδοτικότητα της μεθόδου αυξάνεται όταν ολόκληρη η διάταξη βρίσκεται υπό τον έλεγχο ηλεκτρονικού υπολογιστή (Χατζηιωάννου & Κούππαρης, 2005). Από την εισαγωγή

των κορυφαίων συσκευών τα μέσα της δεκαετίας του 1980, η GC/MS έγινε απαραίτητο εργαλείο όχι μόνο για την ανάλυση τροφίμων, αλλά και για την χημική (οργανική) ανάλυση γενικότερα (Tranchida, 2019). Η GC/MS αποτελεί μία εξαιρετικά ευνοϊκή σύζευξη καθώς καθίσταται δυνατή η ανάλυση ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους, μέσης ή χαμηλής πολικότητας και μικρών συγκεντρώσεων της τάξης των ppb έως ppm. Το μόνο πρόβλημα της ένωσης αυτών των δύο τεχνικών ήταν οι διαφορετικές πιέσεις λειτουργίας των δύο συσκευών ανάλυσης, κάτι που επιλύθηκε με την εισαγωγή της αντλίας κενού (Guo, 2014).

Όπως προαναφέρθηκε, η GC είναι η κορυφαία αναλυτική τεχνική για το διαχωρισμό πτητικών ενώσεων. Συνδυάζει υψηλή ταχύτητα ανάλυσης, ευκολία στη λειτουργία της, άριστα ποσοτικά αποτελέσματα και μέτριο κόστος. Δυστυχώς, αυτά τα συστήματα δεν μπορούν να επιβεβαιώσουν τη ταυτότητα ή τη δομή των ανιχνεύσιμων ενώσεων, κάτι που σημαίνει ότι τα δεδομένα από τη GC δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον εντοπισμό των κορυφών σε ένα χρωματογράφημα. Από την άλλη πλευρά, η MS είναι ένας από τους πιο σημαντικούς ανιχνευτές καθώς δίνουν πλούσιες πληροφορίες για τις αναλυόμενες ενώσεις. Απαιτεί μόνο νανογραμμάρια δείγματος και παρέχει δεδομένα και για την ποιοτική ταυτοποίηση των άγνωστων ενώσεων (όπως η δομή και το μοριακό τους βάρος), αλλά και για τον ποσοτικό προσδιορισμό τους (McNair, et al., 2019).

Μέχρι το τέλος της δεκαετίας το 1990, η τεχνική GC/MS ήταν η τεχνική επιλογής για τον προσδιορισμό φυτοφαρμάκων σε οποιαδήποτε μήτρα. Οι μόνες προϋποθέσεις τον αναλυτών για την εφαρμογή αυτής της τεχνικής ήταν η πτητικότητα και η θερμική σταθερότητά τους, η οποία είναι ένα εγγενές χαρακτηριστικό πολλών φυτοφαρμάκων. Σε αυτό το χρόνο, ο συνδυασμός και η εφαρμογή της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μάζας (LC/MS) παρουσίαζε πολλά τεχνικά προβλήματα (Pico, et al., 2020).

Τα πυρεθροειδή αποτελούν μια κατηγορία εντομοκτόνων, ιδιαίτερα διαδεδομένη παγκοσμίως, και χρησιμοποιούνται σε διάφορες ανθρώπινες δραστηριότητες. Παρά του μικρού χρόνου ζωής τους στο περιβάλλον, έχει αποδειχθεί ότι κατάλοιπά τους είναι παρόντα στο νερό και σε διάφορα ιζήματα, φύκια, στο τσάι και σε τρόφιμα όπως το βόειο κρέας, τα κοτόπουλα, τα αυγά, τα ψάρια και το γάλα. Σε μια

έρευνα, πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη μιας μεθόδου GC/MS με στόχο την επικύρωση 18 καταλοίπων πυρεθροειδών σε δείγματα ψαριών, χρησιμοποιώντας για την ανίχνευσή τους τη μέθοδο αυτή. Σε αυτό το έργο, δόθηκε ιδιαίτερη προσοχή στα βήματα εκκαθάρισης για την αποφυγή πιθανών παρεμβολών της μήτρας (Oliveira, et al., 2019).

Τα κατάλοιπα φυτοφαρμάκων στα φρούτα και τα λαχανικά αποτελούν μια από τις υψηλότερες ανησυχίες των καταναλωτών, γι' αυτό και είναι απαραίτητος ο έλεγχος τους. Μια άλλη μελέτη διεξάχθηκε με στόχο την ανίχνευση 48 υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων όπως τα οργανοφωσφορικά, τα οργανοχλωρικά, την τριαζίνη, τα πυρεθροειδή και άλλες χημικές ενώσεις. Σε 85 φρούτα και λαχανικά πραγματοποιήθηκε αυτός ο έλεγχος με την μέθοδο GC-MS. Τα αποτελέσματα της ανάλυσης έδειξαν ότι η μέθοδος αυτή αποτελεί ένα αποτελεσματικό και αξιόπιστο εργαλείο για την παρακολούθηση υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα αυτά (Hadian, et al., 2019).

#### **4.6.6. Εφαρμογές**

Η GC χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση κυρίως της χλωραμφαινικόλης σε διάφορα τρόφιμα, όπως σε θαλάσσια προϊόντα, σε ζωικούς ιστούς, στο μέλι και στο γάλα. Έχει επίσης εφαρμοστεί στην ανάλυση μείγματος τριών αμφενικολών. Η ανίχνευση τους επιτεύχθηκε με τον ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD) ή με φασματομετρία μάζας (ανιχνευτής MS) (Guidia, et al., 2017). Οι αναλύτες του δείγματος που επρόκειτο να αναλυθούν με GC σε πολλές περιπτώσεις πρέπει να μετατραπούν σε πτητικές ενώσεις μέσω της διαδικασίας της παραγωγοποίησης, έτσι ώστε να επιτευχθεί η ανίχνευση κτηνιατρικών υπολειμμάτων. Για παράδειγμα, η αμιτράζη και τα κατάλοιπα του μεταβολίτη της σε ζωικούς ιστούς ανιχνεύθηκαν με τη GC και την βοήθεια του ανιχνευτή ECD, ενώ η επιβεβαίωση αυτών έγινε με GC-MS χωρίς τη διαδικασία της παραγωγοποίησης. Επιπλέον, η λινκομυκίνη και η στρεπτομυκίνη ανιχνεύθηκε με τη GC και τη χρήση του ανιχνευτή NPD. Η GC δεν χρησιμοποιείται συχνά για τον προσδιορισμό κτηνιατρικών φαρμάκων λόγω της απαίτησης παραγωγοποίησης (Li, et al., 2020).

#### **4.7 Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography – LC)**

Η Υγρή Χρωματογραφία (Liquid Chromatography – LC) έχει δείξει μια αξιοσημείωτη πρόοδο όσον αφορά τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων και κτηνιατρικών φαρμάκων. Εφαρμόζεται ως μια τεχνική ρουτίνας σε πολλά εργαστήρια (Masia, et al.,

2016) και η ανίχνευση των φαρμάκων αυτών γίνεται με βάση την ταχεία κατανομή των ενώσεων μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης. Η Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High-performance liquid chromatography – HPLC) και η χρωματογραφία υπέρ-υψηλής απόδοσης (Ultra-high performance liquid chromatography – UHPLC) είναι δύο από τις τεχνικές που έχουν ως βάση την LC (Li, et al., 2020). Πριν την ανάπτυξη των πρώτων συστημάτων HPLC, η GC παρείχε ένα παράδειγμα για τις χαρακτηριστικές ικανότητες της HPLC, όπως είναι η αυτοματοποίηση, η ταχύτητα και η ευαισθησία (Fanali, et al., 2017). Μερικά από τα πλεονεκτήματα της HPLC είναι η ευρεία ποικιλία στατικής φάσης, η βελτιωμένη ανάλυση, η εφαρμογή πολλών ειδών ανιχνευτών και η εύκολη ανάκτηση του δείγματος (Nielsen, 2017).

