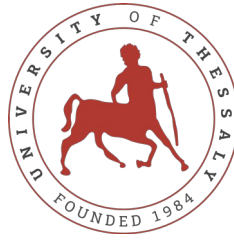




DEPARTMENT OF
**Biochemistry &
Biotechnology**
UNIVERSITY OF THESSALY

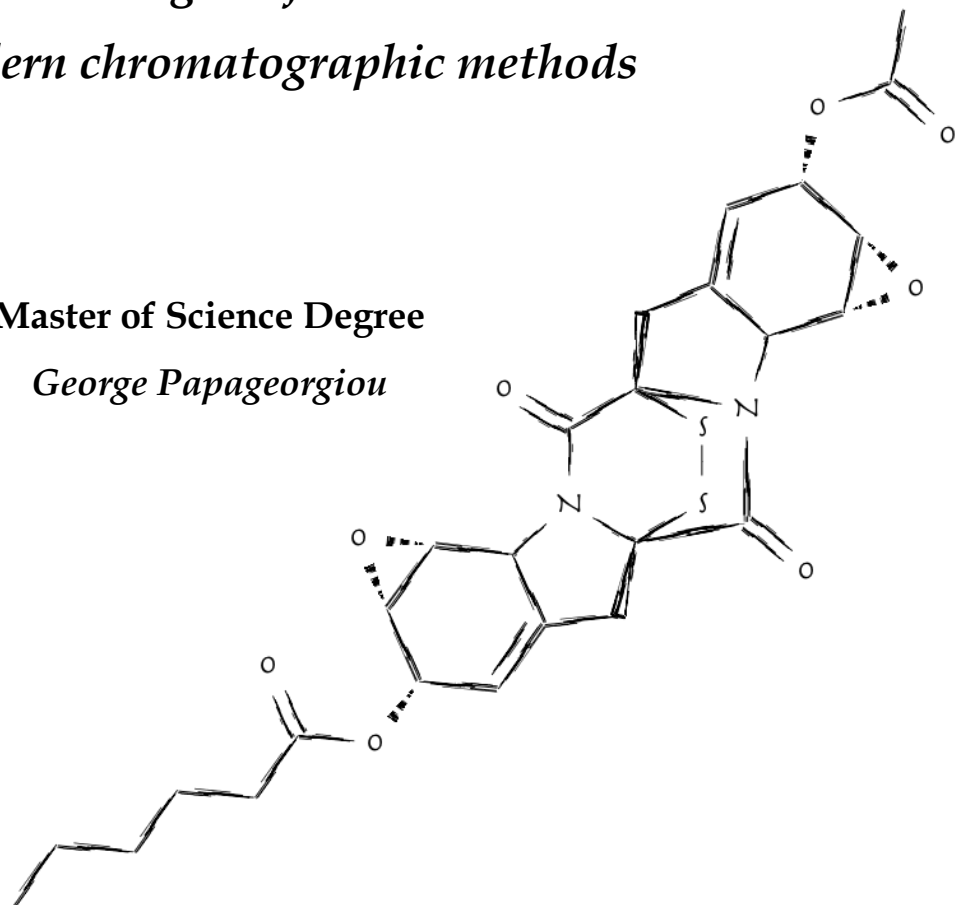


**BENAKI
PHYTOPATHOLOGICAL
INSTITUTE**

**University of Thessaly
School of Health Science
Department of Biochemistry & Biotechnology
Master of Science
“Toxicology”**

*Determination of
pesticide residues and their metabolites
in biological fluids
using modern chromatographic methods*

**Master of Science Degree
George Papageorgiou**



Larissa, 2021

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας
Σχολή Επιστημών Υγείας
Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας
Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
“Τοξικολογία”

*Προσδιορισμός υπολειμμάτων
γεωργικών φαρμάκων και μεταβολιτών τους
σε βιολογικά υγρά
με σύγχρονες χρωματογραφικές μεθόδους*

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης

Γεώργιος Παλαγεωργίου

Αρ. Γεν. Μητρώου: M041819001

Επιβλέπων: Κωνσταντίνος Κασιώτης

Τριμελής επιτροπή:

*Δημήτριος Κουρέτας, Καθηγητής Φυσιολογίας – Τοξικολογίας, Τμήμα Βιοχημείας
και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας*

*Σέρκο Χαρουτουιάν, Καθηγητής Χημείας, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής
Παραγωγής, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών*

*Κωνσταντίνος Κασιώτης, Χημικός - Ερευνητής Α', Εργαστήριο Τοξικολογικού
Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων, Μπενάκειο Φυτοπαθολογικό Ινστιτούτο*

Λάρισα, Οκτώβριος 2021

University of Thessaly
School of Health Science
Department of Biochemistry & Biotechnology
Master of Science
“Toxicology”

*Determination of
pesticide residues and their metabolites
in biological fluids
using modern chromatographic methods*

Master of Science Degree

George Papageorgiou

General Registration Number: M041819001

*Supervisor: Konstantinos Kasiotis, Chemist - Research Director, Benaki
Phytopathological Institute*

Larissa, October 2021

Περίληψη

Ο σύγχρονος άνθρωπος εκτίθεται καθημερινά σε ένα πλήθος χημικών ουσιών προερχόμενο από διάφορες πηγές, με βασικότερες το πόσιμο νερό, τη διατροφή, τα καταναλωτικά αγαθά, το αστικό περιβάλλον και το περιβάλλον εργασίας. Μέταλλα και μεταλλοειδή, όπως ο υδράργυρος, το κάδμιο, ο μόλυβδος και το αρσενικό, διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινόλια, φυτοπροστατευτικά προϊόντα, όπως εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα και μυκητοκτόνα, η *διφαινόλη Α*, υπερφθοριωμένες αλκυλιωμένες ουσίες, φθαλικοί εστέρες και πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι μερικά μόνο από τα ξеноβιοτικά χημικά είδη που καθορίζουν και διαμορφώνουν αυτό το σύνθετο μείγμα ουσιών και δύνανται να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό.

Η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση ή βιολογική παρακολούθηση του ανθρώπου (*Human Biomonitoring*) ασχολείται με την εκτίμηση της εσωτερικής δόσης των ξеноβιοτικών ουσιών, προσδιορίζοντας είτε το μητρικό μόριο, είτε έναν ή περισσότερους μεταβολίτες του, είτε κάποιον -ους σχετιζόμενο -ους βιοδείκτη -ες σε ανθρώπινα βιολογικά υποστρώματα (βιολογικά υγρά, όπως αίμα ή ούρα και ιστούς). Οι βασικοί στόχοι αυτής της διαδικασίας είναι μεταξύ άλλων η παραγωγή δεδομένων εσωτερικών δόσεων και η διασύνδεσή τους με δεδομένα έκθεσης και σχετικές οδούς έκθεσης, ο καθορισμός σχέσεων αιτίου - αιτιατού μεταξύ της εσωτερικής έκθεσης και πιθανών επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία, η παροχή γνώσης βασισμένη στην επιστήμη σχετικά με τους κινδύνους που ενέχει για την υγεία η έκθεση σε διάφορους χημικούς παράγοντες και η βελτίωση της εκτίμησης χημικής επικινδυνότητας.

Μαζί με τις κλασικές *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* και τις διαρκώς εξελισσόμενες *in silico* μεθόδους αξιολόγησης της τοξικότητας, η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση συμβάλλει σημαντικά στην οχύρωση και τη διαρκή ενδυνάμωση των κλάδων της τοξικολογία της δημόσιας και της επαγγελματικής υγείας, τροφοδοτώντας τους με καίριες πληροφορίες ως προς το χωρικό και χρονικό *in vitro* τοξικολογικό προφίλ του μελετούμενου πληθυσμού, την ρεαλιστική δηλαδή ποιοτική και ποσοτική κατάσταση των διαφόρων τοξικών παραγόντων μέσα στο ανθρώπινο οργανισμό, την κατανομή τους στους διάφορους ιστούς, τον μεταβολισμό τους, τη βιοσυσώρευση και την απέκκρισή τους.

Η πρόοδος των τεχνικών (φυσικής και χημικής) επεξεργασίας και διαχωρισμού, καθώς και των τεχνικών ενόργανης χημικής ανάλυσης επιτρέπει την απομόνωση πολυάριθμων και ποικίλων αναλυτών στόχων από σύνθετα υποστρώματα, όπως τα βιολογικά υγρά και την ποιοτική και ποσοτική τους ανίχνευση σε ολοένα και χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων και με διαρκώς υψηλότερη ακρίβεια. Σε κάποιες περιπτώσεις δε, και για ορισμένες ομάδες χημικών ρυπαντών, όπως είναι τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και οι υπερφθοριωμένες αλκυλιωμένες ουσίες, αναπτύσσονται και εφαρμόζονται πολυδύναμες μέθοδοι, κατάλληλες για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πολλών χημικών ειδών.

Στο πλαίσιο της παρούσας διπλωματικής εργασίας αναπτύχθηκε, βελτιστοποιήθηκε και επικυρώθηκε μία πολυδύναμη αναλυτική μέθοδος εφαρμοζόμενη σε δύο (2) ανθρώπινα βιολογικά υποστρώματα, ορό αίματος και ούρα για τον προσδιορισμό 72 φυτοπροστατευτικών προϊόντων και μεταβολιτών τους (στο εξής αναλύτες στόχοι, α.σ.)

διαφόρων κατηγοριών (εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα κ.ά.) και ομάδων/χημικών οικογενειών, όπως 17 οργανοφωσφορικές ενώσεις, 8 ουρίες, 7 τριαζόλες, 6 καρβαμιδικές ενώσεις, 5 νεονικοτινοειδή κ.ά. Μεταξύ των 72 α.σ. περιλαμβάνονταν και 12 μεταβολίτες μητρικών μορίων, όπως τα *Aldicarb sulfone*, *Aldicarb sulfoxide*, *Demeton-S-methyl sulfoxide* και *Paraoxon-methyl*. Το πειραματικό μέρος της εργασίας έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του Μπενάκειου Φυτοπαθολογικού Ινστιτούτου στην Αθήνα.

Στη φάση της προκατεργασίας των δειγμάτων, για την παραλαβή των αναλυτών στόχων από τα βιολογικά υποστρώματα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης. Ο προσδιορισμός των 72 α.σ. έγινε με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (*LC-ESI-MS/MS*). Κατά τα στάδια ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου εξετάστηκαν τρία (3) πρωτόκολλα προκατεργασίας δειγμάτων και δύο (2) πρωτόκολλα ενόργανης ανάλυσης προς αναζήτηση του καλύτερου δυνατού αποτελέσματος, με έναν συνδυασμό να επιτυγχάνει τις πιο ικανοποιητικές ανακτήσεις, λαμβάνοντας υπόψη την ταυτόχρονη παρουσία των 72 ποικίλων χημικών δομών.

Η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις διεθνών οδηγιών και προτύπων ως προς τη γραμμικότητα, την ορθότητα (ως απόλυτη ανάκτηση) και την πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, την εκλεκτικότητα, το φαινόμενο επιμόλυνσης/μόλυνσης εκ μεταφοράς, την ευαισθησία, τα όρια ποσοτικοποίησης (κατώτερο & ανώτερο) και ανίχνευσης και το φαινόμενο καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού (επίδρασης υποστρώματος - μήτρας). Οι παράμετροι αυτές προσδιορίστηκαν και για τους 72 α.σ.. Το γραμμικό εύρος της μεθόδου εκτάθηκε από το 1,25ppb έως τα 500ppb. Τα άκρα αυτά αποτελούν το κατώτερο και ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης αντίστοιχα, ενώ το όριο ανίχνευσης δεν ξεπέρασε το 0,5ppb για όλους τους α.σ.. Η ορθότητα και η πιστότητα προσδιορίστηκαν σε τέσσερα επίπεδα συγκέντρωσης 1,25ppb, 5ppb, 50ppb και 375ppb. Το εύρος της πρώτης εκτάθηκε από 61,91% έως 109,21% της εκάστοτε ονομαστικής τιμής για όλους τους αναλύτες στόχους και στα δύο υποστρώματα. Όσον αφορά στην πιστότητα (εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση) η επαναληψιμότητα κυμάνθηκε από 2,06% έως 17,46% και αντίστοιχα η αναπαραγωγιμότητα μεταξύ 2,04% και 19,16%. Το φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος - μήτρας εκτιμήθηκε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, 1,25ppb, 5ppb και 500ppb και εκφράστηκε κυρίως ως καταστολή ιοντισμού, κυμαινόμενο μεταξύ των τιμών -24,21% έως 8,91% στον ορό αίματος, με μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση 18,03%. Στα ούρα οι αντίστοιχες τιμές ήταν -19,43% έως 1,18% και 14,23%. Η μέθοδος κρίθηκε κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται.

Λέξεις κλειδιά: Ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση, φυτοπροστατευτικά προϊόντα, αναλυτική τοξικολογία, LC-MS/MS, επικύρωση, βιοαναλυτική πολυδύναμη μέθοδος, ορός αίματος, ούρα

Abstract

Modern man is exposed daily to a multitude of chemicals from various sources, most notably drinking water, food, consumer goods, the urban environment and the work environment. Metals and minerals such as mercury, cadmium, lead and arsenic, dioxins, polychlorinated biphenyls, plant protection products such as insecticides, herbicides and fungicides, *bisphenol A*, perfluoroalkyl substances (*PFAS*), phthalates and polycyclic aromatic hydrocarbons (*PAHs*), are only some of the xenobiotic chemicals that define and shape this complex mixture of substances and can enter the human body.

Human Biomonitoring assesses the internal dose of xenobiotic substances, identifying either the parent molecule, or one or more of its metabolites, or any related biomarker or biomarkers in human biological matrices (biological fluids, such as blood or urine and tissues). The main objectives of this process are, among other things, the production of internal dose data and their interconnection with exposure data and related exposure pathways, the establishment of cause-and-effect relationships between internal exposure and potential effects on human health, and the provision of science-based knowledge related to the health risks posed by exposure to various chemical agents and the improvement of the chemical risk assessment.

Together with the classic *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* and constantly evolving *in silico* toxicity assessment methods, human biomonitoring contributes significantly to the consolidation and continuous strengthening of the toxicology and public health professions by providing them with information and in terms of spatial and temporal *in vitro toxicological profile* of the studied population, the realistic qualitative and quantitative state of the various toxic factors in the human body, their distribution in various tissues, their metabolism, bioaccumulation and excretion.

Advances in (physical and chemical) processing and separation techniques, as well as instrumental chemical analysis techniques, have enabled the isolation of numerous and varied target analytes from composite matrices, such as biological fluids, and their qualitative and quantitative detection at ever lower and lower concentrations and with ever higher accuracy. In some cases, and for certain groups of chemical pollutants, such as plant protection products and *PFAS*, multi-residue methods are developed and applied, which are suitable for the simultaneous identification of many chemical species.

In the framework of this dissertation, a multi-residue analytical method has been developed, optimized and validated. The method has been applied on two (2) human biological matrices, blood serum and urine, for the analysis of 72 pesticides and metabolites (hereinafter target analytes, t.a.) of different categories (insecticides, herbicides, etc.) and groups/chemical families, such as 17 organophosphates, 8 ureas, 7 triazoles, 6 carbamates, 5 neonicotinoids, etc. Between the 72 t.a., 12 metabolites of paternal pesticides were included, such as *Aldicarb sulfone*, *Aldicarb sulfoxide*, *Demeton-S-methyl sulfoxide*, and *Paraoxon-methyl*. The experimental part of the work took place in the *Laboratory of Toxicological Control of Pesticides of the Benaki Phytopathological Institute* in Athens.

In the preparation phase of the samples, the solid phase extraction technique was used to obtain the target analytes from the biological matrices. The determination of 72 t.a. was performed by the technique of liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (*LC-ESI-MS/MS*). During the development and optimization phases of the method, three (3) sample preparation protocols and two (2) instrumental analysis protocols were examined in search of the best possible result, with one combination achieving the most satisfactory recoveries, taking into consideration the simultaneous presence of the 72 different chemical structures.

The method was validated in accordance with the requirements of international guidelines and standards for linearity, accuracy (as absolute recovery) & precision under conditions of repeatability and intra-laboratory reproducibility, selectivity, carry-over, sensitivity, limits of quantification (*LLOQ* & *ULOQ*) & detection (*LOD*) and suppression/enhancement ionization (*matrix effect*). These parameters were determined for all 72 t.a. The linear range of the method ranged from 1.25ppb to 500ppb. These extremes are the *LLOQ* and *ULOQ* of the method respectively, while the *LOD* did not exceed 0,5ppb for all t.a.. Accuracy and precision were determined at four concentration levels 1.25ppb, 5ppb, 50ppb and 375ppb. The range of the former ranged from 61.91% to 109.21% of the respective nominal value for all t.a. on both matrices. As far as it concerns the precision (expressed as relative standard deviation), the repeatability ranged from 2.06% to 17.46% and the reproducibility ranged from 2.04% to 19.16% respectively. The matrix effect was estimated at three levels of concentration, 1.25ppb, 5ppb and 500ppb and was expressed mainly as ionization suppression, ranging from -24.21% to 8.91% in blood serum, with a maximum relative standard deviation of 18.03%. In urine the corresponding values were -19.43% to 1.18% and 14.23%. The developed method is considered appropriate for its intended purpose (fit for the intended purpose).

Keywords: *Human biomonitoring, pesticides, analytical toxicology, LC-MS/MS, validation, bioanalytical multi-residue method, blood serum, urine*

Πίνακας περιεχομένων

Κεφάλαιο 1 Βιοπαρακολούθηση.....	16
1.1 Αντικείμενο.....	16
1.2 Εισαγωγικά στοιχεία – Βασικές αρχές.....	16
1.2.1 Χημική έκθεση και ανθρώπινη υγεία.....	16
1.2.2 Αξιοποίηση των δεδομένων βιοπαρακολούθησης.....	19
1.3 Δείγματα – υποστρώματα στη βιοπαρακολούθηση.....	19
1.3.1 Αίμα.....	20
1.3.2 Ούρα.....	20
1.3.3 Άλλα υποστρώματα βιοπαρακολούθησης.....	21
1.4 Βιοδείκτες.....	22
1.4.1 Βιοδείκτες έκθεσης.....	23
1.4.2 Βιοδείκτες ευαισθησίας.....	23
1.4.3 Βιοδείκτες επίδρασης.....	23
1.4.4 Εργαστηριακή ανάλυση βιοδεικτών.....	24
1.5 Ταξινόμηση των τοξικών παραγόντων.....	25
1.6 Τοξικές επιδράσεις & Βιοπαρακολούθηση γεωργικών φαρμάκων.....	25
1.6.1 Ορισμός και κατηγοριοποίηση γεωργικών φαρμάκων.....	25
1.6.2 Χρήση των γεωργικών φαρμάκων.....	27
1.6.3 Έκθεση σε γεωργικά φάρμακα και κίνδυνος ανθρώπινης δηλητηρίασης.....	27
1.6.4 Ρυθμιστικές διατάξεις.....	28
1.6.5 Εντομοκτόνα.....	29
1.6.5.1 Οργανοφωσφορικές ενώσεις.....	30
1.6.5.2 Καρβαμιδικές ενώσεις.....	33
1.6.5.3 Πυρεθροειδή.....	34
1.6.5.4 Οργανοχλωριούχες ενώσεις.....	35
1.6.5.5 Νεονικοτινοειδή.....	37
1.6.6 Ζιζανιοκτόνα.....	39
1.6.6.1 Χλωροφαινοξικές ενώσεις.....	39
1.6.6.2 Διπυριδυλικές ενώσεις.....	40
1.6.6.3 Χλωροακετανιλίδια.....	41
1.6.6.4 Τριαζίνες.....	42
1.6.6.5 Φωσφονομεθυλαμινοξέα.....	42
1.6.7 Μυκητοκτόνα.....	44
1.7 Μελέτες βιοπαρακολούθησης.....	45

1.7.1 Στόχοι και σχεδιασμός μελετών βιοπαρακολούθησης.....	45
1.7.2 Παραδείγματα μελετών βιοπαρακολούθησης.....	45
1.8 Περιορισμοί & κοινωνικές, ηθικές και νομικές συνέπειες μελετών βιοπαρακολούθησης.....	46
Κεφάλαιο 2 Επικύρωση βιοαναλυτικής μεθόδου.....	49
2.1 Αντικείμενο.....	49
2.2 Εισαγωγικά στοιχεία.....	49
2.3 Η επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων μέχρι σήμερα.....	50
2.4 Ανάγκη για μία κοινή παγκόσμια οδηγία.....	51
2.4.1 Εναρμόνιση: “ICH guideline M10 on bioanalytical method validation_Step 2b”.....	52
2.5 Η εφαρμογή βιοαναλυτικών μεθόδων στην Τοξικολογία.....	52
2.6 Συσχέτιση επικύρωσης βιοαναλυτικών μεθόδων μεταξύ φαρμακευτικής & τοξικολογίας...	53
2.7 Γενικές αρχές επικύρωσης μεθόδου.....	54
2.7.1 Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση της μεθόδου.....	54
2.7.2 Επικύρωση μεθόδου.....	55
2.7.3 Κατηγορίες επικύρωση.....	56
2.7.3.1 Πλήρης επικύρωση.....	56
2.7.3.2 Μερική επικύρωση.....	57
2.7.3.3 Διασταυρούμενη επικύρωση.....	57
2.7.4 Κατασκευή πλάνου επικύρωσης.....	57
2.8 Διαδικασία επικύρωσης χρωματογραφικών τεχνικών (πλήρης).....	58
2.8.1 Κρίσιμα αντιδραστήρια.....	58
2.8.1.1 Υλικά αναφοράς.....	58
2.8.1.2 Δείγματα ελέγχου ποιότητας.....	59
2.8.2 Καμπύλη βαθμονόμησης και εύρος ποσοτικοποίησης.....	60
2.8.2.1 Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης.....	60
2.8.2.2 Μοντέλο βαθμονόμησης.....	61
2.8.2.3 Κριτήρια αποδοχής καμπύλης βαθμονόμησης.....	62
2.8.3 Ακρίβεια, Ορθότητα & πιστότητα.....	63
2.8.4 Ορθότητα.....	64
2.8.4.1 Η ορθότητα σε βιοαναλυτικές μεθόδους LC–MS.....	65
2.8.5 Πιστότητα.....	66
2.8.6 Ακρίβεια.....	67
2.8.7 Εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας.....	69
2.8.8 Κριτήρια αποδοχής ορθότητας και πιστότητας.....	70
2.8.9 Ανάκτηση.....	70
2.8.9.1 Προσδιορισμός της ανάκτησης.....	71
2.8.9.2 Ο εμβολιασμός στην εκτίμηση της ανάκτησης.....	72

2.8.9.3 Η ανάκτηση σε βιοαναλυτικές μεθόδους LC–MS.....	73
2.8.9.4 Η σημασία της ανάκτησης.....	75
2.8.9.5 Ερμηνεία, στοιχεία οδηγίων & απαιτήσεις ανάκτησης.....	75
2.8.10 Εκλεκτικότητα.....	76
2.8.11 Ειδικότητα.....	77
2.8.12 Το φαινόμενο της επιμόλυνσης - μόλυνσης εκ μεταφοράς (“Carry-over”).....	77
2.8.13 Ευαισθησία.....	78
2.8.14 Όρια.....	78
2.8.14.1 Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ).....	78
2.8.14.2 Ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (ULOQ).....	79
2.8.14.3 Όριο ανίχνευσης (LOD).....	79
2.8.15 Καταστολή/ενίσχυση ιοντισμού (Matrix Effect).....	81
2.8.15.1 Πηγές πρόκλησης και ένταση του φαινομένου.....	82
2.8.15.2 Κριτήρια αποδοχής του φαινομένου.....	83
2.8.15.3 Μηχανισμοί πρόκληση του φαινομένου.....	84
2.8.16 Ακεραιότητα αραίωσης.....	85
2.8.17 Εκτέλεση δοκιμών μελέτης σταθερότητας.....	86
2.8.18 Επαναληψιμότητα έγχυσης.....	87
2.9 Ανάλυση δειγμάτων μελέτης.....	88
2.9.1 Χειρισμός των δειγμάτων.....	88
2.9.2 Δομή αναλυτικού γύρου.....	88
2.9.2.1 Κριτήρια αποδοχής αναλυτικού γύρου.....	89
2.9.3 Εύρος βαθμονόμησης.....	90
2.9.4 Επανεξέταση δειγμάτων μελέτης.....	91
2.9.5 Επανάγχυση δειγμάτων μελέτης.....	92
2.9.6 Ολοκλήρωση χρωματογραφήματος.....	92
Κεφάλαιο 3 Αναλυτικές τεχνικές.....	93
3.1 Εισαγωγικά στοιχεία.....	93
3.2 Προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων.....	94
3.3 Κατακρήμιση πρωτεϊνών και χημική δέσμευση φωσφολιπιδίων.....	96
3.4 Τεχνικές εκχύλισης.....	97
3.4.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης.....	97
3.5 Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί.....	99
3.5.1 Αρχή και γενική περιγραφή της χρωματογραφίας.....	99
3.5.2 Διεύρυνση ζώνης και αποδοτικότητα στήλης.....	102
3.5.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης.....	105
3.5.3.1 Η στατική φάση.....	107