#### **4.7.1. Σύνομη σύγκριση GC με LC**

Η σταθερή φάση στην LC μπορεί να είναι είτε ένα στερεό πορώδες υλικό είτε ένα στερεό υπόστρωμα στο οποίο βρίσκεται καθηλωμένο ένα υγρό. Αντίθετα με τη GC, στην LC τη κινητή φάση την αποτελεί κάποιο υγρό. Η μετακίνηση της υγρής κινητής φάσης μέσα από τη στατική φάση μπορεί να επιτευχθεί είτε λόγω βαρύτητας είτε λόγω της χρήσης υψηλής πίεσεως αντλιών (HPLC). Στη πρώτη περίπτωση, η στατική φάση αποτελείται από σωματίδια μεγάλης διαμέτρου επομένως και μικρής αντιστάσεως, ενώ στη δεύτερη η στατική φάση χαρακτηρίζεται από σωματίδια μικρής διαμέτρου και μεγάλης αντιστάσεως (Χατζηιωάννου & Κούππαρης, 2005).

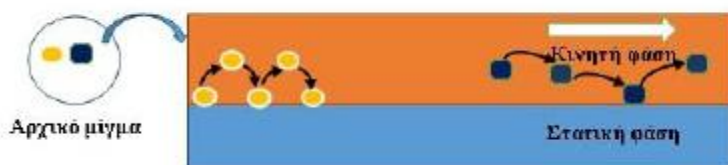
Η αύξηση της ταχύτητας με την οποία ισορροπεί μια ουσία ανάμεσα στη στατική και την κινητή φάση έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της αποδοτικότητας του χρωματογραφικού διαχωρισμού. Στη GC, για την επίτευξη αυτής της εξισορρόπησης καθίσταται απαραίτητη η μείωση της διαμέτρου των χρησιμοποιούμενων ανοιχτών σωληνοειδών στηλών, με αποτέλεσμα να επέρχεται η γρήγορη διάχυση των μορίων μεταξύ του σωλήνα του διαλύτη και της στατικής φάσης. Όσον αφορά τα υγρά, τα μόρια διαχέονται 100 φορές πιο αργά σε σχέση με τα αέρια. Αυτό σημαίνει ότι πρακτικά είναι αδύνατο να χρησιμοποιηθούν ανοιχτές στήλες στη LC, για το λόγο ότι η διάμετρος του σωλήνα είναι μεγάλη για να διασχιστεί από τα μόρια μιας ουσίας σε μικρό χρονικό διάστημα. Γι' αυτό στην LC χρησιμοποιούνται πληρωμένες στήλες (Harris, 2010). Επομένως, η LC είναι μια σχετικά αργή τεχνική, ενώ στη GC η ανάλυση είναι ταχύτερη και διαρκεί λίγα λεπτά ή ακόμα και λίγα δευτερόλεπτα.

Μια άλλη σημαντική διαφορά είναι ότι η LC χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό οποιασδήποτε διαλυτής ένωσης π.χ. αμινοξέα, πρωτεΐνες, φάρμακα, νουκλεϊκά οξέα, λιπίδια, υδατάνθρακες, αντιοξειδωτικά και φυσικά ή τεχνητά πολυμερή, σε αντίθεση με τη GC η οποία μπορεί να εφαρμοστεί μόνο για το διαχωρισμό πτητικών ενώσεων και αέριων μειγμάτων. Η LC συνήθως πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου, έτσι ώστε οι ευαίσθητες στη θερμότητα ενώσεις να μπορούν να αναλυθούν με ασφάλεια. Απεναντίας η GC, εκτελείται σε υψηλότερες θερμοκρασίες με αποτέλεσμα οι θερμικά ασταθείς ουσίες να μετουσιώνονται. Τέλος, στην LC χρησιμοποιούνται πολικοί διαλύτες όπως το νερό ή η μεθανόλη, σε αντίθεση με τη GC στην οποία επιλέγονται μόνο διαλύτες οι οποίοι εξατμίζονται (Cheriyedath, 2019).

#### 4.7.2 Αρχή μεθόδου HPLC

Η HPLC βασίζεται στη διαφορά της μετατόπισης των συστατικών ενός μίγματος, η οποία προέρχεται από το διαφορετικό βαθμό αλληλεπίδρασής τους με τη κινητή και τη στατική φάση. Στηρίζεται δηλαδή στη φυσικοχημική συγγένεια των συστατικών με την κάθε φάση.

Στην **Εικόνα 15** παρουσιάζεται ο διαχωρισμός των συστατικών ενός διαλύματος, με βάση το διαφορετικό βαθμό αχιστείας των συστατικών του μίγματος μεταξύ των δύο φάσεων μέσα στη στήλη διαχωρισμού. Όπως φαίνεται το μπλε μόριο αλληλοεπιδρά ισχυρότερα με τη κινητή φάση επομένως κατανέμεται πιο σημαντικά σε αυτή και παρασύρεται από αυτή γρηγορότερα. Από την άλλη πλευρά, το κίτρινο μόριο δεν αλληλοεπιδρά ισχυρά με την κινητή φάση, αλλά με τη στατική, με αποτέλεσμα να συγκρατείται ισχυρότερα σε αυτή και να επιβραδύνεται η κίνησή του. Ο διαχωρισμός των δύο αυτών μορίων του δείγματος οφείλεται στη διαφορά ταχύτητας της κίνησής τους (Τσότσου, 2015).



Εικόνα 15. Διαχωρισμός συστατικών διαλύματος με τη μέθοδο HPLC

### 4.7.3. Οργανολογία HPLC

Ένα σύστημα HPLC περιλαμβάνει τα παρακάτω μέρη:

- Δεξαμενή διαλύτη: Τα περιεχόμενα της κινητής φάσης βρίσκονται μέσα σε ειδικά γυάλινα δοχεία. Στην HPLC η κινητή φάση ή ο διαλύτης είναι ένα μίγμα πολικών και μη πολικών υγρών συστατικών.
- Αντλία: Η αντλία αναρροφά τη κινητή φάση από τη δεξαμενή του διαλύτη και τη μεταφέρει στη στήλη, ώστε στη συνέχεια να περάσει από τον ανιχνευτή. Η πίεση λειτουργίας της αντλίας είναι τα 40.000 KPa. Η εφαρμοσμένη πίεση εξαρτάται από το μέγεθος των σωματιδίων, το ρυθμό ροής και τη σύνθεση της κινητής φάσης.
- Σύστημα εισαγωγής του δείγματος: Ένας εγχυτήρας στα πλαίσια της μεθόδου HPLC θα πρέπει να είναι ικανός να εγχέει δείγματα υγρού όγκου εντός του εύρους 0,1 mL – 100 mL, με υψηλή αναπαραγωγικότητα και υπό υψηλή πίεση (έως 4000 psi).
- Στήλες: Βασικό μέρος του συστήματος αποτελούν οι στήλες. Το οξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ ) είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη ουσία για την κατασκευή αυτών των υλικών. Στην HPLC χρησιμοποιούνται συνήθως δύο τύποι στηλών, οι στήλες κανονικής φάσης και οι στήλες ανάστροφης φάσης. Η χρήση χρωματογραφίας κανονικής φάσης, ιδιαίτερα μη πολικών και μέτρια πολικών φαρμάκων μπορεί να προκαλέσει εξαιρετικά αποτελέσματα διαχωρισμού.
- Ανιχνευτές: Οι ανιχνευτές ανταποκρίνονται σε μια φυσική ιδιότητα της διαλυμένης ουσίας και πιο συγκεκριμένα τη μετρούν, είτε με, είτε χωρίς την αφαίρεση της κινητής φάσης πριν από την ανίχνευση. Ανιχνευτές οι οποίοι δεν απαιτούν την αφαίρεση της κινητής φάσης είναι φασματοφωτομετρικοί ανιχνευτές (UV ή UV-Vis), ανιχνευτές φθορισμού και ηλεκτροχημικής ιδιότητας, ενώ ανιχνευτές ιονισμού φλόγας ή ανιχνευτές δέσμησης ηλεκτρονίων απαιτούν την αφαίρεση της κινητής φάσης πριν από τον εντοπισμό.
- Σύστημα συλλογής και επεξεργασίας δεδομένων: Τα σήματα από τον ανιχνευτή συγκεντρώνονται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, ο οποίος επεξεργάζεται, αποθηκεύει και ξανά επεξεργάζεται χρωματογραφικές πληροφορίες (Gorhe & Pawar, 2018).

#### 4.7.4 Συζευγμένες τεχνικές

Οι περισσότερες από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανάλυση πολλαπλών υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων είναι η LC σε συνδυασμό με άλλα συστήματα (Piatkowska, et al., 2016). Σήμερα, η υγρή χρωματογραφία με ανίχνευση υπεριώδους (LC-UV), ή συζευγμένη με φασματόμετρο μάζας (LC-MS) και με φασματόμετρο υψηλής ανάλυσης (LC-HRMS), είναι από τις πιο ισχυρές τεχνικές για την αντιμετώπιση ζητημάτων που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων και την εγγύηση της γνησιότητας τους (Nunez & Lucci, 2020).

Οι περισσότερες εξελίξεις στην ανάλυση καταλοίπων πολύ μικρών συγκεντρώσεων στα τρόφιμα οφείλονται στην εφαρμογή της LC-MS. Η τεχνική αυτή αποτελεί το πιο ισχυρό εργαλείο για πολικές οργανικές ενώσεις της τάξεως του mg/kg, ακόμα και του ng/kg, επίπεδα που παρέχουν την κατάλληλη ευαισθησία, επιλεκτικότητα και ειδικότητα που απαιτείται για τη συμμόρφωση στις τρέχουσες νομοθεσίες σχετικά με τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια υπολειμμάτων σε δείγματα τροφίμων. Από τα τέλη της δεκαετίας του 1990, η βελτίωση των δυνατοτήτων ανίχνευσης της LC-MS έχει αυξήσει τη χρήση στον έλεγχο, στην επιβεβαίωση και στην ποσοτικοποίηση υπολειμμάτων φαρμάκων στα τρόφιμα (Masia, et al., 2016). Σε ένα τυπικό σύστημα LC-MS, το δείγμα που αναλύεται, αρχικά διαχωρίζεται στο σύστημα LC και στη συνέχεια το κλάσμα που εκλύεται από τη χρωματογραφική στήλη υποβάλλεται σε ιονισμό και εισάγεται στο φασματόμετρο (Stachniuk & Fornal, 2016).

Επιπρόσθετα, η LC σε συνδυασμό με φασματόμετρο μαζών τριπλού τετραπόλου (LC-MS/MS) επιτρέπει την εξαιρετικά επιλεκτική και ευαίσθητη ποσοτικοποίηση και την επιβεβαίωση περισσότερων από εκατό αναλυτών στόχων σε μία μόνο ανάλυση (Masia, et al., 2016). Ωστόσο, αποτελεί μια ιδιαίτερα ακριβή τεχνική και συνήθως συμβαίνει καταστολή ή αύξηση του παραγόμενου σήματος. Η μεταβολή αυτή οφείλεται στον ανταγωνιστικό ιονισμό μεταξύ των ενδογενών μορίων που υπάρχουν στη μήτρα του δείγματος και του αναλύτη στόχου (Hoga, et al., 2018).

Η σύζευξη της HPLC με φασματόμετρο τριπλού τετραπόλου παρέχει υψηλότερη ειδικότητα και ευαισθησία σε σύγκριση με τη συμβατική HPLC ή με την τεχνική LC-MS. Ειδικά ο συνδυασμός της UHPLC με τη διαδοχική φασματομετρία μαζών (MS/MS)



προσδίδει επαρκή ευαισθησία για τον προσδιορισμό απαγορευμένων ουσιών (Piatkowska, et al., 2016).

#### **4.7.5 Εφαρμογές**

Η HPLC σε συνδυασμό με ανιχνευτή φθορισμού εφαρμόστηκε στην ανάλυση της ενροφλοξακίνης σε βρώσιμα μέρη κοτόπουλου, καθώς επίσης και στην ανίχνευση κινολονών σε δείγματα γάλακτος. Επιπλέον η ίδια τεχνική με τη χρήση ανιχνευτή υπεριώδους (UV) χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση καταλοίπων σουλφοναμίδης σε χοιρινό κρέας και κοτόπουλα, αλλά και για τον εντοπισμό υπολειμμάτων β-αγωνιστών στα ίδια τρόφιμα, τετρακυκλινών σε δείγματα γάλακτος και ατραζίνης σε μέλι (Li, et al., 2020).

Λόγω του μεγάλου αριθμού των προϊόντων που πρέπει να ελέγχονται για την πιθανή παρουσία καταλοίπων κτηνιατρικών φαρμάκων, ήταν απαραίτητη η ανάπτυξη μια βελτιωμένης τεχνικής LC-MS/MS, με στόχο την εφαρμογή της σε πρώτες ύλες όπως το γάλα, το κρέας, τα ψάρια (θαλασσινά), τα αυγά και το λίπος. Σε μια παγκόσμια επιχείρηση τροφίμων τα περισσότερα από αυτά τα εμπορεύματα αποτελούν αντικείμενο διαπραγμάτευσης αφού πρώτα υποστούν επεξεργασία ώστε να αποκτήσουν μορφή σκόνης και στη συνέχεια ενσωματωθούν σε συνταγές. Συνεπώς τέτοια υλικά σε σκόνη (π.χ. σκόνη βόειου κρέατος και σκόνες κρόκου αυγού) είναι απαραίτητο να ελέγχονται. Μια συγκεκριμένη μελέτη αναπτύχθηκε με στόχο την ανίχνευση καταλοίπων β-λακταμών, αμινογλυκοσίδων, τετρακυκλινών και άλλων κτηνιατρικών φαρμάκων στα υλικά αυτά (Delatour, et al., 2018).

Η χρήση ορμονών σε ζώα που παράγουν τρόφιμα διαφέρει ως προς τη νομιμότητά της μεταξύ των διαφορετικών χωρών. Πιο συγκεκριμένα η Ευρωπαϊκή Ένωση απαγορεύει τη χρήση ουσιών με ορμονική ή θυρεοστατική δράση και β-αγωνιστών στη παραγωγή τροφίμων από ζώα, συμπεριλαμβανόμενης και της υδατοκαλλιέργειας. Για τον ποσοτικό προσδιορισμό ορμονών σε αλιευτικά προϊόντα η επί του παρόντος συνιστώμενη αναλυτική τεχνική είναι η LC-MS/MS, αν και σπάνια έχει αναφερθεί (Hoga, et al., 2018). Τα τελευταία χρόνια, επίσης, η ίδια τεχνική έχει εφαρμοστεί στην ανάλυση πολυπεπτιδικών αντιβιοτικών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Για παράδειγμα, μια ομάδα ερευνητών ανέπτυξε μια ποσοτική μέθοδο για την ανίχνευση της βακιτρακίνης A και της κολιστίνης A σε δείγματα βοοειδών, ενώ στη συνέχεια επέκτεινε το πεδίο

εφαρμογής της μεθόδου και στον προσδιορισμό της κολιστίνης Β σε δείγματα πουλερικών και χοίρων (Bladek , et al., 2020).