3.5.3.2 Ανιχνευτές στην HPLC.....	109
3.6 Φασματομετρία Μάζας.....	109
3.6.1 Πηγές ιόντων.....	112
3.6.2 Αναλυτές μάζας.....	112
3.7 Συζευγμένες τεχνικές.....	113
3.8 Εφαρμογές της συζευγμένης φασματομετρίας μάζας.....	114
3.9 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά (LC-MS/MS).....	115
3.9.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI).....	116
3.9.2 Το τριπλό τετράπολο (QqQ).....	118
3.10 Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μάζας.....	120
3.11 Οι πολυδύναμες μέθοδοι στον προσδιορισμό γεωργικών φαρμάκων.....	123
Κεφάλαιο 4 Προκατεργασία δειγμάτων & ενόργανη ανάλυση.....	126
4.1 Εισαγωγή.....	126
4.2 Υλικά και εργαστηριακός εξοπλισμός.....	127
4.3 Χημικά αντιδραστήρια και πρότυπα διαλύματα.....	128
4.4 Παρασκευή διαλυμάτων και εμβολιασμός δειγμάτων.....	129
4.5 Ανάπτυξη μεθόδου.....	130
4.5.1 Πειραματική διαδικασία – Προκατεργασία δειγμάτων.....	130
4.5.2 Βελτιστοποίηση διαδικασίας προκατεργασίας δειγμάτων.....	132
4.5.2.1 Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων I.....	132
4.5.2.2 Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων II.....	132
4.5.2.3 Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων III.....	133
4.5.3 Ενόργανη Ανάλυση - Βελτιστοποίησης συνθηκών λειτουργίας LC-ESI-MS/MS.....	134
4.5.3.1 Πρωτόκολλο ενόργανης ανάλυσης δειγμάτων I.....	134
4.5.3.2 Πρωτόκολλο ενόργανης ανάλυσης δειγμάτων II.....	139
4.5.4 Αποτελέσματα διαδικασίας βελτιστοποίησης.....	140
4.6 Επικύρωση μεθόδου.....	141
4.6.1 Γραμμικότητα καμπυλών βαθμονόμησης.....	142
4.6.2 Ορθότητα και πιστότητα μεθόδου.....	143
4.6.3 Εκλεκτικότητα μεθόδου.....	143
4.6.4 Φαινόμενο επιμόλυνσης – μόλυνσης εκ μεταφοράς.....	144
4.6.5 Ευαισθησία μεθόδου.....	144
4.6.6 Όρια.....	144
4.6.6.1 Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης.....	144
4.6.6.2 Ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης.....	144
4.6.6.3 Όριο ανίχνευσης.....	144
4.6.7 Καταστολή/ενίσχυση ιοντισμού.....	145

Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα & συζήτηση.....	146
5.1 Αξιολόγηση της γραμμικότητας των καμπυλών βαθμονόμησης.....	146
5.2 Αξιολόγηση της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου.....	146
5.3 Αξιολόγηση της εκλεκτικότητας.....	148
5.4 Αξιολόγηση του φαινομένου μόλυνσης εκ μεταφοράς.....	148
5.5 Αξιολόγηση της ευαισθησίας.....	148
5.6 Αξιολόγηση – προσδιορισμός ορίων.....	148
5.6.1 Αξιολόγηση του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης.....	148
5.6.2 Αξιολόγηση του ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης.....	148
5.6.3 Αξιολόγηση του ορίου ανίχνευσης.....	149
5.7 Αξιολόγηση της καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού.....	149
5.8 Πίνακες και διαγράμματα αποτελεσμάτων.....	149
Κεφάλαιο 6 Συμπεράσματα.....	187
Βιβλιογραφία.....	192
Παράρτημα.....	206

Πίνακας σχημάτων

Σχήμα 1.1: Γενική δομή οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων [12].....	30
Σχήμα 1.2: Οι δομές 5 βασικών οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, επάνω Parathion-methyl (αριστερά), Chlorpyrifos (κέντρο) & Diazinon (δεξιά) και κάτω (S)-Malathion (αριστερά), Dichlorvos (κέντρο) & του (S)-Sarin (δεξιά). [30].....	32
Σχήμα 1.3: Γενική δομή καρβαμιδικών εντομοκτόνων [35].....	33
Σχήμα 1.4: Οι δομές τριών βασικών καρβαμιδικών εντομοκτόνων, Carbaryl (αριστερά), Aldicarb (κέντρο) & Carbofenthiol (δεξιά). [30].....	34
Σχήμα 1.5: Ο συντακτικός τύπος της πυρεθρίνης I [30].....	34
Σχήμα 1.6: Οι δομές τριών βασικών οργανοχλωριούχων εντομοκτόνων, DDT (αριστερά), Lindane (κέντρο) & Aldrin (δεξιά) [30].....	36
Σχήμα 1.7 Οι δομές της (S)-νικοτίνης (επάνω αριστερά) & 5 βασικών νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων. Επάνω Thiamethoxam (κέντρο) & Clothianidin (δεξιά) και κάτω Imidacloprid (αριστερά), Thiacloprid (κέντρο) & Acetamiprid (δεξιά). [30].....	38
Σχήμα 1.8: Η δομή του 2,4-D [30].....	40
Σχήμα 1.9: Οι δομές δύο διπυριδολικών ενώσεων, Diquat (αριστερά) & Paraquat (δεξιά). [30].....	40
Σχήμα 1.10: Η δομή του Alachlor. [30].....	42
Σχήμα 1.11: Η δομή του Atrazine. [30].....	42
Σχήμα 1.12: Οι δομές των Glyphosate (αριστερά) & Glufosinate (δεξιά). [30].....	43
Σχήμα 1.13: Οι δομές των Captan (αριστερά) & Folpet (δεξιά). [30].....	45

- Σχήμα 2.1: Διάγραμμα βαθμονόμησης, το οποίο παρουσιάζει την απορρόφηση συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναλύτη. Απεικονίζονται το εύρος μέτρησης, το γραμμικό εύρος, το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) και το όριο ανίχνευσης (LOD). Το σχεδιασμένο κόκκινο τρίγωνο απεικονίζει τον υπολογισμό της ευαισθησίας ή της κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης. [90].....62
- Σχήμα 2.2: Παραλληλισμός της κανονικής κατανομής (συνάρτηση πιθανότητας) μετρήσεων με την κατανομή ρίψεων σε πεδίο στόχο. Η μορφή της καμπύλης της κανονικής κατανομής εξαρτάται από τη διασπορά των μετρήσεων. Αριστερά οι ρίψεις κατανομούνται σε όλο το πεδίο του στόχου, οι μετρήσεις δηλαδή έχουν μεγάλη διασπορά και χαρακτηρίζονται από μικρή επαναληψιμότητα και πιστότητα, οπότε και η αντίστοιχη καμπύλη κατανομής είναι πιο ευρεία. Δεξιά ωστόσο, οι ρίψεις βρίσκονται συγκεντρωμένες σε μια περιοχή του πεδίου, οι μετρήσεις δηλαδή έχουν μικρή διασπορά και χαρακτηρίζονται από υψηλή επαναληψιμότητα και πιστότητα με συνέπεια η καμπύλη να είναι πιο οξεία. Η κορυφή της κατανομής αντιπροσωπεύει την ορθότητα της ανάλυσης. Στην αριστερή περίπτωση η μέση τιμή των μετρήσεων (x) συμπίπτει με την αληθή τιμή (αποδεκτή τιμή αναφοράς, T), ενώ στη δεξιά τα αποτελέσματα είναι συστηματικά πολύ χαμηλά. Η ορθότητα υπολογίζεται ως συστηματικό σφάλμα, $x-T$ ή ως σχετικό συστηματικό σφάλμα, $(x-T)/T$. [97].....68
- Σχήμα 2.3: Σχηματική απεικόνιση ακρίβειας, ορθότητας και πιστότητας σε πεδίο στόχου. Οι ρίψεις στο στόχο αντιπροσωπεύουν ανεξάρτητα αποτελέσματα μετρήσεων και η τιμή αναφοράς απεικονίζεται ως το κέντρο του στόχου. Η καλύτερη ακρίβεια (μικρότερη αβεβαιότητα μέτρησης) επιτυγχάνεται στην περίπτωση b, όπου όλες οι ανεξάρτητες μετρήσεις βρίσκονται κοντά στην τιμή αναφοράς. Στις περιπτώσεις a & b δεν παρουσιάζεται σημαντικό συστηματικό σφάλμα, καθώς όλες οι μετρήσεις βρίσκονται συγκεντρωμένες στο κέντρο του στόχου. Ωστόσο η πιστότητα είναι χαμηλότερη στην περίπτωση a, καθώς οι μετρήσεις είναι ευρύτερα διασπαρμένες. Η πιστότητα στην περίπτωση d είναι ίδια με αυτή της b, στην περίπτωση d όμως υπάρχει σημαντικό συστηματικό σφάλμα, καθώς όλες οι μετρήσεις βρίσκονται στην ίδια περιοχή μακριά από το κέντρο του στόχου. Η ακρίβεια είναι χαμηλότερη στην περίπτωση c, καθώς οι μετρήσεις έχουν ευρέως διασπαρεί στη δεξιά πλευρά του στόχου. [92].....68
- Σχήμα 3.1: Σχηματικό διάγραμμα ροής εργασιών στη βιοανάλυση. [77].....93
- Σχήμα 3.2: Τα τυπικά στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης. Η περίπτωση αφορά στην απομόνωση στεροειδών από ούρα. [113].....98
- Σχήμα 3.3: Η ιδέα πίσω από τη χρωματογραφία: a. Η ουσία A διαθέτοντας μικρότερη συγγένεια με τη στατική φάση σε σχέση με την ουσία B, εξέρχεται πρώτη από στήλη. b. Η απεικόνιση του σήματος του ανιχνευτή στα διάφορα στάδια έκλουσης του τμήματος a. [123].....100
- Σχήμα 3.4: Τυπικό χρωματογράφημα ενός μείγματος δύο συστατικών. Η μικρή κορυφή στα αριστερά αντιστοιχεί στο έκλουσμα που δεν κατακρατείται στη στήλη, με συνέπεια να φθάνει στον ανιχνευτή σχεδόν αμέσως μετά την έναρξη της διαδικασίας έκλουσης. [123].....102
- Σχήμα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση της προοδευτικής διαπλάτυνσης μίας αρχικά λεπτής ζώνης εκλούσματος, καθώς κινείται κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης. [113].....103
- Σχήμα 3.6: Σχηματική απεικόνιση των φαινομένων που σχετίζονται με τους όρους της εξίσωσης Deemter. Επάνω ο όρος A, κάτω αριστερά ο όρος B/u και δεξιά ο όρος $(C_s + C_m)u$. [113].....104
- Σχήμα 3.7: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων μίας τυπικής συσκευής HPLC. [123].....106
- Σχήμα 3.8: Παραδείγματα αντιδράσεων σιλανοποίησης. [113].....108
- Σχήμα 3.9: Διαγραμματική απεικόνιση των τμημάτων ενός φασματομέτρου μάζας. [123].....111

Σχήμα 3.10: (a) Η τεχνική ESI και (b) Η μετάβαση των ιόντων από την υγρή στην αέρια φάση πριν από την είσοδό τους στον αναλυτή μάζας. [113].....	117
Σχήμα 3.11: Αλεικόνιση ενός τετραπολικού αναλυτή μάζας. [113].....	119
Σχήμα 3.12: Διαμήκης τομή ενός τριπλού τετραπόλου. [113].....	120
Σχήμα 3.13: Σχηματική αναπαράσταση διαφόρων τύπων πειραμάτων διαδοχικής φασματομετρίας μάζας. Συγκεκριμένα: I. Σάρωση παραγόμενων – θυγατρικών ιόντων (Product ion scan), II. Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor ion scan), III. Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (Constant neutral loss scan, CNL) και IV. Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης θραυσματοποίησης (Selected reaction monitoring, SRM). [133].....	122
Σχήμα 4.1: Οι απόλυτοι αριθμοί και τα ποσοστά των διαφόρων ομάδων – χημικών οικογενειών που περιλαμβάνονται στο σύνολο των 72 αναλυτών στόχων.....	126
Σχήμα 5.1: Μέσες (απόλυτες) ανακτήσεις σε συγκέντρωση 5ppb (για κάθε αναλύτη) για τους 72 α.σ., μετά από εφαρμογή των υπό δοκιμή πρωτοκόλλων (βλ. 4.5) σε υπόστρωμα ορού αίματος..	158
Σχήμα 5.2: Μέσες (απόλυτες) ανακτήσεις σε συγκέντρωση 50ppb (για κάθε αναλύτη) για τους 72 α.σ., μετά από εφαρμογή των υπό δοκιμή πρωτοκόλλων (βλ. 4.5) σε υπόστρωμα ορού αίματος..	159
Σχήμα 5.3: Η ορθότητα εκφρασμένη ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%) υπό συνθήκες εργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας για τους 72 α.σ. σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ορού αίματος.....	173
Σχήμα 5.4: Η πιστότητα - αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) για τους 72 α.σ. σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ορού αίματος.....	174
Σχήμα 5.5: Η ορθότητα εκφρασμένη ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%) υπό συνθήκες εργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας για 12 από τους 72 α.σ. σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ούρων.....	178
Σχήμα 5.6: Η αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) για 12 από τους 72 α.σ. σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ούρων.....	178
Σχήμα 5.7: Η ένταση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού για τους 72 α.σ. σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ορού αίματος.....	184
Σχήμα 5.8: Η ένταση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού για 12 από τους 72 α.σ. σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ούρων.....	186

Πίνακας πινάκων

Πίνακας 1.1: Τα συνιστώμενα από τον ΠΟΥ κριτήρια ταξινόμηση των γεωργικών φαρμάκων σύμφωνα με τον βαθμό εγγενούς κινδύνου (Hazard) [21],[22].....	28
Πίνακας 1.2: Μοριακοί στόχοι των κυριότερων κατηγοριών εντομοκτόνων.....	29
Πίνακας 1.3: Ορισμένοι μηχανισμοί δράσης των ζιζανιοκτόνων [12],[15].....	39

Πίνακας 4.1: Το χρονικό προφίλ της βαθμιδωτής έκλυσης.....	135
Πίνακας 4.2: Χρωματογραφικές, οργανολογικές και φασματομετρικές παράμετροι στην LC-ESI(+)-MS/MS μέθοδο.....	135
Πίνακας 5.1 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης (συντελεστής συσχέτισης r^2 , κλίση καμπύλης βαθμονόμησης – τυπική απόκλιση $b \pm S_b$, τομή με τον άξονα των τετμημένων $a \pm S_a$) για τους 72 α.σ. σε υπόστρωμα ορού αίματος.....	150
Πίνακας 5.2: Οι ανακτήσεις των 72 α.σ. σε δύο (2) επίπεδα συγκεντρώσεων μετά την εφαρμογή των πρωτοκόλλων προκατεργασίας και ενόργανης ανάλυσης σε υπόστρωμα ορού αίματος.....	153
Πίνακας 5.3: Στατιστικά δεδομένα ορθότητας και πιστότητας για τους 72 α.σ. σε τέσσερα (4) επίπεδα συγκεντρώσεων υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας σε υπόστρωμα ορού αίματος.....	160
Πίνακας 5.4: Στατιστικά δεδομένα ορθότητας και πιστότητας για 12 από το σύνολο των 72 α.σ. σε τέσσερα (4) επίπεδα συγκεντρώσεων υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας σε υπόστρωμα ούρων.....	175
Πίνακας 5.5: Η ένταση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού (ME) για τους 72 α.σ. σε τρία (3) επίπεδα συγκεντρώσεων σε υπόστρωμα ορού αίματος.....	179
Πίνακας 5.6: Η ένταση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού (ME) για 12 από τους 72 α.σ. σε τρία (3) επίπεδα συγκεντρώσεων σε υπόστρωμα ούρων.....	185
Πίνακας 1: Οι 72 αναλύτες στόχοι (α.σ.) σε αλφαβητική σειρά και βασικές πληροφορίες για αυτούς. [30],[32],[166],[167],[168].....	207

Τμήμα Α

Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Κεφάλαιο 1 Βιοπαρακολούθηση

1.1 Αντικείμενο

Βασικός στόχος της αναλυτικής τοξικολογίας σήμερα είναι η μείωση της διακινδύνευσης και η κατοχύρωση ασφαλούς έκθεσης (ακόμη και σε χαμηλά επίπεδα), συμβάλλοντας στην πρόληψη, τη διάγνωση και τη θεραπεία από δηλητηριάσεις, οφειλόμενες σε ένα μεγάλο εύρος ξеноβιοτικών, τοξικών ή μη παραγόντων (κυρίως τοξικών προϊόντων, βλ. §1.5). Η τοξικολογικές αναλύσεις, που διεκπεραιώνονται από τοξικολογικά εργαστήρια καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα δυνητικών πεδίων έκθεσης στους παράγοντες αυτούς, όπως την επαγγελματική και περιβαλλοντική έκθεση, τα τρόφιμα και το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης, τα φαρμακευτικά προϊόντα και τα καλλυντικά. Η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση (*Human biological monitoring or human biomonitoring, HBM*) αποτελεί ένα εργαλείο για τον εντοπισμό πιθανής έκθεσης του ανθρώπου σε δυνητικά επικίνδυνες χημικές ουσίες, χωρικών και χρονικών τάσεων, συνθηκών του τρόπου ζωής και συγκεκριμένων ομάδων κινδύνου. [1],[2],[3]

Μέσω της παρακολούθησης της χρόνιας έκθεσης σε χαμηλά επίπεδα των παραγόντων που αφορούν στην εκάστοτε μελέτη, προκύπτουν πληροφορίες απαραίτητες για την επακόλουθη εκτίμηση της επικινδυνότητας (*Risk assessment*). Έτσι καθορίζονται κατάλληλες πολιτικές και παρεμβάσεις, ενώ παράλληλα τίθενται προτεραιότητες στη δράση και την έρευνα. Η σημαντικότερη ίσως εφαρμογή των δεδομένων της ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης είναι η δημιουργία μίας βάσης δεδομένων και η σύνταξη νομοθετικών πράξεων, οι οποίες θα αφορούν στη μείωση και την πρόληψη της ρύπανσης και στην παρακολούθηση της επιτυχούς εφαρμογής μέτρων τεκμηρίωσης σχετικών τάσεων. [4] Επιπλέον επιτρέπει την άμεση και ακριβέστερη εκτίμηση της κατανομής της επικινδυνότητας στον πληθυσμό, ενσωματώνοντας τη διατομική μεταβλητότητα στους ρυθμούς έκθεσης, απορρόφησης, μεταβολισμού και απέκκρισης. [1],[2],[3]

1.2 Εισαγωγικά στοιχεία - Βασικές αρχές

1.2.1 Χημική έκθεση και ανθρώπινη υγεία

Από την αρχή του 20ού αιώνα, κυρίως όμως από τις αρχές της δεκαετίας του 1950, σημειώθηκε συστηματική αύξηση της παγκόσμιας παραγωγής χημικών ουσιών. Σήμερα, με πάνω από 100.000 εγκεκριμένες χημικές ουσίες, τα χημικά προϊόντα αποτελούν μέρος της καθημερινής μας ζωής, ενώ παράλληλα διαδραματίζουν ολοένα και σημαντικότερο ρόλο στην παγκόσμια οικονομική ανάπτυξη. Εντούτοις, τα οφέλη που συνδέονται με τη χρήση χημικών ουσιών και χημικών προϊόντων ενδέχεται να σχετίζονται με δυομενείς επιπτώσεις στους ανθρώπους, στα ζώα και στο περιβάλλον. [4]

Οι χημικές ουσίες μπορούν να απελευθερωθούν στο περιβάλλον είτε κατά τη διάρκεια της παραγωγής και της χρήσης τους, είτε ως απόβλητα και να εισέλθουν στον ανθρώπινο

οργανισμό μέσω της εισπνοής, διαδερμικά ή με την κατάποση από τον αέρα (εσωτερικό ή εξωτερικό), το πόσιμο νερό, την τροφή, διάφορα καταναλωτικά προϊόντα και το έδαφος. Μία σειρά ατυχημάτων και σκανδάλων από τη δεκαετία του 1950 οδήγησαν όλο και περισσότερο στην κατανόηση ότι οι χημικές ουσίες και άλλοι στρεσογόνοι παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν μία ολόκληρη σειρά από δυσμενείς επιπτώσεις για την ανθρώπινη υγεία και την αναπαραγωγική ικανότητα όταν η έκθεση είναι είτε οξεία, είτε μακροχρόνια. Μερικές από αυτές τις ουσίες δεν παραμένουν στο περιβάλλον για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ενώ αντίθετα άλλες αποικοδομούνται πολύ αργά (έμμονες ουσίες) ή συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα (βιοσυσσωρεύσιμες ουσίες). Τέτοιες ουσίες μπορεί να είναι: μέταλλα και μεταλλοειδή, όπως ο υδράργυρος (σε οργανική ή ανόργανη μορφή), το κάδμιο, ο μόλυβδος και το αρσενικό - έμμονοι οργανικοί ρυπαντές (*persistent organic pollutants, POPs*), όπως διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινόλια (*polychlorinated biphenils, PCBs*), πολυβρωμιωμένοι διφαινυλαιθέρες (*polybrominated biphenyl ethers, PBDEs*) και οργανοχλωριωμένα φυτοπροστατευτικά προϊόντα - μη έμμονοι οργανικοί ρυπαντές, όπως φυτοπροστατευτικά προϊόντα (εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα), η διφαινόλη Α (*bisphenol A, BPA*), τα *parabens*, οι φθαλικοί εστέρες, οι πτητικές οργανικές ουσίες (*volatile organic compounds, VOCs*) και οι πολυκυκλικοί αρωματικοί/πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες (*polycyclic aromatic/polyaromatic hydrocarbons, PAHs*). [1]

Αναφορικά με την τοξικότητα των ουσιών αυτών, ορισμένες είναι ύποπτες για καρκινογένεση, μεταλλαξιγένεση, πρόκληση βλαβών στο αναπαραγωγικό σύστημα ή ενδοκρινικών διαταραχών. Ως ιδιότητες η βιοσυσσώρευση και η παρατεταμένη παραμονή θεωρούνται ύποπτες, διότι επιτρέπουν στις ουσίες που τις διαθέτουν να προκαλούν δυσμενείς επιδράσεις μέχρι και πολλές δεκαετίες μετά την απελευθέρωσή τους στο περιβάλλον. Από την άλλη μεριά, παρατεταμένη έκθεση σε χημικές ουσίες που χαρακτηρίζονται από πρόκληση οξείας ή υποχρόνιας τοξικότητας μπορεί να είναι επίσης επικίνδυνη. [4]

Στο πλαίσιο αυτό ωστόσο, ένα βασικό πρόβλημα είναι η έλλειψη κατάλληλων και ικανοποιητικών δεδομένων για την εκτίμηση της επικινδυνότητας για πολλές χημικές ουσίες και μείγματα, καθώς και πληροφορίες αναφορικά με το πώς η απαγόρευση ή ο περιορισμός της χρήσης τους θα επηρέαζε τα επίπεδα έκθεσης. Ενώ η κλασική προσέγγιση της εκτίμησης της επικινδυνότητας βασίζεται κυρίως σε πειράματα σε ζώα, *in vitro* μελέτες και υπολογιστικά (*in silico*) μοντέλα, υπάρχει ανάγκη για δεδομένα, τα οποία να αξιολογούν και να επαληθεύουν τα πορίσματα της διαδικασίας εκτίμησης της επικινδυνότητας, ειδικά στο στάδιο της εκτίμησης της έκθεσης (*exposure assessment*) του πληθυσμού. [4]