Όσον αφορά τα φυτοφάρμακα, η υψηλή επιλεκτικότητα που παρέχεται από τη μέθοδο LC-MS/MS επιτρέπει τον προσδιορισμό πολλών φυτοφαρμάκων, διαφορετικών χημικών οικογενειών. Για το σκοπό αυτό διεξάχθηκε ερευνητική μελέτη σε κατεψυγμένα και φρέσκα φρούτα και λαχανικά τα οποία αγοράστηκαν από πολωνούς αγρότες. Σε αρκετά δείγματα παρατηρήθηκαν κατάλοιπα δύο ή περισσότερων φυτοφαρμάκων, ενώ ο συνολικός αριθμός φυτοφαρμάκων που καταγράφηκαν ήταν δεκαπέντε. Ανάμεσά σε αυτά, τα πιο συχνά ανιχνεύσιμα ήταν η καρβενδαζίμη, η ακεταμιπρίδη, η μεταμιτρόνη κ.α. (Stachniuk, et al., 2017). Ενώ η εφαρμογή της μεθοδολογίας LC-MS/MS για την ανάλυση πυρεθροειδών στα τρόφιμα δεν είναι ευρέως διαδεδομένη, πολλές ομάδες έχουν αναπτύξει μεθόδους για τον προσδιορισμό των μεταβολιτών πυρεθροειδών φυτοφαρμάκων ή των μετασχηματισμένων προϊόντων, τα οποία είναι γενικά πτητικά και καταλληλότερα για την ανάλυση με τη μέθοδο αυτή (Tuck, et al., 2018).

Σε ένα άλλο εργαστήριο, η μέθοδος που εφαρμόστηκε για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων κτηνιατρικών φαρμάκων σε τρόφιμα όπως τα ψάρια, οι γαρίδες και το χέλι ήταν η LC-HRMS (Turnipseed, et al., 2019). Η εφαρμογή της μεθόδου αυτής έχει αναφερθεί και για τον προσδιορισμό είκοσι τεσσάρων σουλφοναμιδίων σε δείγματα γάλακτος και μελιού (Li, et al., 2020). Αν και η LC-MS/MS είναι σήμερα από τις πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες τεχνικές ανίχνευσης καταλοίπων φυτοφαρμάκων στα τρόφιμα, η LC-HRMS έχει αρχίσει και χρησιμοποιείται συχνότερα, καθώς παρέχει μεγαλύτερη εκλεκτικότητα και εκτενέστερη ανάλυση. Ωστόσο, η έλλειψη ευαισθησίας σε σχέση με την LC-MS/MS απαιτεί την έγχυση μεγαλύτερης ποσότητας δείγματος. Γι' αυτό αναμένεται βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου, ώστε να επιτραπεί η αποτελεσματική εφαρμογή της σε περισσότερο πολύπλοκες μήτρες, όπως είναι τα μπαχαρικά (Vazquez, et al., 2019).

## Συμπεράσματα

Φάρμακα όπως είναι τα αντιπαρασιτικά, τα αντικοκκιδιακά, τα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη, και κυρίως τα αντιβιοτικά, χρησιμοποιούνται ευρέως στην κτηνοτροφία και στην υδατοκαλλιέργεια με σκοπό την προστασία των εκτρεφόμενων ζώων από διάφορες ασθένειες. Η χρήση τους, επιπλέον, αποσκοπεί στην προώθηση της ανάπτυξής τους, αλλά και στη θεραπεία τους από ασθένειες οφειλόμενες σε βακτήρια, παράσιτα και άλλους μικροοργανισμούς. Για τους ίδιους λόγους γίνεται και η εφαρμογή των φυτοφαρμάκων σε τρόφιμα όπως τα λαχανικά και τα φρούτα.

Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί η ανίχνευση καταλοίπων των παραπάνω φαρμακευτικών ουσιών στα βρώσιμα προϊόντα των ζώων, που προορίζονται για ανθρώπινη κατανάλωση. Επιπρόσθετα, η υπέρμετρη εφαρμογή των ουσιών αυτών, και ιδιαίτερα των αντιβιοτικών, έχει συμβάλλει στην ανάπτυξη του φαινομένου της μικροβιακής αντίστασης. Πιο συγκεκριμένα, πολλά βακτήρια αποκτούν ανθεκτικότητα στις φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την προστασία των ζώων και των φυτών, με αποτέλεσμα να μη θανατώνονται και να αναπαράγονται στον ζωικό οργανισμό, με άμεση απόρροια τον κίνδυνο της υγείας του ανθρώπου.

Για την αντιμετώπιση των παραπάνω προβλημάτων έχουν θεσπιστεί, σε διεθνές επίπεδο, τα μέγιστα επιτρεπόμενα όρια υπολειμμάτων (MRLs) για κάθε τρόφιμο, το οποίο προορίζεται για ανθρώπινη κατανάλωση. Για την επίλυση του ζητήματος της ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα αντιβιοτικά, είναι απαραίτητη η εφαρμογή πρωτοκόλλων για την επιλογή του κατάλληλου αντιβιοτικού φαρμάκου, της χορηγούμενης δοσολογίας και της χρονικής διάρκειας λήψης του. Ωστόσο, σύμφωνα με μελέτες η παγκόσμια κατανάλωση αντιβιοτικών σε ζώα αναμένεται να αυξηθεί ραγδαίως τα επόμενα χρόνια.

Με στόχο τη διαφύλαξη της ποιότητας των προϊόντων και τα ασφάλειας του καταναλωτή, τα βρώσιμα μέρη των ζώων, τα προϊόντα τους (κρέας, γάλα, αυγά, μέλι κ.α.) και τα τρόφιμα στα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί χημικές ουσίες όπως τα φυτοφάρμακα (φρούτα και λαχανικά), είναι απαραίτητο να ελέγχονται εργαστηριακά, ώστε να ανιχνεύονται πιθανά κατάλοιπα των χρησιμοποιούμενων φαρμακευτικών ουσιών. Ο έλεγχος αυτός απαρτίζεται από δύο βασικά μέρη: α) τις μεθόδους

προετοιμασίας των δειγμάτων και β) τις αναλυτικές τεχνικές. Οι μέθοδοι αυτοί, αλλά και ο συνδυασμός τους, επιδιώκουν όχι μόνο την ποιοτική ανάλυση, αλλά και την ποσοτικοποίηση των ενδιαφερόμενων αναλυτών.

Όσον αφορά τις μεθόδους επεξεργασίας δειγμάτων, η εκχύλιση αποτελεί μια από τις πιο συχνά εφαρμοζόμενες, και σχετικά απλές, τεχνικές διαχωρισμού. Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ισορροπία μια ένωσης μεταξύ δύο μη αναμιγνυόμενων φάσεων και περιλαμβάνει διάφορες παραλλαγές της όπως η εκχύλιση στερεής φάσης (SPE), η μικροεκχύλιση στερεής φάσης (SPME) και η εκχύλιση υγρού-υγρού (LLE). Η χρήση των μοριακών αποτυπωμάτων (MIPs) αποτελεί μια νέα τεχνολογία, κατά την οποία τα MIPs χρησιμοποιούνται ως προσροφητικά υλικά σε μεθόδους όπως η SPE και η SPME. Η αρχή λειτουργίας τους βασίζεται στη δημιουργία μοριακών αποτυπωμάτων πολυμερούς, τα οποία είναι ικανά να αναγνωρίσουν τον αναλύτη-στόχο σε διάφορες μήτρες τροφίμων. Τέλος, μια νέα μέθοδος, επονομαζόμενη QuEChERS, έχει αποκτήσει μεγάλη δημοτικότητα και αποτελεί μια παραλλαγή της μεθόδου SPE.

Σχετικά με τις αναλυτικές τεχνικές προσδιορισμού υπολειμμάτων φαρμακευτικών ουσιών στα τρόφιμα, ο διαχωρισμός τους γίνεται σε τρεις κατηγορίες: τις μικροβιακές, τις ανοσολογικές και τις φυσικοχημικές. Οι μικροβιολογικές δοκιμές στηρίζονται σε δοκιμασίες μικροβιακής ανάπτυξης κατά τις οποίες, συνήθως τρυβλία, εμβολιάζονται με βακτήρια πριν την εισαγωγή του δείγματος και ελέγχεται η παρουσία των αντιβιοτικών ανάλογα με την ανάπτυξη ή όχι των βακτηρίων. Η ενζυμική ανοσοδοκιμασία ELISA αποτελεί μια άλλη μέθοδο προσδιορισμού, με βασική αρχή της την ειδική σύνδεση του ενδιαφερόμενου αντιγόνου με κάποιο αντίσωμα. Υπάρχουν πολλές κατηγορίες της μεθόδου όπως η άμεση και έμμεση ELISA, ανταγωνιστικού τύπου ή μη και η Sandwich ELISA. Η προσθήκη των νανοϋλικών στη μέθοδο ELISA, ώθησε στη βελτίωση της απόδοσής της, αναφορικά με τις εφαρμογές της στα τρόφιμα.

Μια νέα σχετικά μέθοδος υψηλής απόδοσης, αυτή των βιοαισθητήρων, αποτέλεσε σημαντικό πυλώνα στον προσδιορισμό κτηνιατρικών φαρμάκων σε δείγματα τροφίμων. Τα δύο κυριότερα μέρη των βιοαισθητήρων, οι βιοϋποδοχείς (αντισώματα, ένζυμα, απταμερή, ολόκληρα κύτταρα, MIPs) και οι μεταλλάκτες σήματος (ηλεκτροχημικοί, βαρομετρικοί, οπτικοί, θερμικοί), διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο καθώς διαφοροποιούνται και επιλέγονται με βάση τον αναλύτη-στόχο. Ωστόσο, η

μέθοδος των βιοαισθητήρων έχει ακόμη δυνατότητες εξέλιξης. Αναφορικά με την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (CE), η μέθοδος αυτή συνδυάζει την αποτελεσματικότητα της ηλεκτροφόρησης μέσα σε ειδικούς τριχοειδικούς σωλήνες, μέσα στους οποίους επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός της επιθυμητής ένωσης, σύμφωνα με την ηλεκτροωσμωτική και την ηλεκτροφορητική ροή των διαλυμάτων και των συστατικών.

Το φασματομέτρο μάζας, αφορά έναν τύπο ανιχνευτή ο οποίος μπορεί να συνδυαστεί τόσο με την CE, όσο και με χρωματογραφικές τεχνικές. Η λειτουργία του στηρίζεται στο διαχωρισμό των παραχθέντων ιόντων σύμφωνα με το λόγο  $m/z$  τους. Η αποδοτικότητα της φασματομετρίας μάζας (MS) ενισχύεται με τον συνδυασμό δύο ίδιων ή διαφορετικών φασματομέτρων (tandem mass spectrometry). Κλείνοντας, οι χρωματογραφίες αποτελούν τις συνηθέστερες μεθόδους ανάλυσης, καθώς οι περισσότερες αναφορές αναλύσεων καταλοίπων τροφίμων στηρίζονται στη χρήση της LC-MS/MS. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες, η αέρα (GC) και η υγρή χρωματογραφία (LC), για τις οποίες ισχύει η ίδια αρχή λειτουργίας. Πιο συγκεκριμένα, ο διαχωρισμός των επιθυμητών ενώσεων στηρίζεται στην κατανομή τους μεταξύ δύο φάσεων, μιας στατικής και μίας κινητής (αέριας ή υγρής), με την τελευταία να καθίσταται η φάση μεταφοράς του δείγματος προς ανάλυση.

Δεδομένου ότι η ασφάλεια της υγείας του καταναλωτή είναι ύψιστης σημασίας, οι αναλυτικές τεχνικές ελέγχου των δειγμάτων τροφίμων είναι αναγκαίες. Με την είσοδο νέων τεχνολογιών και μεθόδων διαχείρισης των ζώων και των βρώσιμων προϊόντων τους, η εξέλιξη των μεθόδων διαχωρισμού και ανάλυσης αποτελεί πολύ σημαντικό επίτευγμα. Στόχος είναι η δημιουργία απλουστευμένων τεχνικών, με δυνατότητα ανάλυσης πολλαπλών δειγμάτων σε σύντομο χρονικό διάστημα, ενώ ταυτόχρονα επιδιώκεται και η ελαχιστοποίηση των λαθών που σχετίζονται με την αναλυτική μέθοδο. Τέλος, από ανθρώπινης πλευράς είναι απαραίτητη η συνετή χρήση και χορήγηση φαρμακευτικών ουσιών, και κυρίως αντιβιοτικών, στα εκτρεφόμενα ζώα και στις καλλιέργειες τροφίμων.

## Αναφορές

Ahmed, S. et al., 2020. Current advances in immunoassays for the detection of antibiotics residues: a review. *Food and Agricultural Immunology*, pp. 268-290.

AL-Bukhaiti, W. Q., Noman, A., Qasim, A. S. & AL-Farga, A., 2017. Gas chromatography: Principles, advantages and applications in food analysis. *International Journal of Agriculture Innovations and Research*, pp. 123-128.

Alcântara, D. B. et al., 2019. Diagnostic detection systems and QuEChERS methods for multiclass pesticide analyses in different types of fruits: An overview from the last decade. *Food Chemistry*, p. 124958.

Ambrus, A. & Zhen, Y. Y., 2015. Global harmonization of maximum residue limits (MRLs) for pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, pp. 30-35.

Ashley, J. et al., 2017. Molecularly imprinted polymers for sample preparation and biosensing in food analysis: Progress and perspectives. *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 606-615.

Aydin, S., 2015. A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, pp. 4-15.

Beyene, T., 2016. Veterinary Drug Residues in Food-animal Products: Its Risk Factors and Potential Effects on Public Health. *Veterinary Science & Technology*, pp. 1-7.

Bindu, S., Mazumder, S. & Bandyopadhyay, U., 2020. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A. *Biochemical Pharmacology*, p. 114147.

Bladek , T., Szymanek-Bany, I. & Posyniak, A., 2020. Determination of Polypeptide Antibiotic Residues in Food of Animal Origin by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Molecules*, p. 3261.

Bunney, J. et al., 2017. The Use of Electrochemical Biosensors in Food Analysis. *Current Research in Nutrition and Food Science*, pp. 183-195.

Calhoun, C., Wermuth, H. R. & Hall, G. A., 2020. *Antibiotics*. [Ηλεκτρονικό] Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535443/>

Chafer-Pericas, C., Maquieira, A. & Puchades, R., 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, pp. 1038-1049.