Η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση αποτελεί το μοναδικό εργαλείο για τον προσδιορισμό της τρέχουσας συνολικής έκθεσης του σώματος σε χημικούς παράγοντες, ικανό να ρίξει φως στην πολύπλοκη αλυσιδωτή σχέση αιτίας - αιτιατού μεταξύ επικινδυνότητα και δυνητικών επιπτώσεων για την υγεία. [4]

Η έκθεση σε περιβαλλοντικούς ρυπαντές λαμβάνει χώρα μέσω διακριτών οδών. Η ποσότητα πρόσληψης ενός ρυπαντή συχνά αναφέρεται ως απορροφούμενη δόση

("absorbed dose"). Έτσι, η ποσότητα ενός συγκεκριμένου ρυπαντή σε έναν οργανισμό καθορίζεται από παράγοντες, όπως η συγκέντρωση του ρυπαντή σε ένα συγκεκριμένο περιβαλλοντικό μέσο, οι φυσικοχημικές του ιδιότητες και ο χρόνος έκθεσης, καθώς και εξατομικευμένοι παράγοντες, όπως η ποσότητα πρόσληψης και ο ρυθμός μεταβολισμού και απέκκρισης. Η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση λαμβάνει υπόψη της όλους αυτούς τους παράγοντες μετρώντας τη συγκέντρωση του ρυπαντή - χημικής ουσίας ή μεταβολιτών του σε ανθρώπινα βιολογικά υποστρώματα (βιολογικά ή σωματικά υγρά και ιστούς). Εν αντιθέσει με την προσέγγιση αυτή, η ολοκληρωμένη εκτίμηση της έκθεσης βασιζόμενη σε περιβαλλοντικά δεδομένα, για ρυπαντές οι οποίοι μπορούν να εισέλθουν στον ανθρώπινο οργανισμό μέσω διαφόρων οδών έκθεσης, απαιτεί ποσοτικοποίηση των επιπέδων του ρυπαντή σε διάφορα μέσα και δεδομένα για εξατομικευμένα πρότυπα συμπεριφοράς που επηρεάζουν την έκθεση (π.χ. η κατανάλωση τροφών που περιέχουν αυτούς τους ρυπαντές). [1]

Η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση μπορεί να οριστεί ως μία μέθοδος εκτίμησης της ανθρώπινης έκθεσης σε χημικές ουσίες - ξενοβιοτικούς παράγοντες ή των επιδράσεών τους, προσδιορίζοντας, είτε τις ουσίες αυτές καθ' αυτές (μητρικά μόρια), είτε μεταβολίτες τους, είτε κάποιο προϊόν αλληλεπίδρασης μεταξύ του ξενοβιοτικού και ενός μορίου ή κυττάρου - στόχου (π.χ. επίπεδα *διφαινόλης Α* και μεταβολιτών φθαλικών εστέρων ή ενώσεων προσθήκης με το DNA στα ούρα), είτε κάποιο δείκτη επακόλουθων συνεπειών για την υγεία σε ανθρώπινα δείγματα. Περιλαμβάνει μετρήσεις βιοδεικτών σε βιολογικά υγρά, όπως αίμα, ούρα, σάλιο, μητρικό γάλα, ιδρώτα και άλλα δείγματα, όπως κόπρανα, μαλλιά, δόντια και νύχια. [1],[5],[6]

Οι πληροφορίες που προκύπτουν από τη διαδικασία αυτή συνδυαζόμενες με δεδομένα από πηγές έκθεσης και επιδημιολογικές μελέτες, μπορούν να βοηθήσουν στην αποσαφήνιση της σχέσης έκθεσης - απόκρισης. Αυτή η σχέση έκθεσης - απόκρισης και κατά συνέπεια επίδρασης στην ανθρώπινη υγεία, παραμένει ασαφής για πολλές χημικές ουσίες. Επιπλέον, η έκθεση του ανθρώπου σε μείγματα χημικών ουσιών και αναδυόμενων ρύπων έχει κατανοηθεί ελάχιστα. Σε ατομικό δε επίπεδο, τα δεδομένα της ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ιατρική θεραπεία ή ως καθοδήγηση για την ανάγκη μείωσης της έκθεσης. Επιπλέον, αντικατοπτρίζουν άμεσα το συνολικό φορτίο ή τις βιολογικές επιδράσεις μιας χημικής ουσίας συνεπεία όλων των πιθανών οδών έκθεσης και της διατομικής μεταβλητότητας αναφορικά με τα επίπεδα έκθεσης και τους ρυθμούς μεταβολισμού και απέκκρισης. Τέτοια δεδομένα συνήθως αποτελούν την πλέον κατάλληλη μέτρηση για την εκτίμηση των επιπτώσεων στην υγεία, ειδικά για βιοσυσσωρευσιμες ή έμμονες χημικές ουσίες, που αποθηκεύονται στον οργανισμό σε διάφορους ιστούς για μεγάλα χρονικά διαστήματα, όπως οι έμμονοι οργανικοί ρυπαντές, ο μόλυβδος και το κάδμιο. Για χημικές ουσίες, οι οποίες απεκκρίνονται γρήγορα, τα δεδομένα βιοπαρακολούθησης από συγχρονικές μελέτες (*cross-sectional studies*) αντικατοπτρίζουν πρόσφατη έκθεση στις ουσίες αυτές, ενώ από την άλλη μεριά, η δημιουργία εξατομικευμένων προτύπων μακροχρόνιας έκθεσης απαιτεί επαναλαμβανόμενες δειγματοληψίες και μετρήσεις. [1],[5],[6]

Η βιοπαρακολούθηση ωστόσο συνήθως δεν αποκαλύπτει την πηγή ή την οδό έκθεσης. Συνεπώς, η περιβαλλοντική παρακολούθηση παραμένει ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη στοχευμένων δράσεων πολιτικής. [1]

1.2.2 Αξιοποίηση των δεδομένων βιοπαρακολούθησης

Η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό συμπληρωματικό κομμάτι στις συμβατικές προσεγγίσεις για την εκτίμηση της επικινδυνότητας σε κανονιστικό επίπεδο και για την υποστήριξη πολιτικών προστασίας της δημόσιας υγείας. [1]

Επιπλέον, μπορεί να αξιοποιηθεί και στην υποστήριξη πολιτικών προστασίας της δημόσιας υγείας που εστιάζουν στην πρόληψη της έκθεσης και στον έγκαιρο εντοπισμό των ομοιοστατικών διαταραχών που μπορεί να οδηγήσουν σε δυσμενείς επιπτώσεις στην υγεία. [1]

Η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών μεθόδων. Για παράδειγμα, τα βιολογικά δείγματα μπορούν να αποκαλύψουν τα συνολικά αποτελέσματα επαναλαμβανόμενης έκθεσης σε μια χημική ουσία. Επιπλέον, η προσέγγιση αυτή λαμβάνει υπόψη όλες τις πιθανές οδούς έκθεσης εισπνοή, απορρόφηση μέσω του δέρματος και κατάποση, συμπεριλαμβανομένης και της μεταφοράς από τα χέρια στο στόμα ειδικά για τα παιδιά. Τέτοια δείγματα αντικατοπτρίζουν επίσης τις τροποποιητικές επιδράσεις στη φυσιολογία, τη βιοδιαθεσιμότητα και τη βιοσυσώρευση, οι οποίες μπορούν να μεγεθύνουν τις συγκεντρώσεις ορισμένων χημικών ρυπαντών αρκετά πάνω από τα όρια ανίχνευσης. Εντούτοις, το μεγαλύτερο ίσως πλεονέκτημα της εξέτασης των βιολογικών δειγμάτων είναι η συμβολή στην παρατήρηση συσχετίσεων μεταξύ έκθεσης και επακόλουθης συνέπειας - ασθένειας στα άτομα που υπόκεινται σε αυτήν. Η παρατήρηση συχνά αποτελεί στοιχείο ιδιαίτερης βαρύτητας, προκειμένου να αποδειχθεί εάν τελικά υπάρχει ή όχι συσχέτιση. Τέλος, ένα ακόμα μεγάλο πλεονέκτημα της βιοπαρακολούθησης σε συνδυασμό με την περιβαλλοντική παρακολούθηση είναι ότι παρέχει σαφείς αποδείξεις ότι τόσο η έκθεση όσο και η πρόσληψη έχουν λάβει χώρα. [7]

1.3 Δείγματα - υποστρώματα στη βιοπαρακολούθηση

Αφότου μια χημική ουσία απορροφηθεί από τον ανθρώπινο οργανισμό μπορεί είτε να απεκκριθεί (μεταβολισμένη ή μη), είτε να εναποτεθεί σε διάφορους ιστούς και οστά. Αν και υπάρχουν διάφορα βιολογικά υποστρώματα, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση, ορισμένοι παράγοντες χημικής ειδικότητας περιορίζουν τις δυνατές επιλογές. Αυτό συμβαίνει λόγω των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των χημικών ουσιών. Οι ιδιότητες αυτές καθορίζουν τον μεταβολισμό και την οδό απέκκρισής τους, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται άμεσα και η επιλογή του κατάλληλου υποστρώματος. Εντούτοις, οι εφαρμογές των σύγχρονων και εξελιγμένων αναλυτικών τεχνικών, που παρέχουν πολύ χαμηλά όρια ποσοτικοποίησης έχει βελτιώσει τις

δυνατότητες και τις επιλογές στις μελέτες βιοπαρακολούθησης, επιτρέποντας τη χρήση λιγότερο επεμβατικών λήψεων από υποστρώματα με σχετικά χαμηλή συγκέντρωση ξενοβιοτικών ουσιών. Για παράδειγμα, οι διοξίνες (που είναι λιπόφιλες ενώσεις) τη δεκαετία του 1980 μετρήθηκαν σε λιπώδη ιστό που περιείχε 65-95% λίπος, αλλά σήμερα μετρώνται σε ορό που περιέχει μόνο 0,5-0,6% λίπος. [1] Τα βιολογικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στις μελέτες βιοπαρακολούθησης θα πρέπει να λαμβάνονται εύκολα, σε ικανοποιητικές ποσότητες, κάτω από συνήθεις συνθήκες, χωρίς να προκαλείται ενόχληση στους συμμετέχοντες ή κίνδυνος για την υγεία τους. [8]

1.3.1 Αίμα

Το αίμα είναι ένα αρκετά πολύπλοκο υπόστρωμα. Σε 1L αίματος περιέχονται περίπου 460mL ερυθρών αιμοσφαιρίων στον άνδρα και 410mL στη γυναίκα. Στο ολικό αίμα απαντώνται διάφοροι κυτταρικοί τύποι, οι οποίοι αποτελούν τα έμμορφα συστατικά του. Αναλυτικότερα, σε 1mL αίματος υπάρχουν περίπου 5×10^6 ερυθρά αιμοσφαίρια (ερυθροκύτταρα) στους άνδρες και $4,5 \times 10^6$ στις γυναίκες, $4-6 \times 10^3$ λευκά αιμοσφαίρια (λευκοκύτταρα) και $0,15-0,3 \times 10^6$ αιμοπετάλια (θρομβοκύτταρα). Ο όγκος του αίματος στους ενήλικους ανθρώπους ανέρχεται στα 4-5L και το βάρος του αποτελεί το 6-8% του σωματικού βάρους. Ο φυσιολογικός λευκοκυτταρικός τύπος αποτελείται από 67% περίπου κοκκιοκύτταρα (πολυμορφοπύρρηνα), 27% λεμφοκύτταρα και 6% μονοπύρρηνα (μονοκύτταρα).

Η υγρή φάση του αίματος είναι το *πλάσμα*, που έχει ωσμωμοριακή συγκέντρωση 290mOsm/Kg H₂O και περιέχει 65-80g πρωτεϊνών/L, μεταξύ των οποίων τη λευκωματίνη (αλβουμίνη), διάφορες σφαιρίνες και το ινωδογόνο. Κατά την πήξη του αίματος το ινωδογόνο χρησιμοποιείται και το υγρό που απομένει αποτελεί τον *ορό του αίματος*. [9]

Το αίμα αποτελεί ένα από τα πιο συνήθη υποστρώματα στις μελέτες ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης. Ένας βασικός λόγος είναι ότι οι διαδικασίες δειγματοληψίας αίματος είναι τυποποιημένες και πολλοί άνθρωποι είναι εξοικειωμένοι με τη λήψη τέτοιου είδους δείγματος.

Επιπλέον, είναι το προτιμώμενο υπόστρωμα για πολλές χημικές ουσίες, καθώς βρίσκεται σε συνεχή επαφή με ολόκληρο τον οργανισμό και σε ισορροπία με τα όργανα και τους ιστούς, στους οποίους οι ουσίες αυτές δύναται να εναποθεθούν. Έτσι, έμμονες ουσίες, όπως τα οργανοχλωριωμένα εντομοκτόνα συνηθίζεται να προσδιορίζονται στο αίμα (και στο ανθρώπινο γάλα). [1],[8]

1.3.2 Ούρα

Τα ούρα αποτελούν υγρό παραπροϊόν του μεταβολισμού διαφόρων ουσιών στους ανθρώπους και σε πολλά ζώα. Ο μεταβολισμός αποσκοπεί στην αποβολή από τον οργανισμό άχρηστων ή/και τοξικών ουσιών. Εξάλλου, από ορισμένες ξενοβιοτικές ουσίες ενδέχεται να προκύψουν προϊόντα (μεταβολίτες) λιγότερο ή περισσότερο τοξικά, όπως

συμβαίνει στην περίπτωση ορισμένων οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (βλ. §1.6.5.1). Ως ούρα ορίζεται το σύνολο των ουσιών που αποβάλλονται από τους νεφρούς και δια μέσου των υπόλοιπων οργάνων του ουροποιητικού συστήματος έξω από το σώμα. Δημιουργούνται από διαδικασίες που συμβαίνουν στο ουροποιητικό σύστημα και συνοπτικά περιλαμβάνουν διεργασίες διήθησης όλων των πλεοναζόντων ουσιών στο αίμα (νερό, γλυκόζη, ηλεκτρολύτες, τοξίνες κ.ά.), επαναρρόφησης μέρους αυτών (π.χ. ηλεκτρολύτες, αμινοξέα, ουρικό οξύ, πρωτεΐνες, γλυκόζη κ.ά. για τη διατήρηση ισορροπιών και ισοζυγίων) και απέκκρισης. Σημειώνεται ότι κατά τη διήθηση του αίματος, τα μικρά μόρια του πλάσματος (με ακτίνα μέχρι 1,8nm και $M_R \leq 15.000\text{Da}$), διηθούνται ελεύθερα εφόσον δεν συνδέονται με πρωτεΐνες του πλάσματος, οι οποίες είναι πολύ μεγάλες και δεν διηθούνται. Πρωτεΐνες με μοριακή ακτίνα μέχρι 4,4nm και $M_R \leq 80.000\text{Da}$ διηθούνται εν μέρει, με τον βαθμό διήθησης να εξαρτάται από το μέγεθος και το φορτίο τους. [9],[10]

Σαν δείγμα, τα ούρα είναι ένα άμεσα και εύκολα διαθέσιμα σε μεγάλους όγκους με μη παρεμβατικές διαδικασίες, επιτρέποντας τον προσδιορισμό πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων χημικών ουσιών, η παρουσία των οποίων μπορεί να οφείλεται σε περιβαλλοντική ή και διατροφική έκθεση. Τα δείγματα μπορούν να συλλεγούν απευθείας από τους δωρητές, γεγονός που απλοποιεί τη σχετική διαδικασία. Τα ούρα αποτελούν το πιο χρήσιμο υπόστρωμα για την ανάλυση των ταχέως μεταβολιζόμενων και εκκρινόμενων χημικών ουσιών. Προβλήματα που σχετίζονται με τα ούρα ως υπόστρωμα βιολογικής παρακολούθησης αφορούν στην ευρεία μεταβλητότητα των ποσοστών απέκκρισής τους, καθώς και στη μεγάλη χρονική μεταβλητότητα στη σύνθεσή τους μεταξύ διαφορετικών ατόμων. [1]

Οι βιοδείκτες των ούρων χρησιμοποιούνται για ταχέως μεταβολιζόμενες και απεκκρινόμενες χημικές ουσίες, όπως τα μη-έμμονα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (σε αυτά ανήκουν αρκετά οργανοφωσφορικά και τα πυρεθροειδή εντομοκτόνα, καθώς και τα χλωροακετανιλίδια και οι τριαζίνες, που είναι ζιζανιοκτόνα), η *δифαινόλη Α* και άλλες φαινόλες, τα *parabens*, οι φθαλικοί εστέρες, πιητικές οργανικές ενώσεις και οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες. Τα ούρα χρησιμοποιούνται επίσης για την παρακολούθηση της έκθεσης σε ορισμένα μέταλλα, όπως το αρσενικό και ο ανόργανος υδράργυρος. [1]

1.3.3 Άλλα υποστρώματα βιοπαρακολούθησης

Οι μελέτες ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης μπορούν να περιλαμβάνουν και την ανάλυση περιβαλλοντικών ρυπαντών σε άλλα υποστρώματα, όπως μαλλιά - τρίχες, νύχια, πτόελα, νεογιλά δόντια και πνευμονικός αέρας. Ωστόσο η ευρεία εφαρμογή των υποστρωμάτων αυτών για τους σκοπούς μελετών βιοπαρακολούθησης υπόκειται σε αρκετούς περιορισμούς. [1],[8]

Αναφορικά με τα μαλλιά, εξωγενείς επιδράσεις, το είδος της ατομικής περιποίησης των μαλλιών και άλλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τα αναλυτικά αποτελέσματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα στην εκτίμηση της έκθεσης σε μεθυλικό

υδράργυρο (λόγω κατανάλωσης ψαριών προερχόμενα από ρυπασμένα ύδατα) ή ανόργανο αρσενικό, τα μαλλιά και τα νύχια μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως κατάλληλο υπόστρωμα για την εφαρμογή σε περιβαλλοντικές μελέτες βιοπαρακολούθησης. Τα δόντια επίσης δεν αποτελούν κατάλληλο υπόστρωμα στη βιοπαρακολούθηση, καθώς δεν είναι ευρέως και εύκολα διαθέσιμα και κατά βάση η απόκτησή τους είναι άκρως παρεμβατική. [1],[8]

Ο εντοπισμός βιοδεικτών στα πύελα είναι μια πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση, ακόμη και αν λίγες ουσίες (όπως τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και ο μόλυβδος) έχουν δείξει μέχρι στιγμής μέτρια συσχέτιση με τα δεδομένα έκθεσης ή με τα ευρέως χρησιμοποιούμενα υποστρώματα βιοπαρακολούθησης όπως είναι το ολικό αίμα, το πλάσμα αυτού και τα ούρα. [1],[8]

Ο πνευμονικός αέρας είναι ένα υπόστρωμα, που επίσης μπορεί να ληφθεί μη επεμβατικά και διευκολύνει την άμεση συσχέτιση της συγκέντρωσης μίας εισπνεόμενης χημικής ουσίας με αντίστοιχες συγκεντρώσεις τοξικολογικής σημασίας. Ωστόσο η δειγματοληψία, η μεταφορά και η αποθήκευση δειγμάτων πνευμονικού αέρα είναι κρίσιμες παράμετροι, λόγω απωλειών, π.χ. με απορρόφηση. Τέτοια πρακτικά προβλήματα εμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή αυτού του υποστρώματος. [1],[8]

1.4 Βιοδείκτες

Η επιλογή των βιοδεικτών εξαρτάται από τον στόχο της εκάστοτε μελέτης. Πρέπει να καθοδηγείται κυρίως από επιστημονικά κριτήρια (βασισμένα σε πληροφορίες από διεθνείς οργανισμούς, π.χ. ο *Διεθνής Οργανισμός Ερευνών για τον Καρκίνο, International Agency for Research on Cancer, IARC*), όπως αναμενόμενες επιπτώσεις για την υγεία, διαθέσιμες οδηγίες, αναμενόμενα εύρη έκθεσης (βασισμένα σε δημοσιευμένα αποτελέσματα εθνικών και διεθνών μελετών ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης και έγκυρες αναλυτικές τεχνικές με όρια ανίχνευσης αρκετά χαμηλά, ώστε να προσδιορίζουν τα αναμενόμενα επίπεδα στον εξεταζόμενο πληθυσμό). Επιπλέον, παράγοντες πρακτικής σημασίας, όπως η πολυπλοκότητα της εργασίας στο πεδίο και το κόστος ανάλυσης μπορεί να είναι σημαντικοί για την επιλογή των κατάλληλων βιοδεικτών. [1]

Οι βιολογικοί δείκτες ή βιοδείκτες γενικά περιλαμβάνουν βιοχημικά, μοριακά, γενετικά, ανοσολογικά ή φυσιολογικά σήματα γεγονότων που λαμβάνουν χώρα σε βιολογικά συστήματα. Οι βιοδείκτες παραδοσιακά διαχωρίζονται σε βιοδείκτες έκθεσης, επίδρασης και ευαισθησίας, ενώ τα τελευταία χρόνια έχουν κάνει την εμφάνισή τους και οι βιοδείκτες -ομικής σε ερευνητικό κυρίως επίπεδο. Αν και οι διαφορετικοί τύποι βιοδεικτών θεωρούνται ξεχωριστοί και εναλλακτικοί για σκοπούς ταξινόμησης, δεν είναι πάντοτε δυνατή η καταχώριση ενός βιοδείκτη σε μία από αυτές τις κατηγορίες, καθώς η κατάταξή του μερικές φορές εξαρτάται από την τοξικολογική του σημασία και από το συγκεκριμένο πλαίσιο στο οποίο χρησιμοποιείται η δοκιμή. [1],[11]

1.4.1 Βιοδείκτες έκθεσης

Πιθανώς το πιο γνωστό παράδειγμα αποτελεί ο μόλυβδος, του οποίου ο χρόνος ημιζωής κυμαίνεται από περίπου ένα μήνα στο αίμα έως περίπου ένα χρόνο σε μαλακούς ιστούς και έως είκοσι χρόνια στα οστά. Σαν γενικός κανόνας, ως βιοδείκτες έκθεσης για ενώσεις που παραμένουν σταθερές στο ανθρώπινο σώμα, όπως διοξίνες, πολυχλωριωμένα διφαινύλια παρόμοια με διοξίνες, που έχουν τα ίδια τοξικολογικά χαρακτηριστικά με τις διοξίνες (*dioxin-like PCBs*) και μέταλλα χρησιμοποιούνται τα μητρικά μόρια και προσδιορίζεται η συγκέντρωσή τους στο αίμα, στον ορό ή στα ούρα. Για χημικούς ρυπαντές οι οποίοι μεταβολίζονται γρήγορα, όπως τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα και οι φθαλικοί εστέρες, ως βιοδείκτες έκθεσης συνήθως χρησιμοποιούνται ένας ή περισσότεροι μεταβολίτες του μητρικού μορίου και ο προσδιορισμός πραγματοποιείται κυρίως στα ούρα. [1]

Ως βιοδείκτης έκθεσης (biomarker of exposure) ορίζεται μία εξωγενής ουσία ή ένας μεταβολίτης της ή το προϊόν αλληλεπίδρασης του ξеноβιοτικού παράγοντα με κάποιο μόριο ή κέλυτρο στόχο και μπορεί να προσδιοριστεί σε κάποιο τμήμα του οργανισμού (υπόστρωμα - βιολογικό υγρό ή ιστό). [11]

Είναι επίσης σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη η κινητική του βιοδείκτη ενδιαφέροντος, καθώς διαφορετικά υποστρώματα αντανάκλουν διαφορετικές χρονικές περιόδους έκθεσης. Οι βιοδείκτες έκθεσης μπορούν να διαχωριστούν σε δείκτες εσωτερικής δόσης και βιολογικά αποτελεσματική δόσης. Ο απλούστερος βιοδείκτης εσωτερικής δόσης είναι η συγκέντρωση ενός χημικού παράγοντα στο αίμα αμέσως μετά την έκθεση σε αυτόν. [1],[11]

1.4.2 Βιοδείκτες ευαισθησίας

Οι βιοδείκτες ευαισθησίας αντικατοπτρίζουν τα εγγενή χαρακτηριστικά ενός οργανισμού που τον καθιστούν πιο ευαίσθητο στις δυσμενείς επιπτώσεις της έκθεσης σε μια συγκεκριμένη ουσία, δηλαδή έναν χημικό, φυσικό ή βιολογικό παράγοντα.

Ο βιοδείκτης ευαισθησίας (biomarker of susceptibility) ορίζεται ως ο δείκτης ή το μέτρο μιας έμφυτης ή επίκτητης ικανότητας ενός οργανισμού να ανταποκριθεί στην πρόκληση της έκθεσης σε μια συγκεκριμένη ξеноβιοτική ουσία.

Επομένως, οποιαδήποτε μεταβολή στην απόκριση ενός ατόμου σε πανομοιότυπες εκθέσεις μπορεί να αντιπροσωπεύει κάποια διαφορά στην ευαισθησία, είτε λόγω της γενετικής φύσης του, είτε λόγω μεταβολών και περιβαλλοντικών επιδράσεων, όπως η διατροφή ή η πρόσληψη και απορρόφηση των ξеноβιοτικών. [1],[11]

1.4.3 Βιοδείκτες επίδρασης

Χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενός ζωντανού οργανισμού και ενός ξеноβιοτικού (χημικού, φυσικού ή βιολογικού παράγοντα) και είναι ιδιαίτερα χρήσιμοι στην εκτίμηση του κινδύνου ανάπτυξης μιας δεδομένης ασθένειας. [6]

Οι βιοδείκτες επίδρασης (ονομάζονται και βιοδείκτες βιολογικής απόκρισης) είναι σημαντικοί για τον προσδιορισμό της σχέσης μεταξύ της έκθεσης σε επιμολυντές και των δυσμενών επιπτώσεων στην υγεία. Παρέχουν πληροφορίες που καθιστούν δυνατή την ελαχιστοποίηση των δυσμενών επιπτώσεων, την εφαρμογή αποτελεσματικών προληπτικών παρεμβάσεων και τον προσδιορισμό των ατόμων που είναι περισσότερο ευπαθή σε συγκεκριμένες χημικές ενώσεις. Είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την εκτίμηση της επικινδυνότητας και την ανάπτυξη νέων χημικών ενώσεων. [6]

Οι βιοδείκτες επίδρασης αντανακλούν ποσοτικές μεταβολές σε βιοχημικές, φυσιολογικές ή άλλες παραμέτρους, που συμβαίνουν σε έναν οργανισμό ως αποτέλεσμα της έκθεσης σε έναν χημικό παράγοντα. Ιδανικά, ένας τέτοιος βιοδείκτης θα πρέπει να αποκαλύπτει πρώιμες και αναστρέψιμες μεταβολές σε έναν οργανισμό. [1]

Το Διεθνές πρόγραμμα χημικής ασφάλειας (*International Programme on Chemical Safety, IPCS*) του Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (*ΠΟΥ, World Health Organization, WHO*) ορίζει τον βιοδείκτη επίδρασης (*biomarker of effect*) ως μία μετρήσιμη βιοχημική, φυσιολογική, συμπεριφοριστική ή άλλη μεταβολή σε έναν οργανισμό, η οποία ανάλογα με το μέγεθός της μπορεί να χαρακτηριστεί ως σχετιζόμενη με μία καθορισμένη ή πιθανή βλάβη στην υγεία ή ασθένεια. Ιστορικά και κυρίως για πρακτικούς λόγους οι δείκτες αυτοί έχουν χρησιμοποιηθεί ευρύτερα και συνηθέστερα. [11]

Μια σημαντική ομάδα βιοδεικτών επίδρασης είναι οι βιοδείκτες γενετοξικότητας σε εργαζόμενους που εκτίθενται σε μεταλλαξιγόνους ή γενετοξικούς παράγοντες. Οι βιοδείκτες αυτοί έχουν αναπτυχθεί σε ζώα (ακόμη και *in vitro*) και τώρα εφαρμόζονται όλο και περισσότερο σε επαγγελματικά εκτεθειμένους πληθυσμούς. [11]

Συνοπτικά, οι βιοδείκτες επίδρασης που χρησιμοποιούνται στην πρώιμη πρόβλεψη κλινικών παθήσεων μπορούν να βελτιώσουν την επαγγελματική εκτίμηση κινδύνου για την υγεία και εφόσον πρώτα επικυρωθούν, να συμβάλουν στην εφαρμογή νέων αποτελεσματικών πολιτικών πρόληψης ασθενειών σε επαγγελματικές και περιβαλλοντικές συνθήκες. [11]

1.4.4 Εργαστηριακή ανάλυση βιοδεικτών

Η εργαστηριακή ανάλυση ανθρώπινων δειγμάτων αποτελεί αναπόσπαστο μέρος οποιασδήποτε μελέτης βιοπαρακολούθησης, ενώ η επίτευξη της εργαστηριακής επικύρωσής τους είναι ένα φυσικό επόμενο βήμα μετά την απλή παρατήρηση και αναγνώριση μιας χημικής ουσίας ως αναλύτη στόχου - βιοδείκτη στα κατάλληλα ανθρώπινα υποστρώματα. [7]

Όταν επιλέγεται μία αναλυτική μέθοδος για εφαρμογή σε βιολογικά δείγματα, θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη τόσο η συγκέντρωση των περιεχόμενων οργανικών ενώσεων, όσο και η συνθετότητα των αντίστοιχων υποστρωμάτων. Για την απομόνωση και την προσυγκέντρωση του αναλύτη στόχου είναι απαραίτητη η εφαρμογή κατάλληλων, τυποποιημένων διαδικασιών προκατεργασίας των δειγμάτων (βλ. §3.2), προκειμένου να βελτιστοποιηθεί η ανάκτησή του (βλ. §2.8.9). Η προκατεργασία και ο καθαρισμός των

δειγμάτων στοχεύουν στην ελαχιστοποίηση των χημικών παρεμποδίσεων και τον εμπλουτισμό των τελικών - προς μέτρηση διαλυμάτων με τον αναλύτη στόχο σε ανιχνεύσιμα τουλάχιστον επίπεδα. [1]

Αναφορικά με την προκατεργασία, η υγρή - υγρή εκχύλιση (*Liquid-Liquid Extraction, LLE*) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (*Solid-Phase Extraction, SPE*) αποτελούν κλασσικές μεθόδους εκχύλισης οργανικών ουσιών από υγρά δείγματα. Η εκχύλιση στερεάς φάσης έχει πολλά πλεονεκτήματα έναντι της υγρής - υγρής εκχύλισης, όπως καλύτερη επιλεκτικότητα, ειδικότητα και αναπαραγωγιμότητα, κατανάλωση μικρότερων ποσοτήτων διαλύτη, μικρότερους χρόνους προετοιμασίας των δειγμάτων, ευκολία, λειτουργικότητα και αυτοματισμό. Με βάση τα χαρακτηριστικά του αναλύτη στόχου και του υποστρώματος (π.χ. πολικότητα), μπορούν να επιλεγούν διαφορετικά προσροφητικά υλικά *SPE*. [1]

Για την ποσοτική ανάλυση οργανικών ουσιών ενδείκνυνται οργανολογίες, οι οποίες περιλαμβάνουν συστήματα χρωματογραφικού διαχωρισμού και φασματογράφους μάζας (για τον διαχωρισμό των περιεχόμενων συστατικών των μετρούμενων διαλυμάτων και την ανίχνευση και ποσοτικοποίησή τους αντίστοιχα). Τέτοια συστήματα αποτελούν για παράδειγμα οι υγροί και οι αέριοι χρωματογράφοι συζευγμένοι με φασματογράφους μάζας σε σειρά, ή αναλυτές μάζας χρόνου πτήσης (*LC-MS/MS, LC-TOF-MS & GC-MS/MS*), που παρουσιάζουν μεγάλη ευαισθησία και ακρίβεια. [1]

1.5 Ταξινόμηση των τοξικών παραγόντων

Οι τοξικοί παράγοντες ταξινομούνται ανάλογα με τα ενδιαφέροντα και τις ανάγκες του εκάστοτε αρμοδίου για την ταξινόμηση. Τέτοια κριτήρια μπορούν να αποτελέσουν τα όργανα στόχοι, οι χρήσεις, η προέλευσή και οι επιδράσεις τους. Σημειωτέον, ο όρος "τοξίνη" ("*toxin*") αναφέρεται γενικά σε τοξικές ουσίες, οι οποίες παράγονται από βιολογικά συστήματα, όπως φυτά, ζώα, μύκητες και βακτήρια. Ο όρος "τοξικό προϊόν" ("*toxicant*") αναφέρεται σε τοξικές ουσίες, οι οποίες σχηματίζονται ως προϊόν ή παραπροϊόν ανθρώπινων δραστηριοτήτων.

Οι τοξικοί παράγοντες ταξινομούνται και ως προς τη φυσική τους κατάσταση, τη χημική τους σταθερότητα ή αντιδραστικότητα, τη γενική χημική δομή τους και το δυναμικό πρόκλησης δηλητηρίασης. Ωστόσο καμία ταξινόμηση δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε όλο το φάσμα των τοξικών παραγόντων μεμονωμένη και κατά συνέπεια απαιτείται συνδυασμός των παραπάνω κριτηρίων, προκειμένου να προκύψει ο πληρέστερος χαρακτηρισμός για κάθε μία χημική ουσία. [12]

1.6 Τοξικές επιδράσεις & Βιοπαρακολούθηση γεωργικών φαρμάκων

1.6.1 Ορισμός και κατηγοριοποίηση γεωργικών φαρμάκων

Ο Διεθνής Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (*Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO*) όριζε στον Διεθνή κώδικα δεοντολογίας για τη διαχείριση των γεωργικών

φαρμάκων (*"International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides"*, [13]) το 2002 το γεωργικό φάρμακο (*pesticide*) ως κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών που προορίζεται για την πρόληψη, την καταστροφή ή τον έλεγχο τυχόν επιβλαβών οργανισμών, όπως φορείς ανθρώπινων ή ζωικών ασθενειών, ανεπιθύμητα είδη φυτών ή ζώων, που είτε είναι βλαπτικά κατά τη διάρκεια ή παρεμβαίνουν στην παραγωγή, την επεξεργασία, την αποθήκευση, τη μεταφορά, ή την πώληση τροφίμων, γεωργικών προϊόντων, ξυλείας και προϊόντων της, ή ζωοτροφές, ή ουσίες που χορηγούνται σε ζώα για την καταπολέμηση εντόμων, αραχνοειδών, ή άλλων παρασίτων εντός ή επί του σώματός τους. Ο όρος περιλαμβάνει τις ουσίες που προορίζονται για ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών, αποφυλλωτικά, ξηραντικά, ή παράγοντες για το αραίωμα καρπών και προστασία από πρόωρη πτώση του φρούτου και ουσίες που χρησιμοποιούνται στις καλλιέργειες, είτε πριν είτε μετά τη συγκομιδή για να προστατεύσουν τα προϊόντα από αλλοίωση κατά τη διάρκεια της αποθήκευσης και της μεταφοράς. Στην αναθεωρημένη του έκδοση (2014, [14]) ο ορισμός περιορίζεται σε κάθε ουσία ή μείγμα ουσιών χημικών ή βιολογικών συστατικών που προορίζονται για την αλώθηση, την καταστροφή ή τον έλεγχο οποιωνδήποτε παρασίτων ή τη ρύθμιση της ανάπτυξης των φυτών.

Ως επιβλαβείς οργανισμοί μπορούν να θεωρηθούν τα έντομα, τα τρωκτικά, τα ζιζάνια και μία σειρά άλλων ανεπιθύμητων οργανισμών. Τα γεωργικά φάρμακα, ανάλογα με τον οργανισμό στόχο, κατηγοριοποιούνται ακριβέστερα σε εντομοκτόνα (*insecticides*), ζιζανιοκτόνα (*herbicides*), μυκητοκτόνα (*fungicides*), τρωκτικοκτόνα (*rodenticides*), ακαρεοκτόνα (*acaricides*), μαλακιοκτόνα (*molluscides*), προνυμφοκτόνα (*larvicides*) και φθειροκτόνα (*pediculocides*). Επίσης για ρυθμιστικούς σκοπούς συχνά ταξινομούνται σε αυτήν την ευρεία κατηγορία χημικών ενώσεων και οι ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών, οι χημειοαπωθητικές ουσίες και οι χημειοελκυστικές ουσίες (φερομόνες). [12],[15]

Μία άλλη σημαντική διάκριση των γεωργικών φαρμάκων βάσει του νόμου 4036 περί διάθεσης γεωργικών φαρμάκων στην αγορά και ορθολογική χρήση αυτών ([16]), διαχωρίζει τα γεωργικά φάρμακα σε δύο βασικές κατηγορίες:

- I. Φυτοπροστατευτικά προϊόντα, που προορίζονται για να προστατεύουν τα φυτά ή τα φυτικά προϊόντα από κάθε είδους επιβλαβείς οργανισμούς (*Ευρωπαϊκός Κανονισμός 1107/2009 σχετικά με τη διάθεση φυτοπροστατευτικών προϊόντων (plant protection products) στην αγορά* [17]).
- II. Βιοκτόνα προϊόντα, που προορίζονται για την καταπολέμηση οργανισμών επιβλαβών για την υγεία του ανθρώπου ή των ζώων, καθώς και οργανισμών που προκαλούν ζημιές σε φυσικά ή μεταποιημένα υλικά (*Ευρωπαϊκός Κανονισμός 528/2012 σχετικά με τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση βιοκτόνων (biocidal products)* [18]).

Γεωργικά φάρμακα, όπως εντομοκτόνα, ζιζανιοκτόνα, μυκητοκτόνα κ.ά. χρησιμοποιούνται παγκοσμίως κυρίως για την προστασία των φυτικών καρπών. Κατά συνέπεια, η πρόσληψή τους μέσω της τροφής αποτελεί την κύρια πηγή έκθεσης του γενικού πληθυσμού σε αυτά. Τα εντομοκτόνα χρησιμοποιούνται επίσης στην κτηνοτροφία, στα κατοικίδια ζώα και για τον έλεγχο των παρασίτων σε εσωτερικούς χώρους. [12]

1.6.2 Χρήση των γεωργικών φαρμάκων

Το 2015 η παγκόσμια κατανάλωση γεωργικών φαρμάκων ήταν 4.100.000t, 35% υψηλότερη από αυτήν που είχε αναφερθεί το 2000. Ωστόσο, τα τελευταία 25 περίπου χρόνια η χρησιμοποιούμενη ποσότητα γεωργικών φαρμάκων (σαν ποσότητα δραστικής ουσίας) έχει παραμείνει σταθερή, λόγω της χρήσης πιο αποτελεσματικών ενώσεων, οι οποίες απαιτούν λιγότερο δραστικά συστατικά. Τα γεωργικά φάρμακα στις περισσότερες περιπτώσεις, αν όχι πάντοτε, χρησιμοποιούνται σε μορφή σκευασμάτων με πολλαπλά συστατικά, όπου το δραστικό συστατικό συνδυάζεται με άλλα συστατικά για βελτιωμένη ανάμειξη, αραιώση, εφαρμογή και σταθερότητα. Τα συστατικά αυτά περιγράφονται συνολικά υπό τους όρους “αδρανή” ή “άλλα”. Αν και δεν έχουν δράση γεωργικού φαρμάκου, τα συστατικά αυτά δεν είναι πάντοτε ελεύθερα τοξικότητας. Συνεπώς οι παρασκευαστές και οι ρυθμιστικές αρχές οφείλουν να διασφαλίζουν διαρκώς ότι τα αδρανή συστατικά δεν προκαλούν αδικαιολόγητο κίνδυνο δυσμενών επιδράσεων για την υγεία. [12],[15],[19]

1.6.3 Έκθεση σε γεωργικά φάρμακα και κίνδυνος ανθρώπινης δηλητηρίασης

Η έκθεση σε γεωργικά φάρμακα μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω του στόματος (κατάποση), μέσω του δέρματος ή με εισπνοή. Υψηλές δόσεις από του στόματος, οι οποίες οδηγούν σε σοβαρή δηλητηρίαση και στον θάνατο, λαμβάνονται μετά από κατάποση με σκοπό την αυτοκτονία ή τη δολοφονία, είτε έπειτα από τυχαία κατάποση, συνήθως λόγω φύλαξης των σκευασμάτων σε ακατάλληλους περιέκτες. Αντίθετα, μακροχρόνιες, χαμηλές δόσεις καταναλώνονται από τον γενικό πληθυσμό υπό τη μορφή καταλοίπων στα τρόφιμα ή ρυπαντών στο πόσιμο νερό και για τον λόγο αυτόν υπάρχουν κανονισμοί που αποσκοπούν στη διατήρηση των καταλοίπων σε επίπεδα χαμηλότερα από εκείνα που προκαλούν δυσμενείς επιδράσεις. [12]

Οι εργαζόμενοι που συμμετέχουν στην παρασκευή, στη μεταφορά, στην ανάμειξη, στη φόρτωση και στη χρήση των γεωργικών φαρμάκων, αλλά και στη συγκομιδή των ψεκασμένων καρπών διατρέχουν τον υψηλότερο κίνδυνο έκθεσης σε αυτά. Στην περίπτωση της εφαρμογής στον αγρό, η έκθεση μπορεί να λάβει χώρα κυρίως μέσω του δέρματος (αποτελεί περίπου το 97% της συνολικής έκθεσης), της εισπνοής, του στόματος και των οφθαλμών. Δερματική έκθεση κατά τον κανονικό χειρισμό ή την χρήση των γεωργικών φαρμάκων ή μετά από τυχαία διαφυγή σημειώνεται σε περιοχές του σώματος που δεν καλύπτονται από προστατευτική ενδυμασία, όπως το πρόσωπο και τα χέρια. Για τον λόγο αυτό κρίνεται απαραίτητη η χρήση μέσων ατομικής προστασίας [17], για την ασφάλεια των χρηστών και τη μείωση της επικινδυνότητας (ως συνάρτηση του εγγενούς κινδύνου - τοξικότητας του εφαρμοζόμενου γεωργικού φαρμάκου και της έκθεσης) σε αποδεκτά επίπεδα. Επιπλέον η ποσότητα των γεωργικών φαρμάκων, που εναποτίθεται στα ενδύματα, μπορεί να διεισδύσει στο δέρμα ή και να προκαλέσει έκθεση άλλων προσώπων, εάν τα ρούχα δεν αλλαχθούν και δεν πλυθούν μετά το πέρας της έκθεσης. [12]

Τα γεωργικά φάρμακα δεν έχουν πάντοτε επλεκτικότητα ως προς τον οργανισμό στόχο και συνεπώς μπορούν να επηρεάσουν δυσμενώς και άλλα είδη οργανισμών,

συμπεριλαμβανομένου και του ανθρώπου. Στον γενικό πληθυσμό και στους εκτιθέμενους εργαζόμενους, πηγές ανησυχίας αποτελούν μεταξύ άλλων η οξεία δηλητηρίαση και η πιθανή συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης στα γεωργικά φάρμακα και του αυξημένου κινδύνου εμφάνισης καρκίνου. [12]

Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι σημειώνονται εκατομμύρια περιστατικά δηλητηριάσεων, που οδηγούν σε νοσηλεία και εκατοντάδες χιλιάδες θανάτους, ο ΠΟΥ, χρησιμοποιώντας σαν βάση τις κατηγορίες οξείας τοξικότητας του Παγκόσμια Εναρμονισμένου Συστήματος του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (*Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS*), συνιστά την ταξινόμηση των γεωργικών φαρμάκων βάσει του εγγενούς κινδύνου που τα συνοδεύει (*Hazard*) και τα εξετάζει ένα προς ένα αναφορικά με την οξεία τοξικότητά τους (βλ. πίνακα 1.1). [12],[21],[22]

Πίνακας 1.1: Τα συνιστώμενα από τον ΠΟΥ κριτήρια ταξινόμηση των γεωργικών φαρμάκων σύμφωνα με τον βαθμό εγγενούς κινδύνου (*Hazard*) [21],[22]

Τάξη		LD ₅₀ για τον αρουραίο (mg/kg σωματικού βάρους)	
		Από του στόματος	Μέσω του δέρματος
Ia	Εξαιρετικά επικίνδυνο (<i>Extremely hazardous</i>)	≤ 5	≤ 50
Ib	Πολύ επικίνδυνο (<i>Highly hazardous</i>)	5 - 50	50 - 200
II	Μετρίως επικίνδυνο (<i>Moderately hazardous</i>)	50 - 2000	200 - 2000
III	Ελαφρώς επικίνδυνο (<i>Slightly hazardous</i>)	> 2000	> 2000
U	Δεν αναμένεται να παρουσιάσει οξεία τοξικότητα (<i>Unlikely to present acute hazard</i>)	≥ 5000	

1.6.4 Ρυθμιστικές διατάξεις

Τα τελευταία χρόνια, ολοένα και αυξανόμενα στοιχεία τεκμηριώνουν την έκθεση ανθρώπινων πληθυσμών σε γεωργικά φάρμακα. [19] Σε διάφορες χώρες ανά τον κόσμο, όπως την Ευρωπαϊκή Ένωση, τις ΗΠΑ, τον Καναδά και την Ιαπωνία έχουν θεσπιστεί και εφαρμόζονται διαδικασίες για τον ρυθμιστικό έλεγχο, τόσο για την καταχώριση των γεωργικών φαρμάκων προτού αυτά διατεθούν στην αγορά, όσο και για τον καθορισμό μέγιστων επιτρεπτών επιπέδων καταλοίπων τους σε τρόφιμα, ζωοτροφές και το νερό ανθρώπινης κατανάλωσης. Για την Ευρωπαϊκή Ένωση αναφέρονται ενδεικτικά οι ακόλουθες νομοθετικές πράξεις:

- × Ευρωπαϊκός Κανονισμός 1107/2009 σχετικά με τη διάθεση φυτοπροστατευτικών προϊόντων στην αγορά [17]

- × Ευρωπαϊκός Κανονισμός 528/2012 σχετικά με τη διάθεση στην αγορά και τη χρήση βιοκτόνων [18]
- × Ευρωπαϊκός Κανονισμός 396/2005 σχετικά με τα ανώτατα όρια καταλοίπων φυτοφαρμάκων μέσα η πάνω στα τρόφιμα και τις ζωοτροφές φυτικής και ζωικής προέλευσης [23]
- × Ευρωπαϊκή Οδηγία 2020/2184 σχετικά με την ποιότητα του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης [24]

Ο ΠΟΥ προφέρει καθοδήγηση, ιδίως πάνω στον προσδιορισμό των αποδεκτών τιμών ημερήσιας πρόσληψης (*acceptable daily intake, ADI*) για τα γεωργικά φάρμακα. [12]

1.6.5 Εντομοκτόνα

Τα εντομοκτόνα διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στην καταπολέμηση των επιβλαβών εντόμων. Σε αυτήν την κατηγορία ανήκουν οργανοφωσφορικές ενώσεις, καρβαμιδικές ενώσεις, πυρεθροειδή, οργανοχλωριούχες ενώσεις, ροτενοειδή, νεονικοτινοειδή και αβερμεκτίνες. Όλα τα χημικά εντομοκτόνα που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι νευροτοξικές ουσίες, οι οποίες δηλητηριάζουν το νευρικό σύστημα των στοχευόμενων οργανισμών (βλ. πίνακα 1.2). Το κεντρικό νευρικό σύστημα των εντόμων είναι ιδιαίτερα ανεπτυγμένο και δεν διαφέρει σημαντικά από το σύστημα των θηλαστικών, με συνέπεια τα εντομοκτόνα να εμφανίζουν υψηλή οξεία τοξικότητα προς μη στοχευμένα είδη σε σύγκριση με άλλα φυτοφάρμακα. Ορισμένα από αυτά – ιδίως τα οργανοφωσφορικά – ευθύνονται για μεγάλο αριθμό δηλητηριάσεων και θανάτων κάθε χρόνο¹. [15]