Chang, P.-L., Hsieh, M.-M. & Chiu, T.-C., 2016. Recent advances in the determination of pesticides in environmental samples by capillary electrophoresis. *International journal of environmental research and public health*, p. 409.

Chawla, P., Kaushik, R., Swaraj, S. V. & Kumar, N., 2018. Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, pp. 292-307.

Chen, T. et al., 2017. New methodologies in screening of antibiotic residues in animal-derived foods: Biosensors. *Talanta*, pp. 436-442.

Cheriyedath, S., 2019. *Liquid Chromatography versus Gas Chromatography*, s.l.: News-Medical.

Claußen, M., Bahmann, D. & Schmidt, S., 2013. Detection of antibiotic residues in food – pitfalls and optimization of agar diffusion tests in comparison with commercial test kits. *Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science, Technology and Education 1*, pp. 359-366.

Colombo, R. & Papetti, A., 2019. Advances in the analysis of veterinary drug residues in food matrices by capillary electrophoresis techniques. *Molecules*, p. 4617.

Coskun, O., 2016. Separation techniques: chromatography. *Northern clinics of Istanbul*, p. 156.

de Jong, G., 2016. *Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry (CE-MS)*. s.l.:Wiley-VCH.

Delatour, T., Racault, L., Bessaire, T. & Desmarchelier, A., 2018. Screening of veterinary drug residues in food by LC-MS/MS. Background and challenges. *Food Additives & Contaminants: Part A*, pp. 633-646.

Dettmer-Wilde, K. & Engewald, W., 2014. *Practical Gas Chromatography: A Comprehensive Reference*. s.l.:Springer.

Dominguez, I., Frenich, A. G. & Romero-González, R., 2020. Mass spectrometry approaches to ensure food safety. *Analytical Methods*, pp. 1148-1162.

Durand, G. A., Raoult, D. & Dubourg, G., 2019. Antibiotic discovery: history, methods and perspectives. *International Journal of Antimicrobial Agents*, pp. 371-382.

Dyary, H. O., 2016. Veterinary Anthelmintics and Anthelmintic Drug Resistance. *Journal of Zankoy Sulaimani*, pp. 191-206.

Elbashir, A. A. & Aboul-Enein, H. Y., 2014. Separation and analysis of triazine herbicide residues by capillary electrophoresis. *Biomedical Chromatography*, pp. 835-842.

Fanali, S., Haddad, P. R., Poole, C. & Riekkola, M.-L., 2017. *Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation*. 2 ed. s.l.:Elsevier.

Fumes, B. H. et al., 2015. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 9-25.

Gan, S. D. & Patel, K. R., 2013. Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*, p. e12.

García-Campaña, A. M. et al., 2009. Applications of capillary electrophoresis to the determination. *Analytical and bioanalytical chemistry*, pp. 967-986.

Garcia, C. V. & Gotah, A., 2017. Application of QuEChERS for Determining Xenobiotics in Foods of Animal Origin. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*.

Gaudin, V., 2017. Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review. *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 363-377.

González-Curbelo, M. et al., 2015. Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 169-185.

Gorhe, S. & Pawar, G., 2018. A Review on High Performance Liquid Chromatography (HPLC). *International Journal of Advances Scientific Research*.

Griesche, C. & Baeumner, A. J., 2020. Biosensors to support sustainable agriculture and food safety. *Trends in Analytical Chemistry*, p. 115906.

Guidia, L. R. et al., 2017. Advances on the chromatographic determination of amphenicols in food. *Talanta*, pp. 324-338.

Guo, X., 2014. *Advances in Gas Chromatography*. s.l.:IntechOpen.

Hadian, Z., Eslamizad, S. & Yazdanpanah, H., 2019. Pesticide Residues Analysis in Iranian Fruits and Vegetables by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, pp. 275-285.

Hajslova, J. & Cajka, T., 2009. Gas Chromatography. Στο: *Handbook of Food Analysis Instruments*. s.l.:CRC Press.

Harris, D. C., 2010. *Ποσοτική Χημική Ανάλυση*. s.l.:Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.

Hird, S. J., Lau, B. P.-Y., Schuhmacher, R. & Krska, R., 2014. Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 59-72.

Hoga, C. A., Almeida, F. L. & Reyes, F. G. R., 2018. A review on the use of hormones in fish farming: Analytical methods to determine their residues. *CyTA - Journal of Food*, pp. 679-691.

Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M. & Martínez-Chapa, S. O., 2018. *Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): from A to Z*. s.l.:Springer.

Ibrahim, I. G. et al., 2016. Methods for Screening Veterinary Drug Residues in Animal Products: A review. *Sudan Journal of Veterinary Research*, pp. 1-9.

Jalili, V., Barkhordari, A. & Ghiasvand, A., 2020. A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. *Microchemical Journal*, p. 104319.

Jayalakshmi, K. et al., 2017. Review on antibiotic residues in animal products and its impact on environments and human health. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, pp. 1446-1451.

Jia, M., Zhai, F. & Bing, X., 2020. Rapid Multi-Residue Detection Methods for Pesticides and Veterinary Drugs. *molecules*, p. 3590.

Jia, M., Zhai, F. & Bing, X., 2020. Rapid Multi-Residue Detection Methods for Pesticides and Veterinary Drugs. *Molecules*, p. 3590.

Kadykalo, S. et al., 2018. The value of anticoccidials for sustainable global poultry production. *International Journal of Antimicrobial Agents*, pp. 304-310.



Kaur, G. & Sharma, S., 2018. Gas Chromatography – A Brief Review. *International Journal of Information and Computing Science*, pp. 125-131.

Khaled, A. et al., 2019. Development and validation of a fully automated solid phase microextraction high throughput method for quantitative analysis of muliresidue veterinary drugs in chicken tissue. *Analytica Chimica Acta*, pp. 34-46.

Khansili, N., Rattu, G. & Krishna, P. M., 2018. Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, pp. 35-49.

Kharewal, T., Verma, N., Gahlaut, A. & Hooda, V., 2020. Biosensors for penicillin quantification: a comprehensive review. *Biotechnology Letters*, pp. 1-18.

Khatibi, S. A., Hamidi, S. & Siahi-Shadbad, M. R., 2020. Application of liquid-liquid extraction for the determination of antibiotics in the foodstuff: recent trends and developments. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 1-16.

Kilinc, B. & Cakli, S., 2008. Screening for antibiotic residues in the trout by the Four Plate test, Premi test and ELISA test. *European Food Research and Technology*, pp. 795-799.

Kilinc, B., Meyer, C. & Hilge, V., 2007. Evaluation of the EEC four-plate test and Premi test for screening antibiotic residues in trout (*Salmo trutta*). *International Journal of Food Science and Technology*, pp. 625-628.

Kim, L., Lee, D., Cho, H.-K. & Choi, S.-D., 2019. Review of the QuEChERS method for the analysis of organic pollutants: Persistent organic pollutants, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pharmaceuticals. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, p. e00063.

Kinter, L. B. & DeGeorge, J. J., 2016. Scientific Knowledge and Technology, Animal Experimentation, and Pharmaceutical Development. *ILAR Journal*, pp. 101-108.

Kirchhelle, C., 2018. Pharming animals: a global history of antibiotics in food production (1935-2017). *Palgrave Communications*, pp. 1-13.

Kleparnik, K., 2015. Recent advances in combination of capillary electrophoresis with mass spectrometry: Methodology and theory. *Electrophoresis*, pp. 159-178.