Πίνακας 1.2: Μοριακοί στόχοι των κυριότερων κατηγοριών εντομοκτόνων

Στόχος	Εντομοκτόνο	Δράση
Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)	Οργανοφωσφορικά Καρβαμιδικά	Αναστολή Αναστολή
Δίαυλοι νατρίου	Πυρεθροειδή (τύπου I & II) DDT Δωδροπυραζόλες	Ενεργοποίηση Ενεργοποίηση Αναστολή
Νικοτινικοί υποδοχείς ακετυλοχολίνης	Νικοτίνη Νεονικοτινοειδή	Ενεργοποίηση Ενεργοποίηση
Δίαυλοι χλωρίου, ελεγχόμενοι από υποδοχείς GABA	Κυκλοδιένια Φαινυλοπυραζόλες Πυρεθροειδή (τύπου II)	Αναστολή Αναστολή Αναστολή

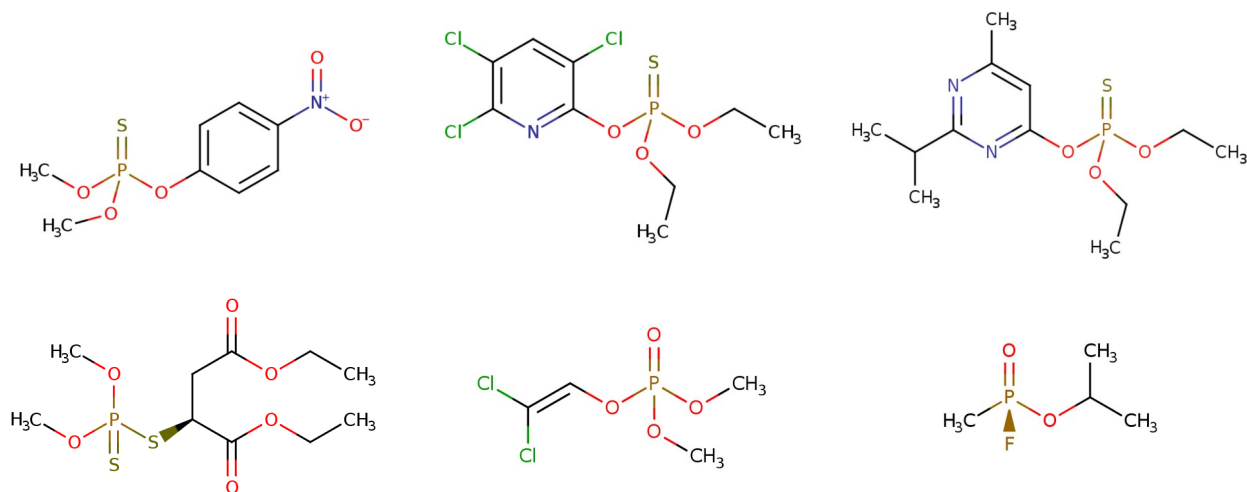
1 Επιλεγμένα οργανοφωσφορικά και πυρεθροειδή εντομοκτόνα, καθώς και φαινοξυοξέα ζιζανιοκτόνα αναφέρονται από το αμερικανικό CDC (*United States Centers for Disease Control and Prevention*) ως “*Universal Pesticides (UPs)*” και είναι τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα γεωργικά φάρμακα. Έκθεση σε αυτά έχει συσχετιστεί με δυσλειτουργίες του αναπαραγωγικού συστήματος, μεταξύ αυτών χαμηλή ποιότητα σπέρματος και ενδομητρίωση. [19],[25]

Τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα με ομάδα P = O φωσφορυλιώνουν την υδροξυλομάδα μίας σερίνης στο ενεργό (εστερασικό) κέντρο της AChE, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η δράση της πάνω στο φυσιολογικό υπόστρωμά της. Σε αντιδιαστολή, όλες οι ενώσεις που περιέχουν θείο ενωμένο με φώσφορο χρειάζονται μεταβολική βιοενεργοποίηση, προκειμένου να εκδηλώσουν τη βιολογική τους δραστηριότητα, καθώς μόνο οι ενώσεις με ομάδα P = O είναι αποτελεσματικοί αναστολείς της AChE. Οι περισσότερες από τις πιο διαδεδομένες ενώσεις είναι οργανοθειοφωσφορικές, δηλαδή περιέχουν δεσμό P = S, όπως για παράδειγμα το *Malathion*, το *Parathion-methyl*, το *Chlorpyrifos* και το *Diazinon*. Πιστεύεται δε ότι η απαιτούμενη βιοενεργοποίηση μετριαάζει την οξεία τοξικότητα των ενώσεων αυτών. Κάποιες άλλες, μεταξύ αυτών και ο νευροπαραλυτικός παράγοντας *Sarin*, έχουν δεσμό P = O και δεν απαιτούν μεταβολική ενεργοποίηση, προκειμένου να ασκήσουν τη νευροτοξική τους δράση (π.χ. το *Metamidophos* και το *Dichlorvos*). [12],[26]

Μετά την είσοδό τους στον οργανισμό, οι οργανοθειοφωσφορικές ενώσεις μεταβολίζονται στα ηπατικά κυρίως κύτταρα από τα ισοένζυμα του *κυτοχρώματος P450*, μέσω δύο βασικών οδών βιομετατροπής, την ενεργοποίηση και την αποτοξικοποίηση. Η οξειδωτική αποθείωση (ενεργοποίηση) τους οδηγεί στον σχηματισμό ενός οξονίου (οξυγονωμένου αναλόγου του μητρικού εντομοκτόνου). Τα μεταβολικά αυτά (ενεργοποιημένα) ενδιάμεσα είναι εξαιρετικά τοξικά μόρια, υπεύθυνα για την παρεμπόδιση των εστερασών. Η αποτοξικοποίησή τους επιτυγχάνεται με ενζυμική υδρόλυσή τους από "Α-εστεράσες", των οποίων η ενζυμική δραστηριότητα δεν αναστέλλεται από τα οργανοφωσφορικά. Τα μητρικά οργανοθειοφωσφορικά μόρια μπορούν επίσης υπό τη δράση ισοενζύμων του *κυτοχρώματος P450* να αποτοξικοποιηθούν με οξειδωτική διάσπαση (*dearylation reaction*), σχηματίζοντας μη τοξικούς μεταβολίτες. Αυτές οι δύο βασικές βιομετατροπές των μητρικών οργανοθειοφωσφορικών μορίων, πιθανότατα σχετίζονται με ένα κοινό ενδιάμεσο. Η ισορροπία μεταξύ ενεργοποίησης και αποτοξικοποίησης καθορίζουν τον σχετικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Έτσι για παράδειγμα τα μητρικά οργανοθειοφωσφορικά εντομοκτόνα *Parathion-methyl*, *Chlorpyrifos* και *Diazinon* έχουν για τοξικούς μεταβολίτες τα μόρια *Paraoxon-methyl*, *Chlorpyrifos-oxon* και *Diazoxon* και ως μη τοξικούς τα μόρια *p-nitrophenol (PNP)*, *3,5,6-trichloro-2-pyridinol (TCP)* και *2-isopropyl-6-methyl-4-pyrimidinol (IMP)* αντίστοιχα. [12],[26],[29]

Η αναστολή της AChE από τα οργανοφωσφορικά προκαλεί συσσώρευση ακετυλοχολίνης στις χολινεργικές συνάψεις, με επακόλουθη υπερδιέγερση των μουσκαρινικών και νικοτινικών χολινεργικών υποδοχέων. Καθώς τέτοιοι υποδοχείς απαντούν στα περισσότερα από τα όργανα του σώματος, επέρχεται "χολινεργικό σύνδρομο" με έντονη εφίδρωση και σιελόρροια, έντονες βρογχικές εκκρίσεις, βρογχόσπασμο, μύση, αυξημένη γαστρεντερική κινητικότητα, διάρροια, τρόμο, λεπτούς μυϊκούς σπασμούς (τινάγματα) και διάφορες επιδράσεις στο κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), όπως ζάλη, λήθαργος, κόπωση, κεφαλαλγία, διανοητική σύγχυση, καταστολή αναπνευστικών κέντρων, σπασμοί, κώμα. Η αναπνευστική ανεπάρκεια είναι χαρακτηριστικό της σοβαρής δηλητηρίασης από οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα, αλλά η ήπια δηλητηρίαση και τα πρώτα στάδια μιας κατά τα άλλα σοβαρής δηλητηρίασης ενδέχεται να μην παρουσιάζουν σαφή σημεία και

συμπτώματα. Η ατροπίνη είναι ανταγωνιστής των μουσκαρινικών υποδοχέων και εμποδίζει τη δράση της συσσωρευμένης ακετυλοχολίνης στους υποδοχείς αυτούς. Χορηγείται κατά προτίμηση ενδοφλεβίως, προκειμένου να προληφθούν τα σημεία υπερβολικής χολινεργικής διέγερσης. [12],[15]



Σχήμα 1.2: Οι δομές 5 βασικών οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων, επάνω Parathion-methyl (αριστερά), Chlorpyrifos (κέντρο) & Diazinon (δεξιά) και κάτω (S)-Malathion (αριστερά), Dichlorvos (κέντρο) & του (S)-Sarin (δεξιά). [30]

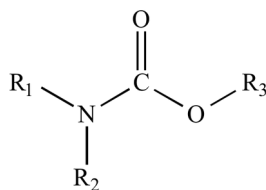
Αναφορικά με τη μακροχρόνια τοξικότητα των οργανοφωσφορικών δεν υπάρχει ακόμα ομοφωνία. Δεν αποκλείεται τα χαμηλά επίπεδα έκθεσης σε δόσεις που δεν προκαλούν σημεία παρασυμπαθητικής διέγερσης, να μπορούν να οδηγήσουν σε μακροχρόνιες δυσμενείς επιδράσεις στην υγεία, ιδίως στο κεντρικό και στο περιφερικό νευρικό σύστημα. [12],[15] Το 2015 ο IARC ταξινόμησε το Malathion και το Diazinon στην κατηγορία 2A, “πιθανά καρκινογόνο για τον άνθρωπο” (“The agent is probably carcinogenic to humans”) και το Parathion-methyl στην κατηγορία 2B, “δυσνητικά καρκινογόνο για τον άνθρωπο” (“The agent is possibly carcinogenic to humans”). [31]

Στο ανθρώπινο σώμα τα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα υδrolύονται παράγοντας έξι διαλκυλο - φωσφορικούς μεταβολίτες (*dialkyl phosphate metabolites, DAPs*), οι οποίοι απεκκρίνονται στα ούρα. Ωστόσο ο *in vivo* μεταβολισμός των οργανοφωσφορικών παράγει διαφορετικούς διαλκυλο - φωσφορικούς μεταβολίτες, ανάλογα με το αν λαμβάνει χώρα βιοενεργοποίηση ή αποτοξικοποίηση. Η ανίχνευσή τους στα ούρα δεν παρέχει εξειδίκευση ως προς το οργανοφωσφορικό μόριο από το οποίο προήλθαν ή την τοξικολογική τους δραστηριότητα. Έτσι, αυτοί οι έξι διεστέρες χρησιμεύουν ως μη ειδικοί βιοδείκτες εσωτερικής δόσης για όλα τα οργανοφωσφορικά που χρησιμοποιούνται παγκοσμίως. Η προσέγγιση αυτή χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1969. Αργότερα, με την ανάπτυξη και εξέλιξη της ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης προέκυψαν βιοδείκτες που μετρούν την εσωτερική δόση σε συγκεκριμένα οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα. Παραδείγματα αποτελούν η PNP και η TCP, που είναι οι μη τοξικοί μεταβολίτες των

Parathion(-ethyl) & Parathion-methyl και των *Chlorpyrifos(-ethyl) & Chlorpyrifos-methyl* αντίστοιχα. [8],[28],[29],[32],[33]

1.6.5.2 Καρβαμιδικές ενώσεις

Τα καρβαμιδικά εντομοκτόνα παράγονται από το καρβαμικό/καρβαμικό οξύ (NH₂COOH) και είναι κυρίως N-μεθυλοκαρβαμιδικές ενώσεις. Η γενική δομή τους αναπαριστάται με τον γενικό συντακτικό τύπο που φαίνεται παρακάτω (βλ. σχήμα 1.3). Οι ομάδες R₁, R₂ και R₃ είναι συνήθως αρωματικές ή/και αλειφατικές ομάδες. Τα καρβαμιδικά μυκητοκτόνα περιέχουν μία βενζιμιδαζολική ομάδα (π.χ. *Carbendazim*). [12], [32]



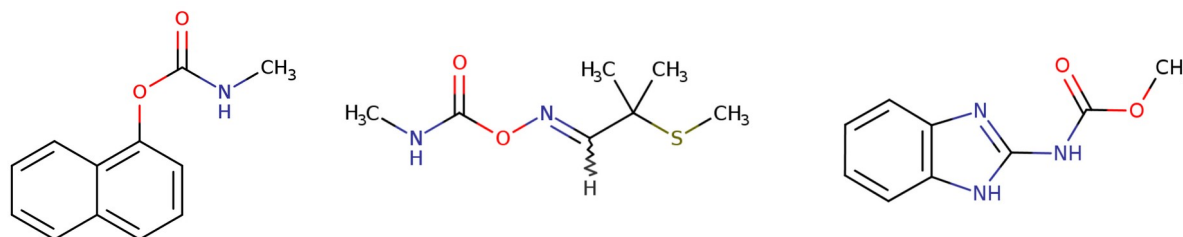
Σχήμα 1.3: Γενική δομή καρβαμιδικών εντομοκτόνων [35]

Η οξεία τοξικότητα των καρβαμιδικών εντομοκτόνων από του στόματος κυμαίνεται από μέτρια-χαμηλή (π.χ. *Carbaryl*), έως εξαιρετικά υψηλή (π.χ. *Aldicarb*). Η διείσδυσή τους στο δέρμα αυξάνεται μέσω των οργανικών διαλυτών και των γαλακτοματοποιητών που περιλαμβάνονται στα περισσότερα σκευάσματα. Μέσα στον οργανισμό υφίστανται διάφορες ενζυμικές αντιδράσεις βιομετατροπής, με κυριότερα μονοπάτια αυτά της οξειδωσης και της υδρόλυσης. Ο μηχανισμός τοξικότητας των καρβαμιδικών ενώσεων είναι η αναστολή της *AChE* και αναστρέφεται γρήγορα μετά την έκθεση. [12]

Τα σημάδια και τα συμπτώματα της δηλητηρίασης από καρβαμιδικές ενώσεις είναι μεταξύ άλλων μύση, διούρηση, διάρροια, σιελόρροια, μυϊκές δεσμιδώσεις και επιδράσεις στο ΚΝΣ, όπως ζάλη, λήθαργος, κόπωση, κεφαλαλγία, διανοητική σύγχυση, καταστολή αναπνευστικών κέντρων, σπασμοί, κώμα. Η οξεία δηλητηρίαση από καρβαμιδικά εντομοκτόνα κατά κανόνα υποχωρεί μετά από μερικές ώρες. Η αντιμετώπιση της δηλητηρίασης βασίζεται και εδώ στη χρήση ατροπίνης (βλ. §1.6.5.1). [12]

Η δράση των καρβαμιδικών ως μυκητοκτόνα έγκειται στην ικανότητά τους να δρουν ως αναστολείς σχηματισμού της μιτωτικής ατράκτου, παρεμποδίζοντας τον σχηματισμό των μικροσωληνίσκων που την συνθέτουν, οπότε και τον κανονικό αποχωρισμό των αδελφών χρωματίδων κατά την κυτταρική διαίρεση. Οι μικροσωληνίσκοι αποτελούν ένα πολυμερές της πρωτεΐνης *τουμπουλίνη* (*σωληνίνη*), ενός διμερούς αποτελούμενο από δύο υπομονάδες, την *α-* και *β-τουμπουλίνη*. Βενζιμιδαζολικές ενώσεις, όπως το *Carbendazim*, συνδέονται με την *β-τουμπουλίνη*, καθιστώντας αδύνατο τον σχηματισμό της *τουμπουλίνης*, των

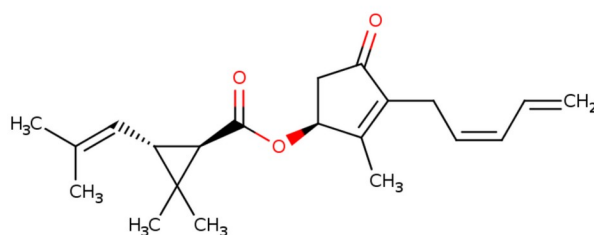
μικροσωληνίσκων και τελικά της μιτωτικής ατράκτου με συνέπεια ο μύκητας να μην αναπτύσσεται. [32], [36]



Σχήμα 1.4: Οι δομές τριών βασικών καρβαμιδικών εντομοκτόνων, *Carbaryl* (αριστερά), *Aldicarb* (κέντρο) & *Carbendazim* (δεξιά). [30]

1.6.5.3 Πυρεθροειδή

Σκευάσματα πυρεθρίνης για εντομοκτόνο χρήση παρήχθησαν αρχικά από εκχυλίσματα των ανθών του *Chrysanthemum cinerariaefolium*, η εντομοκτόνος δράση του οποίου οφείλεται στις περιεχόμενες πυρεθρίνες και ήταν ήδη γνωστή στην αρχαία Κίνα και την Περσία. Επειδή οι φυσικές πυρεθρίνες αποσυντίθενται γρήγορα, όταν εκτεθούν στο φως, αναπτύχθηκαν συνθετικά πυρεθροειδή ανάλογα. Λόγω δε της ισχυρής εντομοκτόνου δράσης τους, της σχετικά χαμηλής τοξικότητας για τα θηλαστικά, της μηδενικής ανθεκτικότητάς τους στο περιβάλλον και της χαμηλής τάσης ανάπτυξης αντοχής από τα έντομα, τα πυρεθροειδή αποτελούν σήμερα πάνω από το 25% της παγκόσμιας αγοράς εντομοκτόνων. Τα πυρεθροειδή χρησιμοποιούνται ευρέως ως εντομοκτόνα τόσο σε κατοικίες, όσο και στη γεωργία, αλλά και στην ιατρική για την τοπική θεραπεία ψωρίασης και φθειρίασης, καθώς και στις τροπικές χώρες σε υγραμένες κουνουπιέρες, ώστε να αποφεύγονται τα τσιμπήματα κουνουπιών. Με βάση τα σημάδια τοξικότητας στους αρουραίους, τα πυρεθροειδή διακρίνονται σε δύο τύπους (I & II). [12],[15]



Σχήμα 1.5: Ο συντακτικός τύπος της πυρεθρίνης I [30]

Τα πυρεθροειδή τροποποιούν τη φυσιολογική λειτουργία των νεύρων των εντόμων, μεταβάλλοντας την κινητική των τασεοευαίσθητων διαύλων νατρίου, οι οποίοι επιτελούν

την παροδική αύξηση της διαπερατότητας της νευρωνικής μεμβράνης στο νάτριο, στην οποία βασίζεται το νευρωνικό δυναμικό ενέργειας (νευρική ώση). Μετά την απορρόφησή τους, τα πυρεθροειδή μεταβολίζονται γρήγορα μέσω δύο βασικών οδών βιομετατροπής, της υδρόλυσης του εστερικού δεσμού, που καταλύεται από καρβοξυλεστεράσες του ήπατος και του πλάσματος και της οξείδωσης της αλκοολικής ομάδας από τα ισοένζυμα του *κυτοχρώματος P450*, ακολουθούμενες από περαιτέρω οξείδωση, υδρόλυση και σύζευξη με θειικές ομάδες ή γλυκουρονίδιο κατά τη *Φάση II* του μεταβολισμού. [12],[15]

Σε περιπτώσεις επαγγελματικής έκθεσης η κυριότερη δυσμενής επίδραση μετά από επαφή πυρεθροειδών με το δέρμα είναι η παραισθησία. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν συνεχείς νυγμούς ή αίσθημα καύσου σε σοβαρότερες περιπτώσεις. Η κατάσταση υποχωρεί μετά από 24 ώρες περίπου, ενώ η τοπική εφαρμογή *βιταμίνης E* έχει αποδειχθεί αποτελεσματική στη θεραπεία. Η παραισθησία οφείλεται πιθανότατα στην ανώμαλη επαναλαμβανόμενη δραστηριότητα των νευρικών απολήξεων του δέρματος, λόγω του πυρεθροειδούς. Μελέτες χρόνιας τοξικότητας έχουν δείξει, ότι σε υψηλές δοσολογίες τα πυρεθροειδή προκαλούν ελαφρά διόγκωση του ήπατος, η οποία συχνά συνοδεύεται από κάποιες ιστοπαθολογικές μεταβολές. Δεν υπάρχουν πολλά στοιχεία που να δείχνουν τερατογόνο ή μεταλλαξιγόνο δράση.

Τα πυρεθροειδή είναι πιο μοντέρνα εντομοκτόνα και πιο νευροτοξικά για τα έντομα και λιγότερο νευροτοξικά για τον άνθρωπο σε σχέση με τα οργανοφωσφορικά. Αυτό οδήγησε στην ανάγκη εφαρμογής μικρότερων ποσοτήτων και ακολούθως σε χαμηλότερη έκθεση του γενικού πληθυσμού. Τα σημαντικότερα πυρεθροειδή, *Permethrin*, *Cyfluthrin*, *Cypermethrin* και *Deltamethrin* υδρολύονται αμέσως στον ανθρώπινο οργανισμό. Οι μεταβολίτες *3-PBA*, *DCCA*, *F-PBA* και *DBCA*, οι οποίοι απεκκρίνονται στα ούρα χρησιμοποιούνται συχνά ως βιοδείκτες έκθεσης στην ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση. [8]

1.6.5.4 Οργανοχλωριούχες ενώσεις

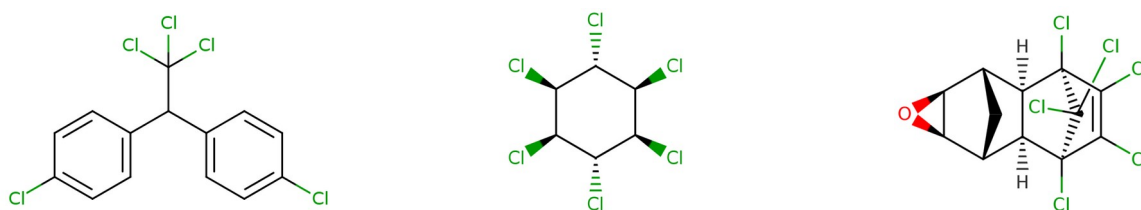
Πολλές οργανοχλωριούχες ενώσεις (*organochlorine compounds*), οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν ως γεωργικά φάρμακα, σήμερα είναι περιορισμένες σε χρήση ή απαγορευμένες στις δυτικές βιομηχανικές χώρες. Γενικά, οι οργανοχλωριούχες ενώσεις απελευθερώνονται στο περιβάλλον, είτε κατά την παραγωγή, είτε κατά την απευθείας εφαρμογή τους. Η απόρριψη ρυπασμένων αποβλήτων σε χώρους υγειονομικής ταφής, οι αποτεφρωτήρες, οι σταθμοί παραγωγής ενέργειας ή άλλες διεργασίες καύσης παρουσία χλωρίου αποτελούν περαιτέρω πηγές εκπομπής. Τα μόρια αυτά δεν αποικοδομούνται στους οργανισμούς των θηλαστικών και κατά συνέπεια συσσωρεύονται στην τροφική αλυσίδα. Λόγω των λιπόφιλων ιδιοτήτων τους, λαμβάνονται κυρίως από λιπαρές τροφές. Το μητρικό γάλα αποτελεί την κύρια πηγή έκθεσης των βρεφών σε οργανοχλωριούχες ενώσεις. [8]

Στα οργανοχλωριούχα εντομοκτόνα (*organochlorine insecticides*) περιλαμβάνονται τα χλωριωμένα παράγωγα αιθανίου, όπως το *DDT* (*Dichlorodiphenyltrichloroethane*) και τα ανάλογά του, τα κυκλοδιένια, όπως τα *Chlordane* (μεταβολίζεται ταχέως προς *Dieldrin*),

Dieldrin, Heptachlor, Endrin και *Toxaphene* τα εξαχλωροκυκλοεξάνια, όπως το *Lindane*, χλωροφαινόλες, όπως η πενταχλωροφαινόλη (*Pentachlorophenol, PCP*) και οι δομές εγκλωβισμού, όπως τα *Mirex* και *Chlorodecone*. [12]

Η οξεία τοξικότητά τους είναι μέτρια (χαμηλότερη αυτής των οργανοφωσφορικών), αλλά η χρόνια έκθεση μπορεί να συνδέεται με δυσμενείς επιδράσεις για την υγεία, ιδίως στο ήπαρ και με ενδοκρινική διαταραχή στο αναπαραγωγικό σύστημα. Υπάρχουν περιοχές του πλανήτη, όπου ακόμα και σήμερα χρησιμοποιούνται ορισμένα από αυτά για τον έλεγχο εντόμων, όπως για παράδειγμα το *DDT*, το οποίο είναι αποτελεσματικό έναντι μίας μεγάλης ποικιλίας οργανισμών επιβλαβών για τη γεωργία, αλλά και ενάντια σε έντομα που μεταδίδουν μερικές από τις σοβαρότερες ασθένειες του κόσμου, όπως είναι ο τύφος, η ελονοσία (*malaria*) και ο κίτρινος πυρετός. [8],[12]

Το *DDT* έχει μέτρια οξεία τοξικότητα από του στόματος, ενώ η δερματική απορρόφησή του είναι πολύ περιορισμένη. Αφότου απορροφηθεί η ένωση κατανέμεται σε όλους τους ιστούς, με την υψηλότερη συγκέντρωση να εντοπίζεται στον λιπώδη ιστό. Απεκκρίνεται μέσω τη χολής, των ούρων και του γάλακτος. Ένας σημαντικός στόχος της χρόνιας έκθεσης στο *DDT* είναι το ήπαρ. Το *DDT* και το *DDE* (προϊόν της διάσπασής του) αυξάνουν το βάρος του ήπατος και προκαλούν υπερτροφία και νέκρωση των ηπατικών κυττάρων, ενώ αποτελούν ισχυρούς επαγωγείς των ισοενζύμων του *κυτοχρώματος P450*, ιδίως των *CYP2B* και *CYP3A*. Τόσο στα έντομα, όσο και στα θηλαστικά το *DDT* επιδρά στους διαύλους νατρίου της μεμβράνης του νευροάξονα. Στα έντομα η οξεία έκθεση σε υψηλές δόσεις *DDT* προκαλεί μεταξύ άλλων κινητική ανησυχία, ενώ ο θάνατος επέρχεται λόγω αναπνευστικής ανεπάρκειας. Στον άνθρωπο, τα πρώτα συμπτώματα δηλητηρίασης από *DDT* είναι η υπεραισθησία του στόματος και του κάτω μέρους του προσώπου, ακολουθούμενη από παραισθησία της ίδιας περιοχής και της γλώσσας. Ακολουθούν ζάλη, τρόμος των άκρων, σύγχυση και εμετός. Σπασμοί εκδηλώνονται μόνο σε περίπτωση σοβαρής δηλητηρίασης. [12]



Σχήμα 1.6: Οι δομές τριών βασικών οργανοχλωριούχων εντομοκτόνων, *DDT* (αριστερά), *Lindane* (κέντρο) & *Aldrin* (δεξιά) [30]

Τα εξαχλωροκυκλοεξάνια και τα κυκλοδιένια περιλαμβάνουν μεγάλο αριθμό ενώσεων με παρόμοιο μηχανισμό νευροτοξικής δράσης. Το *Lindane* είναι το γ' ισομερές του 1,2,3,4,5,6-εξαχλωροκυκλοεξανίου (*gamma-hexachlorocyclohexane, γ-HCH*), που συχνά συναντάται εσφαλμένα και ως εξαχλωροβενζόλιο (*benzene hexachloride, BHC*), πιθανότατα επειδή παράγεται από το βενζόλιο με αντίδρασή του με χλώριο παρουσία ηλιακού φωτός και

καταλυτών, απουσία οξυγόνου. Το *Lindane* και τα κυκλοδιένια έχουν μέτρια προς υψηλή οξεία τοξικότητα από του στόματος, ενώ εν αντιθέσει με το *DDT*, οι ενώσεις αυτές απορροφώνται γρήγορα μέσω του δέρματος. Ο κύριος στόχος της τοξικότητάς τους είναι το ΚΝΣ, όπου σε αντιδιαστολή με το *DDT* δεν υπάρχει ουσιαστικά τρόμος και βασικό στοιχείο της δηλητηρίασης είναι οι σπασμοί. Το *Lindane* και τα κυκλοδιένια δεσμεύονται στη θέση δέσμευσης πικροτοξίνης στον κυτταρικό διαμεμβρανικό διάυλο χλωρίου, εμποδίζοντας έτσι το άνοιγμά του και ανταγωνιζόμενα την ανασταλτική δράση του νευροδιαβιβαστή *GABA* (*gamma-Aminobutyric acid*, γ-αμινοβοουτυρικό οξύ), ο οποίος είναι ο κύριος ανασταλτικός νευροδιαβιβαστής στο αναπτυξιακά ώριμο ΚΝΣ των θηλαστικών. Ο κύριος ρόλος του είναι η μείωση της νευρωνικής διέγερσης στο νευρικό σύστημα. Η θεραπεία της οξείας δηλητηρίασης είναι συμπτωματική. Η φαινοβαρβιτάλη και η διαζεπάμη μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως αντισπασμωδικά. [12]

Οι χλωροφαινόλες είναι μόρια τα οποία μπορούν να προκύψουν από τον μεταβολισμό μιας μεγάλης ποικιλίας οργανοχλωριούχων ενώσεων, όπως τα εξαχλωροκυκλοεξάνια, τα χλωροβενζόλια, το χλωροφαινοξυανθρακικό οξύ και ζιζανιοκτόνα. Οι απεκκρινόμενες χλωροφαινόλες μέσω των ούρων φαίνεται να αποτελούν καλούς βιοδείκτες έμμεσης έκθεσης του γενικού πληθυσμού σε διάφορες οργανοχλωριούχες ενώσεις από όλες τις δυνατές πηγές έκθεσης. Επίσης, η 2-φαινυλοφαινόλη/ορθο-φαινυλοφαινόλη (*2-/o-Phenylphenol*, *OPP*), καθώς και το άλας της με νάτριο χρησιμοποιούνται στη γεωργία σαν αντιμικροβιακά γεωργικά φάρμακα. Το μετά νατρίου άλας της θεωρείται καρκινογόνο. Τέλος, η 2-φαινυλοφαινόλη μπορεί να ανιχνευθεί σε δείγματα ούρων. [8]

1.6.5.5 Νεονικοτινοειδή

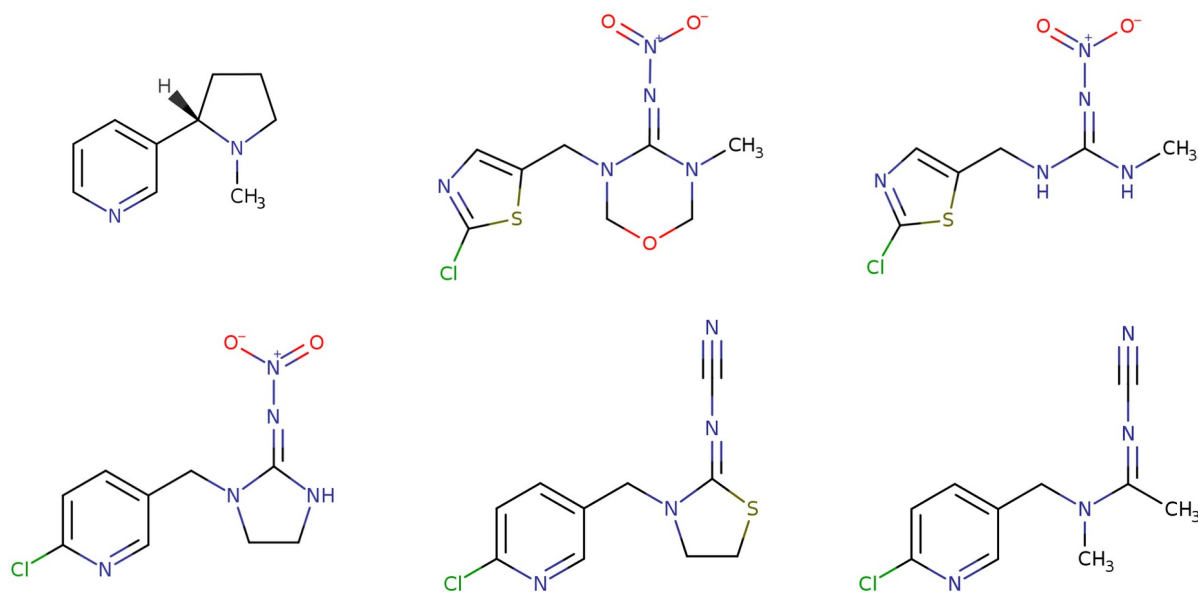
Τα νεονικοτινοειδή (*Neonicotinoids/neonics*, "new nicotine-like insecticides", *NNIs*) είναι δραστικές ουσίες, χημικά παρόμοιες με τη νικοτίνη και βρίσκουν κύρια εφαρμογή ως εντομοκτόνα. Είναι επίσης κοινά σε κτηνιατρικές εφαρμογές όπως ο έλεγχος των τσιμπουριών και τα κολάρα ψύλλων για κατοικίδια ζώα. Τα νεονικοτινοειδή καταλαμβάνουν περισσότερο από το 25% της παγκόσμιας αγοράς εντομοκτόνων. Πρόκειται για διασυστημικά εντομοκτόνα που είναι πολύ πιο τοξικά για τα ασπόνδυλα, όπως τα έντομα, απ' ό,τι για τα θηλαστικά, τα πτηνά και άλλους ανώτερους οργανισμούς. [19],[37]

Τα νεονικοτινοειδή έχουν παρόμοιο μηχανισμό δράσης με αυτόν της νικοτίνης. Η νικοτίνη είναι ένα φυσικό χειρόμορφο αλκαλοειδές (απαντά σε δύο εναντιομερείς μορφές, την *S-νικοτίνη* και την *R-νικοτίνη*) που συναντάται στα φύλλα του καπνού και σε άλλα μέλη της εδώδιμης οικογένειας των σολανιδών ή στρυχνοειδών (*solanaceae*). Έχει χρησιμοποιηθεί και η ίδια ως εντομοκτόνο. Μόνο η *S* μορφή της εμφανίζει βιολογική δράση. Δρα ως αγωνιστής των νικοτινικών υποδοχέων της ακετυλοχολίνης (*nicotinic acetylcholine receptors*, *nAChRs*) του εγκεφάλου, αλλά όχι των μυών.⁴ Έχει υψηλή οξεία τοξικότητα και τα

⁴ Εάν οι *nAChRs* των νευρομυϊκών συνάψεων ήταν τόσο ευαίσθητοι στη νικοτίνη, όσο και οι αντίστοιχοι υποδοχείς των νευρικών συνάψεων του εγκεφάλου, τότε το κάπνισμα θα προκαλούσε μη ανεκτές και ίσως θανατηφόρες μυϊκές συσπάσεις. Παρά τις εκτεταμένες φαρμακολογικές, λειτουργικές και δομικές

συμπτώματα δηλητηρίασης ανάλογα με τη δόση είναι ναυτία, εμετός, μυϊκή αδυναμία, επιδράσεις στο αναπνευστικό σύστημα κεφαλαλγία, λήθαργος και ταχυκαρδία. Και τα νεονικοτινοειδή δρουν ως αγωνιστές των *nAChRs* του ΚΝΣ. Επίσης, έκθεση σε νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα έχει συσχετιστεί με δυσμενείς αναπτυξιακές και νευρολογικές επιδράσεις (π.χ. συγγενείς καρδιακές ανωμαλίες και διαταραχές αυτιστικού φάσματος). Τα νεονικοτινοειδή επηρεάζουν το ΚΝΣ των εντόμων, οδηγώντας τελικά σε παράλυση και θάνατο. Είναι ιδιαίτερα τοξικά για ωφέλημα έντομα, όπως οι μέλισσες. Η τοξικότητα φαίνεται να είναι πιο υψηλή σε μόρια που περιέχουν νιτροομάδα και χαμηλότερη σε αυτά που περιέχουν κυανομάδα (βλ. σχήμα 1.7). [12],[15],[19],[37],[39],[40],[41]

Το 2013 πέντε νεονικοτινοειδή εντομοκτόνα εγκρίθηκαν ως δραστικές ουσίες στην *Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ)*, για χρήση σε προϊόντα φυτοπροστατευτικών σκευασμάτων. Επρόκειτο για τα *Thiamethoxam*, *Clothianidin* (μεταβολίτης του *Thiamethoxam*), *Imidacloprid*, *Thiacloprid* και *Acetamiprid*. Ωστόσο για τα δύο πρώτα και τα δύο επόμενα η έγκριση κυκλοφορίας τους στην *ΕΕ* διεκόπη το 2019 και 2020 αντίστοιχα. Μόνο το *Acetamiprid* εξακολουθεί να είναι εγκεκριμένο στην *ΕΕ* μέχρι και το τέλος Φεβρουαρίου του 2033. Ο ΠΟΥ έχει ταξινομήσει και τα πέντε αυτά μόρια ως κατηγορίας II βάσει του βαθμού εγγενούς κινδύνου τους (βλ. πίνακα 1.1), ενώ κανένα τους δεν συμπεριλαμβάνεται στην κατάταξη καρκινογονικότητας του *IARC*. [21],[37],[42]



Σχήμα 1.7 Οι δομές της (S)-νικοτίνης (επάνω αριστερά) & 5 βασικών νεονικοτινοειδών εντομοκτόνων. Επάνω *Thiamethoxam* (κέντρο) & *Clothianidin* (δεξιά) και κάτω *Imidacloprid* (αριστερά), *Thiacloprid* (κέντρο) & *Acetamiprid* (δεξιά). [30]

μελέτες των *nAChRs*, η βάση για τη διαφορετική αυτή δράση της νικοτίνης δεν έχει προσδιοριστεί. [38]

Μελέτες έχουν δείξει ότι τα νεονικοτινοειδή έχουν μεγαλύτερο βιολογικό χρόνο ημίσειας ζωής στο περιβάλλον απ' ό,τι αρχικά είχε θεωρηθεί. Αυτό συμβαίνει επειδή μόλις εφαρμοστούν, μπορούν να παραμείνουν στο νερό ή στο έδαφος για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να διασπαστούν. Βάσει άλλων μελετών, ο βιολογικός χρόνος ημίσειας ζωής του *Clothianidin* και του *Imidacloprid* στο έδαφος ήταν μερικοί μήνες και δύο έως τρία χρόνια, αντίστοιχα. [39]

1.6.6 Ζιζανιοκτόνα

Τα ζιζανιοκτόνα είναι χημικές ουσίες, που μπορούν να καταστρέψουν ή να βλάψουν σοβαρά ορισμένα φυτά. Κατηγοριοποιούνται με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα ανάλογα με τον μηχανισμό δράσης τους (βλ. πίνακα 1.3), τον χρόνο ή τον τρόπο εφαρμογής τους και την επιλεκτικότητά τους. Αρκετά από αυτά προκαλούν ερεθισμό του δέρματος και δερματίτιδα εξ επαφής, ιδίως σε άτομα με προδιάθεση σε αλλεργικές αντιδράσεις. Άλλα έχουν αποτελέσει αντικείμενο διαμάχης λόγω πιθανολογούμενης καρκινογονικότητας ή νευροτοξικότητας. [12]

Πίνακας 1.3: Ορισμένοι μηχανισμοί δράσης των ζιζανιοκτόνων [12],[15]

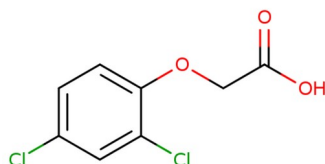
Μηχανισμός	Χημική κατηγορία (παραδείγματα)
Αναστολή φωτοσύνθεσης	Τριαζίνες (<i>Atrazine</i>), υποκατεστημένα παράγωγα ουρίας (<i>Diuron</i>), σουρακίλες (<i>Bromacil</i>)
Αναστολή αναπνοής	Δινιτροφαινόλες
Ρυθμιστές ανάπτυξης τύπου αυξίνης	Φαινοξυοξέα (<i>2,4-D</i>), βενζοϊκά οξέα (<i>Dicamba</i>), πυριδινικά οξέα (<i>Picloram</i>)
Αναστολή πρωτεϊνοσύνθεσης	Δινιτροανιλίνες
Αναστολή σύνθεσης λιπιδίων	Αρυλοξυφαινοξυπροπυονικά οξέα (<i>Diclofop</i>)
Αναστολή συγκεκριμένων ενζύμων: <ul style="list-style-type: none"> • συνθετάση της γλουταμίνης • EPSPS (βλ. §1.6.6.5) • συνθάση του ακετολακτικού οξέος 	<ul style="list-style-type: none"> • Glufosinate • Glyphosate • Σουλφονουλουρίες
Απορρυθμιστές κυτταρικής μεμβράνης	Διπυριδυλικά παράγωγα (<i>Paraquat</i>)

1.6.6.1 Χλωροφαινοξικές ενώσεις

Τα χλωροφαινοξικά ζιζανιοκτόνα είναι χημικά ανάλογα της αυξίνης, μίας φυτικής αυξητικής ορμόνης, και προκαλούν ανεξέλεγκτη και καταστροφική ανάπτυξη στα φυτά στόχους. Επειδή η αυξίνη είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη πολλών πλατύφυλλων φυτών, αλλά δεν υπάρχει στα αγρωστώδη, οι χλωροφαινοξικές ενώσεις μπορούν να

καταστρίλουν την ανάπτυξη των ζιζανίων (π.χ. πικραλίδες), χωρίς να προκαλέσουν βλάβη στα αγρωστώδη. Η πιο κοινή ένωση αυτής της κατηγορίας είναι το 2,4-διχλωροφαινοξυακτικό οξύ (*2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 2,4-D*). [12]

Η κατάποση του 2,4-D έχει προκαλέσει οξεία δηλητηρίαση στον άνθρωπο με εμετό, έγκανμα του στόματος, κοιλιακό πόνο, υπόταση, μυτονια και προσβολή του ΚΝΣ, περιλαμβανομένου και του κόματος. Η δερματική έκθεση είναι η κυριότερη οδός ακούσιας έκθεσης του ανθρώπου σε 2,4-D. [12]



Σχήμα 1.8: Η δομή του 2,4-D [30]

Έχουν αναφερθεί πολλά περιστατικά, τα οποία δείχνουν συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης σε 2,4-D και της εκδήλωσης νευρολογικών επιδράσεων, όπως περιφερική νευροπάθεια, απομυελίνωση και εκφυλισμός των γαγγλίων του ΚΝΣ, μειωμένη ταχύτητα αγωγής του νευρικού ερεθίσματος, μυτονια και μεταβολές συμπεριφοράς. Τα χλωροφαινοξικά ζιζανιοκτόνα έχουν προσελκύσει αρκετή προσοχή, καθώς μερικές επιδημιολογικές μελέτες έχουν δείξει συσχέτιση μεταξύ της έκθεσης και της εμφάνισης λεμφώματος *non-Hodgkin* ή σαρκώματος μαλακών ιστών. Παρ' όλα αυτά, ο IARC ταξινομεί το 2,4-D στην κατηγορία 2B, "δυσνητικά καρκινογόνο για τον άνθρωπο" ("The agent is possibly carcinogenic to humans"). [12],[32],[43]

1.6.6.2 Διπυριδολικές ενώσεις

Οι διπυριδολικές ενώσεις αποτελούν εμπορικά διαθέσιμα ζιζανιοκτόνα, με πιο γνωστά το *Paraquat* και το *Diquat*.



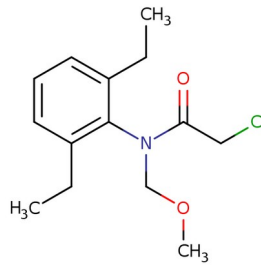
Σχήμα 1.9: Οι δομές δύο διπυριδολικών ενώσεων, *Diquat* (αριστερά) & *Paraquat* (δεξιά). [30]

Το *Paraquat* είναι ένα μη επιλεκτικό ζιζανιοκτόνο επαφής ταχείας δράσης, που χρησιμοποιείται για την καταπολέμηση των πλατύφυλλων ζιζανίων και των αγρωστωδών σε φυτείες και οπωρώνες, καθώς και για τη γενική καταπολέμηση των ζιζανίων. Αποτελεί ένα από τα ζιζανιοκτόνα με την υψηλότερη οξεία τοξικότητα. Μετά την απορρόφησή του, ανεξάρτητα από την οδό έκθεσης, συσσωρεύεται στους πνεύμονες και τους νεφρούς. Μεταβολίζεται με πολύ χαμηλό ρυθμό και απεκκρίνεται σχεδόν αμετάβλητο με τα ούρα. Έχει ελάχιστη, έως καμία γονιδοτοξικότητα, δεν είναι καρκινογόνο στα τρωκτικά, δεν επιδρά στη γονιμότητα, δεν είναι τερατογόνο και προκαλεί εμβρυοτοξικότητα μόνο σε δόσεις τοξικές για τη μητέρα. Οι κυριότερες ανησυχίες σχετικά με την τοξικότητα του *Paraquat* αφορούν στις οξείες συστηματικές επιδράσεις του, ιδίως στους πνεύμονες και δευτερευόντως στους νεφρούς. [12]

Το *Diquat* παρουσιάζει διαφορετικό τοξικολογικό προφίλ, με οξεία τοξικότητα ελαφρώς χαμηλότερη. Σε αντίθεση με το *Paraquat*, δεν συσσωρεύεται στους πνεύμονες και δεν παρατηρείται οξεία τοξικότητα μετά από οξεία ή χρόνια έκθεση. Τα όργανα στόχοι της χρόνιας έκθεσης είναι η γαστρεντερική οδός, οι νεφροί και κυρίως οι οφθαλμοί. Όπως το *Paraquat*, έτσι και το *Diquat* εισερχόμενο στο κύτταρο μπορεί να αναχθεί (οξειδώνοντας ένα μόριο *NADPH* προς *NADP⁺*), ώστε να σχηματιστεί μία ελεύθερη ρίζα και κατόπιν παρουσία οξυγόνου να επανοξειδωθεί, με επακόλουθο σχηματισμό μίας ρίζας σουπεροξειδίου ($O_2^{\cdot-}$). Αυτή η διαδικασία κυκλικής οξειδοαναγωγής πραγματοποιείται στον οφθαλμό και πιστεύεται ότι αποτελεί το μηχανισμό πρόκλησης του καταρράκτη. Τα κλινικά συμπτώματα στον άνθρωπο περιλαμβάνουν ναυτία, εμετό, διάρροια, στοματικά και εισοφαγικά έλκη, έκπτωση της νεφρικής λειτουργίας και νευρολογικές επιδράσεις, αλλά όχι πνευμονική ίνωση. [12]

1.6.6.3 Χλωροακετανιλίδια

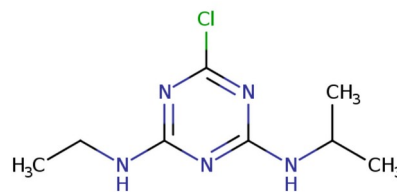
Αντιπροσωπευτικές ενώσεις αυτής της κατηγορίας ζιζανιοκτόνων είναι το *Alachlor*, το *Acetochlor* και το *Metolachlor*, τα οποία χρησιμοποιούνται για την καταπολέμηση των βοτάνων και των πλατύφυλλων ζιζανίων σε διάφορες καλλιέργειες (αραβόσιτος, σόγια, φιστίκι). Το *Alachlor*, το *Acetochlor* και το *Butachlor* είναι πιθανότατα καρκινογόνα για τον άνθρωπο. Η ανακάλυψη ποσοτήτων *Alachlor* στο νερό πηγαδιών οδήγησε στην απαγόρευση κυκλοφορίας σε κάποιες χώρες και σε επιβολή περιορισμών σε άλλες. [12]



Σχήμα 1.10: Η δομή του Alachlor. [30]

1.6.6.4 Τριαζίνες

Οι τριαζίνες αποτελούν μία ομάδα αζωτούχων αρωματικών ετεροκυκλικών ενώσεων με τον μητρικό μοριακό τύπο $C_6H_3N_3$. Μπορούν να εμφανιστούν σε τρεις συντακτικά ισομερείς μορφές, με τις 1,3,5-τριαζίνες να είναι οι πιο συνηθισμένες. Με υποκατάσταση των ατόμων υδρογόνου με άλλες ομάδες, προκύπτει μία μεγάλη σειρά μορίων. Η οικογένεια των τριαζινικών ζιζανιοκτόνων περιλαμβάνει αρκετές ενώσεις, όπως το *Atrazine* το *Simazine* και το *Propazine*, οι οποίες χρησιμοποιούνται εκτενώς για την προφυτρωτική καταπολέμηση των πλατύφυλλων ζιζανίων. Οι τριαζίνες έχουν χαμηλή οξεία τοξικότητα από του στόματος και μέσω του δέρματος, ενώ οι μελέτες χρόνιας τοξικότητας δείχνουν κυρίως μειωμένο ρυθμό αύξησης του σωματικού βάρους. Δεν υπάρχουν στοιχεία που να φανερώνουν τερατογόνο ή γονιδοτοξική δράση, καθώς και αναπτυξιακή και αναπαραγωγική τοξικότητα, ενώ είναι πιθανό να έχουν κλαστογόνο δράση. Η έκθεση σε *Atrazine* μέσω των καταλοίπων στα τρόφιμα είναι πολύ χαμηλή, αλλά συχνά διαπιστώνεται ρύπανση των υπόγειων υδάτων και του πόσιμου νερού. Οι γνωστές ορμονικές δράσεις των τριαζινών επιβάλλουν την προσεκτική παρακολούθηση και αξιολόγηση της δράσης αυτής της ομάδας ζιζανιοκτόνων ως ενδοκρινικών διαταρακτών. [12]



Σχήμα 1.11: Η δομή του Atrazine. [30]

1.6.6.5 Φωσφονομεθυλαμινοξέα

Οι δύο ενώσεις της κατηγορίας αυτής είναι το *Glyphosate* (*N-phosphonomethyl glycine*) και το *Glufosinate* (*N-phosphonomethylhomocysteine*). Και οι δύο ενώσεις είναι μη επιλεκτικά,

διασυστημικά ζιζανιοκτόνα⁵ ευρέος φάσματος, που χρησιμοποιούνται για τη μεταφυτρωτική καταπολέμηση μονοετών και πολυετών ζιζανίων. Και οι δύο ενώσεις περιέχουν μία ομάδα P = O, είναι οργανοφωσφορικές και δεν αναστέλλουν τη δράση της AChE.