Lehotay, S. J., Sapozhnikova, Y. & Mol, H. G., 2015. Current issues involving screening and identification of chemical contaminants in foods by mass spectrometry. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 62-75.

Li, S. et al., 2020. Determination of veterinary drug residues in food of animal origin: Sample preparation methods and analytical techniques. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, pp. 701-724.

Liu, X., Steele, J. C. & Meng, X.-Z., 2017. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: A review. *Environmental Pollution*, pp. 161-169.

Li, Z., 2018. Evaluation of regulatory variation and theoretical health risk for pesticide maximum residue limits in food. *Journal of Environmental Management*, pp. 153-167.

Lopez Romo, A. & Quiros, R., 2019. Appropriate use of antibiotics: an unmet need. *Therapeutic Advances in Urology*, pp. 9-17.

Majdinasab, M., Mishra, R. K., Tang, X. & Marty, J. L., 2020. Detection of antibiotics in food: New achievements in the development of biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, p. 115883.

Manyi-Loh, C., Mamphweli, S., Mayer, E. & Okoh, A., 2018. Antibiotic Use in Agriculture and Its Consequential Resistance in Environmental Sources: Potential Public Health Implications. *molecules*, p. 795.

Masia, A., Suarez-Varela, M. M., Llopis-Gonzalez, A. & Pico, Y., 2016. Determination of pesticides and veterinary drug residues in food by liquid chromatography-mass spectrometry: A review. *Analytica Chimica Acta*, pp. 40-61.

McNair, H. M., Miller, J. M. & Snow, N. H., 2019. *Basic Gas Chromatography*. s.l.:John Wiley & Sons.

Merkle, S., Kleeberg, K. K. & Fritsche, J., 2015. Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis - A review. *Chromatography*, pp. 293-381.

Mishra, G. K., Barfidokht, A., Tehrani, F. & Mishra, R. K., 2018. Food Safety Analysis Using Electrochemical Biosensors. *Foods*, p. 141.

Moreno-González, D. et al., 2017. Evaluation of a multiresidue capillary electrophoresis-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry method for the determination of antibiotics in milk samples. *Journal of Chromatography A*, pp. 100-107.

Moreno-Gonzalez, D. et al., 2015. Determination of aminoglycosides in honey by capillary electrophoresis tandem mass spectrometry and extraction with molecularly imprinted polymers. *Analytica Chimica Acta*, pp. 321-328.

Morzunova, T., 2006. Capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis (A review). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, pp. 39-52.

Musarurwa, H., Chimuka, L., Pakade, V. E. & Tavengwa, N. T., 2019. Recent developments and applications of QuEChERS based techniques on food samples during pesticide analysis. *Journal of Food Composition and Analysis*, p. 103314.

Narenderan, S., Meyyanathan, S. & Babu, B., 2020. Review of pesticide residue analysis in fruits and vegetables. Pre-treatment, extraction and detection techniques. *Food Research International*, p. 109141.

Nielsen, S. S., 2017. *Food Analysis*. 5 επιμ. s.l.:Food Science Text Series.

Nunez, O. & Lucci, P., 2020. Application of Liquid Chromatography in Food Analysis. *Food Analysis*, p. 1277.

Oliveira, L. G. et al., 2019. Development and validation of a method for the analysis of pyrethroid residues in fish using GC-MS. *Food Chemistry*, p. 124944.

Oliveira, N. A. et al., 2020. Use of Antibiotics in Animal Production and Its Impact on Health. *Journal of Food Chemistry & Nanotechnology*, pp. 40-47.

Otles, S. & Kartal, C., 2016. Solid- Phase Extraction (SPE): Principles and applications in food samples. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, pp. 5-15.

Pajewska-Szmyt, M. et al., 2019. QuEChERS extraction coupled to GC-MS for a fast determination of polychlorinated biphenyls in breast milk from Polish women. *Environmental Science and Pollution Research*, p. 30988–30999.

Peng, C.-F. et al., 2013. Ultrasensitive Nano-ELISA for Detecting Sulfadimethoxine in Chicken Tissue. *Journal of Chemistry*.

Peng, C.-F., Liu, C.-L., Song, S.-S. & Liu, L.-Q., 2014. Highly sensitive nano-ELISA for detecting 19-nortestosterone in beef. *Food and Agricultural Immunology*, pp. 423-431.

Perestrelo, R. et al., 2019. QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Analytica Chimica Acta*, pp. 1-28.

Piatkowska, M., Jedziniak, P. & Zmudzki, J., 2016. Multiresidue method for the simultaneous determination of veterinary medicinal products, feed additives and illegal dyes in eggs using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, pp. 571-580.

Pico, Y., Alfarhan, A. H. & Barcelo, D., 2020. How recent innovations in gas chromatography-mass spectrometry have improved pesticide residue determination: An alternative technique to be in your radar. *Trends in Analytical Chemistry*, p. 115720.

Pico, Y., Fernandez, M., Ruiz, M. J. & Font, G., 2007. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *Journal of biochemical and biophysical methods*, pp. 117-131.

Pikkemaat, M. G., 2009. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. *Analytical and bioanalytical chemistry*, pp. 893-905.

Poole, C. F., 2015. Ionization-based detectors for gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, pp. 137-153.

Prescott, J. F., 2018. History and Current Use of Antimicrobial Drugs in Veterinary Medicine. *Antimicrobial Resistance in Bacteria from Livestock and Companion Animals*, pp. 1-16.

Pszczolińska, K. & Monika, M., 2016. The QuEChERS Approach for the Determination of Pesticide Residues in Soil Samples: An Overview. *Journal of AOAC International*, pp. 1403-1414.

Queiroz, M. E. C., de Souza, I. D. & Marchioni, C., 2019. Current advances and applications of in-tube solid-phase microextraction. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 261-278.

Ragab, M. A. A. & El-Kimary, E. I., 2020. Recent Advances and Applications of Microfluidic Capillary Electrophoresis: A Comprehensive Review (2017–Mid 2019). *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 1-33.

Ramos-Payan, M. et al., 2018. Recent trends in capillary electrophoresis for complex samples analysis: A review. *Electrophoresis*, pp. 111-125.

Rana, M. S., Lee, S. Y., Kang, H. J. & Hur, S. J., 2019. Reducing Veterinary Drug Residues in Animal. *Food Science of Animal Resources*, pp. 687-703.

Rejczak, T. & Tuzimski, T., 2015. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chemistry*, pp. 980-1010.

Reygaert, W. C., 2018. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria. *AIMS Microbiology*, pp. 482-501.

Rutkowska, M. et al., 2018. Application of molecularly imprinted polymers in analytical chiral separations. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 91-102.

Sakamoto, S. et al., 2018. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, pp. 32-42.

Samsidar, A., Siddiquee, S. & Shaarani, S. M., 2018. A review of extraction, analytical and advanced methods for determination. *Trends in Food Science & Technology*, pp. 188-201.

Samsonova, J. V., Cannavan, A. & Elliott, C. T., 2012. A critical review of screening methods for the detection of chloramphenicol, thiamphenicol, and florfenicol residues in foodstuffs. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 50-78.

Santana-Mayor, A., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V. & Rodríguez-Delgado, 2019. Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 214-235.

Skoog, D. A., Holler, F. J. & Crouch, S. R., 2015. *Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης*. 6η επιμ. σ.λ.:Κωσταράκη.

Smulders, F. J., Rietjens, I. M. & Rose, M. D., 2019. *Chemical hazards in foods of animal origin*. σ.λ.:Wageningen Academic Publishers.

Souza-Silva, E. A., Gionfriddo, E. & Pawliszyn, J., 2015. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 236-248.