Το *Glyphosate* είναι συνθετική ουσία. Προϊόντα που περιέχουν ως δραστική ουσία μόρια με βάση το *Glyphosate* είναι τα ευρύτερα χρησιμοποιούμενα μεταφυτρωτικά ζιζανιοκτόνα ευρέος φάσματος (π.χ. "*Roundup*") και είναι εμπορικά διαθέσιμα σε διάφορες μορφές αλάτων, όπως καλίου, αμμωνίου και ισοπροπυλαμίνης. Το *Glyphosate* απορροφάται από το έδαφος, αποικοδομείται γρήγορα και θεωρείται μία σχετικά ασφαλής ένωση. Εντούτοις, υπάρχουν ολόένα αυξανόμενες ανησυχίες και μελέτες αναφορικά με τη συνετή χρήση του, καθώς αν αυτή είναι ανεξέλεγκτη, ενδέχεται να προκληθούν δυσμενείς επιδράσεις στα αγροοικοσυστήματα. [44]



Σχήμα 1.12: Οι δομές των *Glyphosate* (αριστερά) & *Glufosinate* (δεξιά). [30]

Το *Glyphosate* ασκεί τη ζιζανιοκτόνο δράση του μέσω αναστολής της συνθετάσης του 5-ενολοπυροσταφυλοσικιμικού-3-φωσφορικού οξέος (*5-enol-pyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase, EPSPS*), που καταλύει το έκτο βήμα στο μονοπάτι του σικιμικού οξέος. Αναστέλλοντας τη δράση της *EPSPS* παρεμποδίζεται η βιοσύνθεση αρωματικών αμινοξέων και συγκεκριμένα της φαινυλαλανίνης, της τυροσίνης και της τρυπτοφάνης, τα οποία παράγονται μέσω του μονοπατιού αυτού. Η μεταβολική αυτή οδός είναι σημαντική για την ανάπτυξη των φυτών, αλλά δεν υπάρχει στα θηλαστικά. [12],[44]

Ήπια δηλητηρίαση από *Glyphosate* προκαλεί κυρίως παροδικά γαστρεντερικά συμπτώματα, ενώ η μέτρια ή σοβαρή εκδηλώνονται με γαστρεντερική αιμορραγία, υπόταση, πνευμονική δυσλειτουργία και νεφρική βλάβη. Μέχρι και πριν από λίγα χρόνια δεν είχε συσχετιστεί με τερατογόνες, αναπτυξιακές ή αναπαραγωγικές επιδράσεις, ενώ οι μελέτες γονιδιοτοξικότητας και καρκινογόνου δράσης σε ζώα ήταν αρνητικές. Εντούτοις, πρόσφατες μελέτες έδειξαν ότι το *Glyphosate* προκαλεί βλάβες στο DNA και στα χρωμοσώματα ανθρωπίνων κυττάρων, ενώ αντίστοιχα πειράματα σε βακτήρια έδωσαν αρνητικά αποτελέσματα. [12],[29]

Τα τελευταία χρόνια το καρκινογόνικο δυναμικό του *Glyphosate* ανασκοπείται και συζητείται εκτενώς μεταξύ διαφόρων επίσημων και ρυθμιστικών φορέων. Το 2015 ο IARC το ταξινόμησε στην κατηγορία 2A, "*πιθανά καρκινογόνο για τον άνθρωπο*" ("*The agent is*

5 Ονομάζονται και μεταφερόμενα ζιζανιοκτόνα, *translocated herbicides*, κατηγοριοποίηση βάσει του τρόπου εφαρμογής του ζιζανιοκτόνου: εφαρμόζονται στο χώμα ή στα υπόγεια μέρη του φυτού και στη συνέχεια απορροφώνται και μεταφέρονται σε απομακρυσμένους ιστούς.

probably carcinogenic to humans”). Το ίδιο έτος η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority, EFSA) με βάση την αναμενόμενη έκθεση του γενικού πληθυσμού δήλωσε ότι το *Glyphosate* δεν είναι πιθανό να προκαλέσει καρκίνο στον άνθρωπο. Στην άποψη αυτή κατέληξε και η Υπηρεσία Προστασίας Περιβάλλοντος των ΗΠΑ (U.S. Environmental Protection Agency, U.S. EPA) μετά από σχετική επανεκτίμηση το 2016, διευκρινίζοντας ωστόσο ότι η εκτίμηση αφορά σε δόσεις που προκύπτουν από την έκθεση λόγω κατανάλωσης τροφίμων, τα οποία ωστόσο καλύπτουν τις σχετικές νομοθετικές απαιτήσεις περί υπολειμμάτων (“*The strongest support is for “not likely to be carcinogenic to humans” at the doses relevant to human health risk assessment for glyphosate*”). Σε ευρωπαϊκό έδαφος πάντως, δεδομένης της επικείμενης λήξης της άδειας χρήσης του στα τέλη του 2022, η εκ νέου ταξινόμηση της επικινδυνότητας του *Glyphosate*, αναφορικά με διάφορα τοξικολογικά τελικά σημεία, συμπεριλαμβανομένης της καρκινογονικότητας, γενοτοξικότητας και αναπαραγωγικής και αναπτυξιακής τοξικότητας αναμένεται από τον αρμόδιο φορέα, ήτοι τον Ευρωπαϊκό Οργανισμό Χημικών Προϊόντων (European Chemical Agency, ECHA). [29],[45],[46],[47],[48],[49]

Σε ότι αφορά τη βιοπαρακολούθησή του, τα επίπεδα του *Glyphosate* στον ανθρώπινο οργανισμό μπορούν να ποσοτικοποιηθούν μετρώντας το ίδιο το μητρικό μόριο ή τον βασικό του μεταβολίτη, που θεωρείται το *AMPA* (*Aminomethylphosphonic acid*). Το μητρικό μόριο έχει αναγνωριστεί ως ποσοτικός βιοδείκτης για τη δια στόματος έκθεση. [49],[50]

Το *Glufosinate* είναι μια ουσία που παρασκευάζεται συνθετικά, αλλά και στη φύση, κατά τον μεταβολισμό των φυτών. Τα βακτήρια *Streptomyces hygroscopicus* και *Streptomyces viridochromogenes* παράγουν το φυσικό ζιζανιοκτόνο *Bialaphos*, το οποίο είναι προτοξίνη, μη τοξική, πρώιμη μορφή του *Glufosinate*. [51]

Πρόκειται για ένα μη επλεκτικό ζιζανιοκτόνο επαφής (προσβάλλει τα φυτά στα οποία εφαρμόζεται), που δρα μέσω μη αναστρέψιμης αναστολής της συνθετάσης της γλουταμίνης. Τα φυτά καταστρέφονται λόγω των αυξημένων επιπέδων αμμωνίας. Τα θηλαστικά διαθέτουν διαφορετικά μεταβολικά συστήματα που μπορούν να αντισταθμίσουν την επίδραση στη δραστηριότητα της συνθετάσης της γλουταμίνης μέχρι ενός βαθμού. Συμπτώματα της ανθρώπινης δηλητηρίασης από *Glufosinate* αποτελούν οι γαστρεντερικές και οι καρδιολογικές δράσεις, η αναπνευστική δυσχέρεια και οι νευρολογικές διαταραχές. [12]

Ο κύριος μεταβολίτης του *Glufosinate* στο έδαφος, τα φυτά και τα ανθρώπινα ούρα είναι το *3MPPA* (*3-(Hydroxymethylphosphinoyl)propionic acid*), το οποίο σύμφωνα με τον EPA θεωρείται λιγότερο τοξικό από το μητρικό του μόριο. [51]

1.6.7 Μυκητοκτόνα

Η καταπολέμηση των μυκητιακών ασθενειών είναι σχεδόν αδύνατη χωρίς χημική εφαρμογή. Οι μυκητοκτόνες χημικές ουσίες έχουν διάφορες δομές, που εκκινούνται από απλές ανόργανες ενώσεις, όπως ο θειικός χαλκός, μέχρι πολύπλοκα οργανικά μόρια. Τα

περισσότερα μυκητοκτόνα είναι προστατευτικά επιφανειών ή φυτών και εφαρμόζονται πριν από πιθανή μόλυνση από σπόρια μυκήτων, είτε στα φυτά, είτε στον καρπό μετά τη συγκομιδή. Άλλα μυκητοκτόνα μπορούν να χρησιμοποιηθούν θεραπευτικά, για τη θεραπεία των φυτών, όταν έχει ξεκινήσει ήδη η μυκητίαση. Άλλα πάλι χρησιμοποιούνται ως διασυστημικά μυκητοκτόνα που απορροφώνται και κατανέμονται σε ολόκληρο το φυτό. Στα μυκητοκτόνα ανήκουν το *Captan*, το *Folpet*, οι διθειοκαρβαμιδικές ενώσεις και τα ανόργανα και οργανικά μυκητοκτόνα. [12]

Τα μυκητοκτόνα, με λίγες εξαιρέσεις, έχουν χαμηλή οξεία τοξικότητα για τα θηλαστικά. Κάποια μυκητοκτόνα έχουν συνδεθεί με σοβαρές επιδημίες δηλητηρίασης και για τον λόγο αυτόν έχουν απαγορευτεί. [15]



Σχήμα 1.13: Οι δομές των *Captan* (αριστερά) & *Folpet* (δεξιά). [30]

1.7 Μελέτες βιοπαρακολούθησης

1.7.1 Στόχοι και σχεδιασμός μελετών βιοπαρακολούθησης

Οι μελέτες ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης έχουν διάφορους στόχους, όπως την εκτίμηση της κατανομής της έκθεσης ενός χημικού ρυπαντή - τοξικού παράγοντα, την ανίχνευση αναδυόμενων απειλών και κινδύνων για τη δημόσια υγεία, την παρακολούθηση των επιπτώσεων των πολιτικών παρεμβάσεων που στοχεύουν στη μείωση ή την πρόληψη επιβλαβών εκθέσεων, την προτεραιοποίηση στην εκτίμηση επικινδυνότητας των διαφόρων τοξικών παραγόντων, την παρακολούθηση χωρικών μοτίβων και χρονικών τάσεων, τον εντοπισμό και την παρακολούθηση περιοχών επιβαρυσμένων με χημικούς ρυπαντές, την υποστήριξη επιδημιολογικών ερευνών και της σύγχρονης μελέτης της εξατομικευμένης εφόρου ζωής έκθεσης σε χημικούς παράγοντες και των συνεπειών της (*"exposome"*) κ.ά. Επιπλέον, παρέχουν πληροφορίες που είναι απαραίτητες για τον εντοπισμό χημικών ουσιών που πρέπει να αξιολογηθούν σε σχέση με τους πιθανούς κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία σε συγκεκριμένες πληθυσμιακές υποομάδες ή περιοχές. [1]

1.7.2 Παραδείγματα μελετών βιοπαρακολούθησης

Παγκοσμίως έχουν υπάρξει και εξακολουθούν να υπάρχουν διάφορα προγράμματα επιτήρησης, τα οποία ενσωματώνουν μελέτες ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης. Το μεγαλύτερο σε διάρκεια αποτελεί το εθνικό πρόγραμμα των Ηνωμένων Πολιτειών

Αμερικής (*National Health and Nutrition Examination Survey, NHANES*), το οποίο διενεργείται από το 1971 και εστιάζει στην υγεία και τη διατροφή.

Μία άλλη μελέτη διεθνούς εμβέλειας είναι αυτή του ΠΟΥ για την Ευρώπη, η οποία περιλαμβάνει τη βιοπαρακολούθηση έμμονων οργανικών ρυπαντών (*persistent organic pollutants, POPs*) στο μητρικό ανθρώπινο γάλα (*WHO survey of POPs in human milk in the European Region*).

Το πρόγραμμα *DEMOCOPHES* αποτελεί μία πρώτη, κοινή προσπάθεια εναρμονισμένης βιοπαρακολούθησης σε ευρωπαϊκό επίπεδο. Αναπτύχθηκε από την κοινοπραξία *COPHES* (*Consortium to Perform Human Biomonitoring on a European Scale, [52]*) και εφαρμόστηκε σε 17 ευρωπαϊκές χώρες, εστιάζοντας στην εκτίμηση και την κατανομή της έκθεσης στον υδράργυρο, το κάδμιο, τον καπνό του τσιγάρου (κοτινίνη), ορισμένους φθαλικούς εστέρες και τη *διφαινόλη Α* για έξι χώρες, με τη χρήση συγκεκριμένων βιοδεικτών και δεδομένων από ερωτηματολόγια.

Το πρόγραμμα *CROME* (*Cross-Mediterranean Environment and Health Network, [53]*) αποτέλεσε μία προσπάθεια επιδημιολογικής μελέτης σε χώρες της Ευρωπαϊκής Μεσογείου (συμμετείχε και η Ελλάδα) και στόχευε στον πλήρη χαρακτηρισμό τοξικών περιβαλλοντικών ρυπαντών. [1]

Σήμερα, το εν εξελίξει έργο “*Ευρωπαϊκή Πρωτοβουλία Βιολογικής Παρακολούθησης του Ανθρώπου ή Ανθρώπινης Βιοπαρακολούθησης*” (“*European Human Biomonitoring Initiative – HBM4EU*”, [5]) αποτελεί ένα ευρωπαϊκό κοινό πρόγραμμα, που στοχεύει στην παροχή συγκρίσιμων δεδομένων σχετικά με την έκθεση και την υγεία σε επίπεδο *ΕΕ* για τη λήψη πολιτικών αποφάσεων. Η προγραμματισμένη διάρκειά του είναι από 01.01.2017 έως 31.12.2021. Ένας σημαντικός στόχος του έργου είναι επίσης η καθιέρωση της ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης ως μακροπρόθεσμου εργαλείου, μετά και την ολοκλήρωσή του στο τέλος του 2021, με πολιτικές ψήφους από την *Ευρωπαϊκή Επιτροπή* (*European Commission*) και τα κράτη μέλη της *ΕΕ*. [4]

Επιπλέον, εθνικές μελέτες βιοπαρακολούθησης έχουν διεξαχθεί ή εξακολουθούν να διεξάγονται σε διάφορες χώρες, όπως στο Βέλγιο, στη Γερμανία, τη Γαλλία, την Ισπανία, τη Ρωσική Ομοσπονδία, τη Δανία και τη Νορβηγία. [1]

1.8 Περιορισμοί & κοινωνικές, ηθικές και νομικές συνέπειες μελετών βιοπαρακολούθησης

Η διασφάλιση της ποιότητας των βιοδεικτών έκθεσης συνήθως εστιάζει μόνο στην εργαστηριακή επίδοση, παρά το γεγονός ότι αυτή δεν αποτελεί τη μοναδική πηγή μεταβλητότητας. Μία σημαντική παράμετρος που θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη είναι το υπόστρωμα στο οποίο προσδιορίζεται ένας βιοδείκτης. Το μέγεθος της επαγόμενης αβεβαιότητας μπορεί να ξεπερνά κατά πολύ την εργαστηριακή αβεβαιότητα και να οδηγήσει τελικά σε υποεκτίμηση της προκληθείσας τοξικότητας, η οποία σχετίζεται με τη δόση του τοξικού παράγοντα στο υπόστρωμα του οργανισμού που εξετάζεται. Όλοι οι

βιοδείκτες έκθεσης θα πρέπει επομένως να θεωρούνται λιγότερο ή περισσότερο αντιπροσωπευτικές ενδείξεις της πραγματικής έκθεσης και η ανάλυση δεδομένων πρέπει να περιλαμβάνει εκτίμηση της ευαισθησίας για την προσαρμογή σε αυτό το ζήτημα. Σε κάθε περίπτωση, η μη ορθή εκτίμηση ή η παράβλεψη παραγόντων που προηγούνται της αναλυτικής διαδικασίας μπορεί να προκαλέσει σοβαρά συστηματικά σφάλματα. [54]

Ηθικά και επιστημονικά πρότυπα για την διεξαγωγή βιοεπιστημονικών μελετών σε ανθρώπους έχουν αναπτυχθεί και ενσωματωθεί σε διεθνείς οδηγίες, όπως η *Διακήρυξη του Ελσίνκι της Παγκόσμιας Ιατρικής Ένωσης (World Medical Association, WMA, "Declaration of Helsinki (DoH) – Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects"* [55]), η *Διεθνής Οδηγία Ηθικής για Βιοϊατρική Έρευνα σε ανθρώπους (Council for International Organizations of Medical Sciences (CIOMS) - "International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects")* [56] και η *Οδηγία Ορθής Κλινικής Πρακτικής του Διεθνούς Συμβουλίου για την εναρμόνιση των απαιτήσεων για την καταχώριση φαρμακευτικών προϊόντων για ανθρώπινη χρήση (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements or Pharmaceuticals for Human Use (ICH) - "Guidelines for Good Clinical Practice")* [57]. Τα δείγματα και τα δεδομένα που σχετίζονται με την ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση θεωρούνται ευαίσθητα προσωπικά δεδομένα. [1],[11]

Τα πλεονεκτήματα της βιοπαρακολούθησης συνοδεύονται από κάποιους σημαντικούς περιορισμούς. Ένας από αυτούς είναι το γεγονός ότι τα δεδομένα που παράγονται από τις αναλύσεις των δειγμάτων δεν μπορούν να αποκαλύψουν την πηγή της έκθεσης ή/και τις οδούς μέσω των οποίων εκτέθηκε το υποκείμενο, όπως για παράδειγμα εάν η έκθεση προήλθε από επαγγελματική ή μη επαγγελματική πηγή. [11]

Επίσης, στις μελέτες βιοπαρακολούθησης συνήθως προσδιορίζεται η συγκέντρωση μιας χημικής ουσίας σε ένα βιολογικό υπόστρωμα χωρίς να υπάρχει η πληροφορία πότε έλαβε χώρα ή πόσο διήρκησε η έκθεση. Οι ιδιότητες της χημικής ουσίας ή του μεταβολίτη της επηρεάζουν το χρονικό διάστημα που παραμένει στο σώμα και αποτελούν καθοριστικό παράγοντα για την κατανόηση και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Για τις έμμονες χημικές ουσίες, τα δεδομένα βιοπαρακολούθησης παρέχουν πληροφορίες σχετικά με το ποια χημική ουσία και σε τι ποσότητα εισήχθη στον οργανισμό και συσσωρεύθηκε. Για χημικές ουσίες που παραμένουν στο σώμα για μικρότερες χρονικές περιόδους, τα δεδομένα βιοπαρακολούθησης μπορεί να είναι πολύ πιο δύσκολο να ερμηνευθούν. Στις περιπτώσεις αυτές, ο χρόνος και η διάρκεια της έκθεσης γίνονται πιο κρίσιμα στοιχεία για την ερμηνεία. [7]

Μερικοί βιοδείκτες ενδέχεται να μην είναι ικανοποιητικά ειδικοί για την εκτίμηση της έκθεσης σε μία συγκεκριμένη χημική ουσία – τοξικό παράγοντα. Συνεπώς η συσχέτιση των βιοδεικτών έκθεσης με τα ρεαλιστικά επίπεδα εξωτερικής έκθεσης δεν είναι εύκολη υπόθεση, ενώ είναι ακόμη πιο δύσκολο να δημιουργηθεί μια σχέση μεταξύ των βιοδεικτών έκθεσης και των βιολογικών τελικών σημείων, όπως είναι οι δυσμενείς αποκρίσεις ή επιπτώσεις. [11]

Η βιοπαρακολούθηση είναι ένα από τα καλύτερα και πιθανώς ταχύτερα αναπτυσσόμενα εργαλεία, που διαθέτουν οι τοξικολόγοι στη φαρέτρα τους σήμερα για την πρόληψη των

επιπτώσεων στην υγεία, σαν αποτέλεσμα της επαγγελματικής έκθεσης σε χημικές ουσίες. Συνεπώς δίδεται αυξανόμενη προσοχή σε επιστημονικά και ηθικά ζητήματα, καθώς και κοινωνικές επιπτώσεις που πρέπει να περιλαμβάνουν ατομική εκτίμηση κινδύνου, επικοινωνία επιδημιολογικών αποτελεσμάτων και “μετάφραση” επιδημιολογικών δεδομένων σε κλινικές ή επαγγελματικές πρακτικές υγείας. [11]

Σύμφωνα με τον *Διεθνή Κώδικα Επαγγελματικής Ηθικής & Δεοντολογίας*, οι βιοδείκτες θα πρέπει να επιλέγονται βάσει επιστημονικών κριτηρίων και συγκεκριμένα για την εγκυρότητα και τη συνάφεια τους με την προστασία της υγείας του ενδιαφερόμενου εργαζομένου, λαμβάνοντας δεόντως υπόψη την ευαισθησία, την ειδικότητα και την προγνωστική αξία τους. Οι βιοδείκτες δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται ως έλεγχοι διαλογής ή για ασφαλιστικούς σκοπούς. [11]

Η αναγνώριση των ατόμων που υπόκεινται σε δυνητικά αυξημένο κίνδυνο εμφάνισης καρκίνου λόγω της έκθεσης (ιδίως της επαγγελματικής), θέτει το ηθικό δίλημμα που είναι κοινό σε μεγάλο μέρος της τρέχουσας ανάπτυξης εφαρμογών βιοδεικτών:

Πώς να αποτρέπεται η έκθεση των ευπαθών ατόμων σε αυτές τις χημικές ουσίες;

Αναφορικά με τον γενετικό έλεγχο των εργαζομένων, πολλοί επικριτές έχουν σημειώσει τη σημασία του ελέγχου των εκθέσεων στο χώρο εργασίας αντί να απομακρύνουν τους ευάλωτους (“υπερευαίσθητους”) εργαζόμενους από το χώρο εργασίας. [11]

Η στρατηγική για τη διαχείριση των δεδομένων, η ανάλυση δεδομένων, η ερμηνεία, η επικοινωνία και η διάδοση των αποτελεσμάτων στους εργαζόμενους, τις ομάδες σύγκρισης και άλλους που εμπλέκονται στις μελέτες βιοπαρακολούθησης είναι όλα θέματα που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη πριν από την έναρξη οποιασδήποτε μελέτης βιοπαρακολούθησης. [11]

Εν κατακλείδι, το πιο σημαντικό ερώτημα για την εφαρμογή της βιοπαρακολούθησης είναι αν η έκθεση σε μια χημική ουσία προκαλεί επιπτώσεις στην υγεία. Παρά τη φύσει έντονη δυναμική της, η χρησιμότητα και η ερμηνεία των παραγόμενων δεδομένων είναι αμφιλεγόμενες. Η διαμάχη οφείλεται εν μέρει στο γεγονός ότι ο ρυθμός με τον οποίο δημιουργούνται δεδομένα βιοπαρακολούθησης έχει επισκιάσει την ανάπτυξη βασικών τεχνικών επιδημιολογίας, τοξικολογίας και εκτίμησης της έκθεσης. Οι τεχνικές αυτές απαιτούνται τόσο για την αξιολόγηση του κατά πόσον μια χημική ουσία που μετράται σε ένα άτομο ή έναν πληθυσμό μπορεί να προκαλέσει κίνδυνο για την υγεία, όσο και για τον προσδιορισμό των πηγών της έκθεσης. Η τεχνική ικανότητα δημιουργίας νέων δεδομένων βιοπαρακολούθησης έχει ουσιαστικά υπερβεί την ικανότητά να τα ερμηνεύουμε. Έτσι, έχει καταστεί ευκολότερος ο προσδιορισμός των χημικών ουσιών ή μεταβολιτών τους στο σώμα, παρά η ερμηνεία ή η κοινοποίηση των σχετικών ευρημάτων, συναρτήσει πάντοτε του γεγονότος ότι η πιθανή παρουσία τους για παράδειγμα στο αίμα ή στα ούρα των ανθρώπων δεν σημαίνει απαραίτητα ότι η ουσία αυτή ενέχει κίνδυνο για την υγεία ή οδηγεί σε κάποια ασθένεια. Η πρόκληση λοιπόν για τους λειτουργούς δημόσιας υγείας είναι να κατανοήσουν τις επιπτώσεις στην υγεία των δεδομένων βιοπαρακολούθησης και να επεξεργαστούν κατάλληλες πολιτικές για τη δημόσια υγεία. [7]

Κεφάλαιο 2 Επικύρωση βιοαναλυτικής μεθόδου

2.1 Αντικείμενο

Στο παρόν κεφάλαιο παρουσιάζονται και αναλύονται τα χαρακτηριστικά επίδοσης μίας βιοαναλυτικής μεθόδου και τα σχετικά εφαρμοζόμενα κριτήριά τους. Βασικούς άξονες για τη σύνταξη του κεφαλαίου αποτέλεσαν οδηγίες από το χώρο της φαρμακευτικής [58],[59],[60],[61], της δικανικής τοξικολογίας [62],[63] και της αναλυτικής χημείας [64].

2.2 Εισαγωγικά στοιχεία

Οι επιστήμονες χρειάζονται τις αναλυτικές μεθόδους, για να προσδιορίζουν στοιχεία, μόρια χαμηλού μοριακού βάρους (σχετική μοριακή μάζα) και μακρομόρια σε διαφόρων τύπων υποστρώματα, προκειμένου να υποστηρίξουν φαρμακευτικές, περιβαλλοντικές, βιολογικές, ιατρικές ή τοξικολογικές εφαρμογές.

Πόσο διαφορετική είναι η συμπεριφορά των ατόμων ή των μορίων μιας ουσίας στο νερό, σε έναν οργανικό διαλύτη, σε ένα δείγμα τροφίμου, στο αίμα, στα ούρα ή σε έναν βιολογικό ιστό; Πώς θα ανακτηθεί η μεγαλύτερη δυνατή ποσότητα μιας ουσίας από το αρχικό της υπόστρωμα σε ένα διαλύτη προκειμένου να μετρηθεί σε κατάλληλο αναλυτικό όργανο; Ποιες είναι οι δυνατότητες και ποιοι οι περιορισμοί του αναλυτικού οργάνου για κάθε περίπτωση; Ποιο είναι το βέλτιστο εύρος μετρήσεων και κατά πόσο αυτό ικανοποιεί τις σύγχρονες ρυθμιστικές απαιτήσεις;

Προκειμένου να απαντηθούν ερωτήματα σαν τα παραπάνω, οι ποσοτικές μέθοδοι αναπτύσσονται και χαρακτηρίζονται, αποδεικνύοντας ότι η αναλυτική διαδικασία που εφαρμόστηκε για έναν συγκεκριμένο έλεγχο είναι κατάλληλη για το σκοπό αυτόν. [65]

Η διαδικασία αυτή ονομάζεται επικύρωση. Στόχος της είναι να καθορίσει χαρακτηριστικά μίας δοκιμασίας, όπως ο όγκος του δείγματος, το όριο ποσοτικοποίησης, η γραμμικότητα, η ορθότητα, η πιστότητα και η εκλεκτικότητα και να εντοπίσει πιθανά ζητήματα, όπως η σταθερότητα του αναλύτη στόχου ή η αποθήκευση των δειγμάτων. [65]

Τα αξιόπιστα αναλυτικά δεδομένα αποτελούν προϋπόθεση για τη σωστή ερμηνεία των τοξικολογικών ευρημάτων, τόσο κατά την αξιολόγηση επιστημονικών μελετών, όσο και στην καθημερινή εργαστηριακή πρακτική. Στην επιστημονική έρευνα μη αξιόπιστα αποτελέσματα μπορεί να οδηγήσουν σε υπό- ή υπερεκτίμηση των συγκεντρώσεων και εν συνεχεία των τοξικολογικών επιπτώσεων, σε ψευδείς ερμηνείες και σε αβάσιμα και αδικαιολόγητα συμπεράσματα. Στην καθημερινή εργασία στην κλινική και δικανική τοξικολογία, τα αναξιόπιστα αναλυτικά αποτελέσματα ενδέχεται όχι μόνο να αμφισβητηθούν στο δικαστήριο, αλλά να οδηγήσουν σε νομικές συνέπειες για τον εναγόμενο ή σε λανθασμένη θεραπεία ενός ασθενούς. [66],[67]

Συνεπώς οι νέες αναλυτικές μέθοδοι που προορίζονται για εφαρμογή στο πεδίο της τοξικολογίας απαιτούν προσεκτική ανάπτυξη και ενδεδειγμένη επικύρωση της τελικής μορφής

τους. Τούτο ισχύει ιδιαίτερα στα πεδία της διαχείρισης της ποιότητας και της διαπίστευσης, που τα τελευταία χρόνια έχουν αποτελέσει θέματα ιδιαίτερης σημασίας για την αναλυτική τοξικολογία. [66],[67]

2.3 Η επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων μέχρι σήμερα

Η βιοανάλυση είναι ένας όρος που δημιουργήθηκε στη δεκαετία του 1970, προκειμένου να περιγράψει τη διαδικασία ποσοτικοποίησης φαρμακευτικών ουσιών σε βιολογικά υγρά με στόχο τον προσδιορισμό της φαρμακοκινητικής τους. Παραδοσιακά ο όρος βιοανάλυση αναφέρεται στον προσδιορισμό μικρού μοριακού βάρους μορίων φαρμακευτικών ουσιών. Σήμερα δεδομένης της ανάπτυξης νέων τεχνικών και τεχνολογιών (κυρίως χρωματογραφία, φασματομετρία μάζας και τεχνικές δέσμευσης) ο όρος έχει διευρυνθεί για να καλύψει τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών μεγαλύτερου μοριακού βάρους, βιομορίων, βιοδεικτών και ξενοβιοτικών και για να βρει εφαρμογή σε χώρους, όπως η κλινική χημεία, η δικανική επιστήμη, η βιοαναλυτική τοξικολογία, η περιβαλλοντική τοξικολογία κ.ά. [68],[69] Ιστορικά, τα αρχικά κίνητρα για τον έλεγχο της παρουσίας φαρμακευτικών ουσιών σε βιολογικά υγρά ήταν ο εντοπισμός υπερδοσολογίας, στο πλαίσιο της δικανικής ιατρικής/τοξικολογίας. [70]

Καθώς η ανάπτυξη τεχνολογιών προχώρουσε στη βιοανάλυση, τα πραγματικά κριτήρια για τον χαρακτηρισμό των αναλυτικών μεθόδων και την επιβεβαίωση ότι βρίσκονται υπό έλεγχο ποίκιλαν από εργαστήριο σε εργαστήριο. Πολλά εργαστήρια χρησιμοποιούσαν εργαλεία της κλινικής χημείας, ενώ άλλα της περιβαλλοντικής, χωρίς να υπάρχει τυποποιημένος τρόπος για να γίνεται αυτό. Μία από τις πρώτες επίσημες προσπάθειες δημιουργίας κανονιστικού πλαισίου για τη βιοανάλυση έγινε το 1977 από τον FDA και αφορούσε σε απαιτήσεις για την τήρηση διαδικασιών κατά τον προσδιορισμό της βιοδιαθεσιμότητας και της βιοϊσοδυναμίας φαρμακευτικών προϊόντων. [69],[70]

Η επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων έχει τις ρίζες της στη δεκαετία του 1990 και στις αρχές του 2000. [67],[72],[73],[74] Η γνώση και η εμπειρία, όπως αποτυπώθηκε τότε ουσιαστικά αποτέλεσε τη βάση για τη μετέπειτα σύνταξη βασικών εθνικών οδηγιών. [59],[66],[74]

Την τελευταία δεκαετία έχουν εκδοθεί από διάφορες κανονιστικές αρχές ανά τον κόσμο κείμενα - οδηγίες (κανονιστικές οδηγίες/καθοδηγητικά κείμενα, *guidelines/guidances*) αναφορικά με την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων (*Bioanalytical method validation, BMV*) για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών (και) με τη χρήση χρωματογραφικών τεχνικών. [70] Ενδεικτικά, αλλά όχι περιοριστικά αναφέρονται τα ακόλουθα:

- × European Medicines Agency (EMA): *Guideline on Bioanalytical Method Validation* (2011) [60]
- × U.S. Food & Drug Administration (FDA): *Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation*, (2018) [59]

- ✘ Japan: *Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development* (2013) [61]
- ✘ Brazil: ANVISA. *Resolution RDC 27: Minimum Requirements for Bioanalytical Method Validation Used in Studies with the Purpose of Registration and Post-registration of Medicines. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, (2012). Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). Guide for bioanalytical method validation – RDC n.27/2012 (2003).*

Η βιοανάλυση σήμερα παίζει σημαντικό ρόλο στη διεξαγωγή τοξικοκινητικών, φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών μελετών νέων φαρμακευτικών ουσιών και προϊόντων. Η χρήση αξιόπιστων δεδομένων, τα οποία λαμβάνονται μέσω επικυρωμένων βιοαναλυτικών μεθόδων είναι κρίσιμη για τον έλεγχο των αιτήσεων αδειοδότησης κυκλοφορίας των φαρμακευτικών προϊόντων. [76] Έχει καθιερωθεί επίσης σε εργαστήρια που έχουν ως αντικείμενο την κλινική, την προκλινική και τη δικανική τοξικολογία. Έτσι, η βιοανάλυση αποτελεί έναν σημαντικό πεδίο σε πολλούς ερευνητικούς τομείς, όπως η ανάπτυξη νέων φαρμάκων, η δικανική ανάλυση, ο έλεγχος του ντόπινγκ και ο εντοπισμός βιοδεικτών για τη διάγνωση πολλών ασθενειών. [77]

2.4 Ανάγκη για μία κοινή παγκόσμια οδηγία

Τα τελευταία χρόνια ρυθμιστικές αρχές και φαρμακευτικές βιομηχανίες από όλο τον κόσμο έχουν συμμετάσχει σε μία σειρά από σημαντικές πρωτοβουλίες, ώστε να προωθήσουν τη διεθνή εναρμόνιση των κανονιστικών απαιτήσεων, υπό το Διεθνές Συμβούλιο για την εναρμόνιση των απαιτήσεων για την καταχώριση φαρμακευτικών προϊόντων για ανθρώπινη χρήση (*The International Council for Harmonisation of Technical Requirements or Pharmaceuticals for Human Use, ICH, [78]*), πρώην Διεθνής Διάσκεψης για την Εναρμόνιση (*International Conference on Harmonisation*). [79]

Ένας από τους στόχους της εναρμόνισης είναι η αναγνώριση και η άμβλυση διαφορών στις τεχνικές απαιτήσεις για την ανάπτυξη φαρμακευτικών προϊόντων μεταξύ διαφορετικών κανονιστικών αρχών. [79]

Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, τις ΗΠΑ και την Ιαπωνία οι ρυθμιστικές οδηγίες και τα καθοδηγητικά κείμενα, που οι χώρες αυτές έχουν εκδώσει και ακολουθούν σχετικά με την επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων, καθιερώνουν προτεινόμενες συστάσεις για βασικές απαιτήσεις τους για τις χώρες/περιοχές αυτές. Ωστόσο υπάρχουν διαφορές ανάμεσά τους, αναφορικά με τη διαδικασία επικύρωση και την ανάλυση δειγμάτων μελέτης και οι διαφορές αυτές εξακολουθούν να αποτελούν εμπόδιο για την από κοινού χρήση βιοαναλυτικών δεδομένων στην παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων σε παγκόσμια κλίμακα. Αυτό σημαίνει ότι οι χορηγοί, που επιδιώκουν καθολικές - παγκόσμιες εγκρίσεις, πρέπει να συνδυάσουν πολλαπλές κανονιστικές οδηγίες και καθοδηγητικά κείμενα σε διαφορετικές χώρες και συχνά απαιτούνται - ενδεχομένως περιττές - διπλές δοκιμές, προκειμένου να ικανοποιηθούν αυτές οι κυμαινόμενες απαιτήσεις. [79]

2.4.1 Εναρμόνιση: “ICH guideline M10 on bioanalytical method validation_Step 2b”

Το σχέδιο της οδηγίας προετοιμάστηκε υπό την αιγίδα του ICH. Η δημοσίευσή της θα αποτελέσει το σημαντικότερο ορόσημο στην ιστορία της βιοανάλυσης σε κανονιστικό επίπεδο, κλείνοντας ένα κεφάλαιο έντονων συζητήσεων μεταξύ της φαρμακευτικής βιομηχανίας και των υγειονομικών αρχών, που άνοιξε το 2001. [80]

Η προσδοκία είναι η νέα αυτή οδηγία να εφαρμοστεί ως ένα κοινό σημείο αναφοράς στην επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων, σε δείγματα μελετών για μη κλινικές και κλινικές μελέτες που παράγουν δεδομένα για την υποστήριξη κανονιστικών απαιτήσεων. [76],[81], [82]

Η κατευθυντήρια αυτή οδηγία προορίζεται για την παροχή συστάσεων για την επικύρωση βιοαναλυτικών δοκιμών ποσοτικοποίησης χημικών και βιολογικών φαρμακευτικών ουσιών και την εφαρμογή τους στην ανάλυση δειγμάτων μελέτης. [58]

Οι πληροφορίες του σχεδίου της οδηγίας εφαρμόζονται στην ποσοτική ανάλυση με τεχνικές δέσμευσης (*ligand binding assays, LBA*) και χρωματογραφικές μεθόδους, όπως η υγρή ή η αέρια χρωματογραφία, οι οποίες συνήθως συζεύγνυνται με φασματογράφους μάζας και κατά περίπτωση με άλλους ανιχνευτές. [58]

Τα κυριότερα τεχνικά και επιστημονικά θέματα που αφορούν στην επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής [58],[79]:

- i. επικύρωση της μεθόδου
- ii. ανάλυση δειγμάτων μελέτης και
- iii. τήρηση τεχνικών αρχείων για τις δύο πρώτες κατηγορίες.

2.5 Η εφαρμογή βιοαναλυτικών μεθόδων στην Τοξικολογία

Η Τοξικολογία είναι η επιστήμη που μελετά τις δυσμενείς επιδράσεις ξενοβιοτικών παραγόντων (χημικών ή φυσικών) σε ζώντες οργανισμούς, ως αποτέλεσμα της αλληλεπίδρασής τους. [83]

Η σύγχρονη Τοξικολογία αντλεί τη δύναμη και την ποικιλομορφία της από τη δυνατότητά της να δανείζεται στοιχεία από όλες σχεδόν τις βασικές επιστήμες και να διαμορφώνεται ως αυτοτελής επιστήμη. Έτσι προχωρά πέρα από τη μελέτη των ανεπιθύμητων ενεργειών των εξωγενών παραγόντων, καθώς αξιοποιεί γνώσεις και τεχνικές από τους περισσότερους κλάδους της Βιοχημείας, της Βιολογίας, της Χημείας, της Γενετικής, των Μαθηματικών, της Ιατρικής, της Φαρμακολογίας, της Φυσιολογίας και της Φυσικής και εκφράζει τις αρχές της αξιολόγησης της ασφάλειας και της εκτίμησης της επικινδυνότητας. Σε όλους τους κλάδους της τοξικολογίας οι επιστήμονες ερευνούν τους μηχανισμούς μέσω των οποίων οι χημικές ουσίες προκαλούν δυσμενείς επιδράσεις στα βιολογικά συστήματα. Οι δραστηριότητες στο ευρύ αυτό αντικείμενο συμπληρώνουν την τοξικολογική έρευνα. [12]

Η βιοαναλυτική χημεία είναι κλάδος της αναλυτικής χημείας που περιλαμβάνει τον διαχωρισμό, την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση βιολογικών μορίων (π.χ. πεπτίδια, πρωτεΐνες, DNA) και ξενοβιοτικών (φαρμακευτικές ουσίες κ.ά.) σε βιολογικά υποστρώματα (βιολογικά υγρά και ιστοί). [84]

Η αναλυτική τοξικολογία από την άλλη πλευρά περιλαμβάνει την εφαρμογή των εργαλείων της αναλυτικής χημείας στην ποιοτική ή/και ποσοτική εκτίμηση των χημικών ουσιών, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν δυσμενείς επιδράσεις σε ζώντες οργανισμούς. [12]

Αν και ο όρος βιοαναλυτική τοξικολογία δεν εμφανίζεται ως δόκιμος στη βιβλιογραφία θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει το πεδίο δράσης της βιοαναλυτικής χημείας στην τοξικολογία ή αλλιώς της αναλυτικής τοξικολογίας σε βιολογικά υποστρώματα και ουσιαστικά να εξειδικεύσει - συγκεκριμενοποιήσει την εφαρμογή αναλυτικών τεχνικών διαχωρισμού, ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης τοξικών παραγόντων σε βιολογικά υποστρώματα. Ο ρόλος της είναι κεντρικός τόσο στην κλινική τοξικολογία, στην παρακολούθηση θεραπευτικών επιπέδων φαρμάκων, στη βιολογική παρακολούθηση ή βιοπαρακολούθηση (εργασιακή, ανθρώπινη, οικοσυστημάτων κ.λπ.), όσο και στην δικανική τοξικολογία. [15]

Τέλος η δικανική ή δικαστική τοξικολογία αφορά στη χρήση της τοξικολογίας για δικανικούς σκοπούς. Η πλέον συνήθης εφαρμογή της με διαφορά είναι ο εντοπισμός οποιασδήποτε ουσίας που μπορεί να αποτελέσει τον αιτιολογικό παράγοντα πρόκλησης θανάτου ή σωματικής βλάβης σε άνθρωπο και ζώα ή υλικές ζημιές. [12] Οι αναλυτικές μέθοδοι στην κλινική και τη δικανική τοξικολογία μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση φαρμάκων, τοξικών ουσιών, δηλητηρίων και/ή μεταβολιτών τους σε βιολογικά υγρά ή ιστούς, όσο και για την ποσοτικοποίησή τους στα υποστρώματα αυτά. [67]

2.6 Συσχέτιση επικύρωσης βιοαναλυτικών μεθόδων μεταξύ φαρμακευτικής & τοξικολογίας

Η βιοανάλυση στο πλαίσιο των οδηγιών που αναφέρθηκαν παραπάνω νοείται ως η ποσοτικοποίηση φαρμακευτικών ουσιών και μεταβολιτών τους σε βιολογικά υποστρώματα, όπως ολικό αίμα, ορό ή πλάσμα, ούρα ή άλλα βιολογικά υγρά, στο πλαίσιο κλινικών και μη κλινικών μελετών. [76] Αν και οι οδηγίες αυτές αφορούν στην επικύρωση βιοαναλυτικών μεθόδων με άμεσο πεδίο εφαρμογής τις φαρμακευτικές ουσίες, εντούτοις η κατάλληλα προσαρμοσμένη εφαρμογή τους στο πεδίο της αναλυτικής τοξικολογίας θεωρείται αρκετά βάσιμη.

Πιο συγκεκριμένα, οι διαφορές ανάμεσα στις αρχές που αφορούν την επικύρωση των βιοαναλυτικών μεθόδων για την εφαρμογή μελετών σε φάρμακα (ιδιαίτερα στο κομμάτι των μελετών φαρμακοκινητικής) και σε εκείνες που αφορούν στην τοξικολογία και δει στη δικανική και κλινική τοξικολογία είναι λίγες. Κατ' επέκταση είναι αρκετά λογικό η συζήτηση περί επικύρωσης στην τοξικολογία να βασιστεί στην εμπειρία και την κοινή

συναίνεση που υπάρχει ήδη στο συγγενές πεδίο των φαρμακοκινητικών μελετών για την καταχώριση φαρμακευτικών προϊόντων και εστιάζει σε εκείνες τις παραμέτρους, οι οποίες είναι ιδιαίτερα σημαντικές για τους τοξικολόγους, όπως η εκλεκτικότητα, το όριο ανίχνευσης, το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης και η σταθερότητα. [66] Ένα ακόμα στοιχείο που ενισχύει τον ισχυρισμό αυτόν είναι το γεγονός ότι η παρεκβολή γίνεται για τις ίδιες κατηγορίες αναλυτικών τεχνικών, ήτοι τη χρωματογραφία και τις τεχνικές δέσμευσης.

Πρόκειται λοιπόν για δύο επιστημονικούς τομείς με βασικά κοινά σημεία αναφοράς, καθώς (α) χρησιμοποιούν την αναλυτική χημεία, προκειμένου να προσδιορίσουν (β) με κοινή αναλυτική οργανολογία, (γ) σε ίδια (βιολογικά) υποστρώματα (δ) διαφορετικούς ή/και παρόμοιους, ακόμα και ίδιους μερικές φορές αναλύτες στόχους.

Είναι χαρακτηριστικό εξάλλου ότι ένα από τα βασικότερα κείμενα περί επικύρωσης βιοαναλυτικών μεθόδων για φαρμακευτικές ουσίες που δημοσιεύθηκε στις αρχές του 2000 [74] αποτέλεσε τη βάση για την έκδοση του πρώτου καθοδηγητικού κειμένου που αφορά ειδικά στην επικύρωση μεθόδων στην αναλυτική τοξικολογία ([85]) από τη Γερμανική εταιρία Τοξικολογίας και Δικανικής Χημείας (*Gesellschaft für Toxikologische und Forensische Chemie, GTFCh - Society of Toxicological and Forensic Chemistry*) το 2004. [67]

Αργότερα, το 2013, εκδόθηκε από την επιστημονική ομάδα εργασίας δικανικής τοξικολογίας (*Scientific Working Group for Forensic Toxicology, SWGTOX*) μία αναφορά με τίτλο “*Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*” [62]. Το πρότυπο αυτό υιοθετήθηκε από την SWGTOX και περιγράφει τις ελάχιστες πρότυπες πρακτικές για την επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων στη δικανική τοξικολογία.

Τέλος, η παραπάνω οδηγία, μετά τη διάσπαση της SWGTOX το 2014, αναθεωρήθηκε, προετοιμάστηκε, οριστικοποιήθηκε και εκδόθηκε ως εγκεκριμένο πρότυπο το 2019 [63] από τον αρμόδιο φορέα της Αμερικανικής Ακαδημίας Δικανικών Επιστημών (*Toxicology Consensus Body of