Stachniuk, A. & Fornal, E., 2016. Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of pesticide residues in food. *Food Analytical Methods*, pp. 1654-1665.

Stachniuk, A., Szmagara, A., Czeeczko, R. & Fornal, E., 2017. LC-MS/MS determination of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, pp. 446-457.

Steiner, D., Malachova, A., Sulyok, M. & Krska, R., 2020. Challenges and future directions in LC-MS-based multiclass method development for the quantification of food contaminants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pp. 25-34.

Straczynski, G. & Ligor, T., 2018. Comprehensive Gas Chromatography: Food and Metabolomics Applications. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 176-185.

Swinley, J. & de Coning, P., 2019. *A Practical Gas Analysis by Gas Chromatography*. 1 επιμ. σ.λ.:Elsevier.

Tarannum, N. et al., 2020. Molecularly imprinted polymers as receptors for assays of antibiotics. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 291-310.

Tissue, B. M., 2013. Sample preparation, extractions, and chromatography. Στο: *Basics of Analytical Chemistry and Chemical Equilibria*. s.l.:Wiley Online Library, pp. 53-102.

Tranchida, P. Q., 2019. *Advanced Gas Chromatography in Food Analysis*. s.l.:The Royal Society of Chemistry.

Tuck, S., Furey, A., Crooks, S. & Danaher, M., 2018. A review of methodology for the analysis of pyrethrin and pyrethroid residues in food of animal origin. *Food Additives & Contaminants: Part A*, pp. 911-940.

Turnipseed, S. B. et al., 2019. Extended liquid chromatography high resolution mass spectrometry screening method for veterinary drug, pesticide and human pharmaceutical residues in aquaculture fish. *Food Additives & Contaminants: Part A*, pp. 1501-1514.

Tycova, A., Ledvina, V. & Kleparnik, K., 2017. Recent advances in CE-MS coupling: Instrumentation, methodology, and applications. *Electrophoresis*, pp. 115-134.

Van Boeckel, T. P. et al., 2015. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, pp. 5649-5654.

Vazquez, P. P., Ferrer, C., Bueno, M. M. & Fernandez-Alba, A., 2019. Pesticide residues in spices and herbs: Sample preparation methods and determination by chromatographic techniques. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 13-22.

Vijay, P. D., Shamsi, S. A. & Sutherland, K., 2021. Capillary electromigration techniques coupled to mass spectrometry: Applications to food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, p. 116240.

Wang, B., Xie, K. & Lee, K., 2021. Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods. *Foods*, p. 555.

Wang, B., Xie, K. & Lee, K., 2021. Veterinary Drug Residues in Animal-Derived Foods: Sample Preparation and Analytical Methods. *Foods*, p. 555.

Wang, P., Sun, X., Su, X. & Wang, T., 2016. Advancements of molecularly imprinted polymers in the food safety field. *Analyst*, pp. 3540-3553.

Wu, L. et al., 2019. Application of nano-ELISA in food analysis: recent advances and challenges. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, pp. 140-156.

Xiong, Y. et al., 2020. Emerging strategies to enhance the sensitivity of competitive ELISA for detection of chemical contaminants in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, p. 115861.

Xu, C.-H. et al., 2016. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, pp. 12-29.

Zacharis, C. K. & Tzanavaras, P. D., 2020. Solid-Phase Microextraction. *Molecules*.

Zhang, C. et al., 2019. The application of the QuEChERS methodology in the determination of antibiotics in food: A review. *Trends n Analytical Chemistry*, pp. 517-537.

Zinner, S. H., 2007. Antibiotic use: present and future. *NEW MICROBIOLOGICA*, pp. 321-325.

Ζώτου, Α.-Σ., 2015. Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση. Στο: *Βιοαναλυτική Χημεία*. s.l.:s.n.

Θεοδωρίδης, Γ., 2015. Κεφάλαιο 8: Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης. Στο: *Ανοσοχημικές Τεχνικές Ανάλυσης*. s.l.:Εκδόσεις Κάλλιπος.

Παππά, Α., 2004. *Φυσικές Μέθοδοι Ανάλυσης: χρωματογραφικές, θερμικές, ηλεκτροχημικές, φασματομετρία μάζας*. Αθήνα: Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο.

Σαμανίδου , Β., 2015. Τεχνικές Προκατεργασίας Βιολογικών Δειγμάτων. Στο: *Βιοαναλυτική Χημεία*. s.l.:s.n.

Τσόπελας, Φ., Αθήνα, 2018. *1. Προετοιμασία δειγμάτων 2. Επικύρωση μεθόδων ανάλυσης - Χαρακτηριστικά ποιότητας*. s.l.:s.n.

Τσότσου, Γ. Ε., 2015. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Απόδοσης) (HPLC) στην Κλινική Χημεία. Βασικές Αρχές και παραδείγματα. Στο: *Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας*. s.l.:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.

Χατζηιωάννου , Θ. Π. & Κούππαρης, Μ. Α., 2005. *Ενόργανη Ανάλυση*. s.l.:ΕΛΕΝΗ ΘΕΜ. ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ.

## Πηγές Εικόνων

Εικόνα 1: Tissue, B. M., 2013. Sample preparation, extractions, and chromatography. Στο: *Basics of Analytical Chemistry and Chemical Equilibria*. s.l.:Wiley Online Library, pp. 53-102. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 2: Merkle, S., Kleeberg, K. K. & Fritsche, J., 2015. *Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis - A review*. *Chromatography*, pp. 293-381. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 3: Jalili, V., Barkhordari, A. & Ghiasvand, A., 2020. *A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews*. *Microchemical Journal*, p. 104319. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 4: Wang, P., Sun, X., Su, X. & Wang, T., 2016. *Advancements of molecularly imprinted polymers in the food safety field*. *Analyst*, pp. 3540-3553. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 5: Khatibi, S. A., Hamidi, S. & Siah-Shadbad, M. R., 2020. *Application of liquid-liquid extraction for the determination of antibiotics in the foodstuff: recent trends and developments*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, pp. 1-16. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 6: Tissue, B. M., 2013. *Sample preparation, extractions, and chromatography*. Στο: *Basics of Analytical Chemistry and Chemical Equilibria*. s.l.:Wiley Online Library, pp. 53-102. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 7: Sakamoto, S. et al., 2018. *Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites*. *Journal of Natural Medicines*, pp. 32-42. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 8: Sakamoto, S. et al., 2018. *Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites*. *Journal of Natural Medicines*, pp. 32-42. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 9: Sakamoto, S. et al., 2018. *Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites*. *Journal of Natural Medicines*, pp. 32-42. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 10: Sakamoto, S. et al., 2018. *Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites*. *Journal of Natural Medicines*, pp. 32-42. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 11: Sakamoto, S. et al., 2018. *Enzyme linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites*. *Journal of Natural Medicines*, pp. 32-42. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 12: Gaudin, V., 2017. *Advances in biosensor development for the screening of antibiotic residues in food products of animal origin – A comprehensive review*. *Biosensors and Bioelectronics*, pp. 363-377. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 13: Khansili, N., Rattu, G. & Krishna, P. M., 2018. Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, pp. 35-49. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 14: Ζώτου, Α.-Σ., 2015. Τριχοειδής Ηλεκτροφόρηση. Στο: *Βιοαναλυτική Χημεία*. s.l.:s.n. (Τροποποιημένη)

Εικόνα 15: Τσότσου, Γ. Ε., 2015. Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (Απόδοσης) (HPLC) στην Κλινική Χημεία. Βασικές Αρχές και παραδείγματα. Στο: *Εργαστηριακές Ασκήσεις Κλινικής Χημείας*. s.l.:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών.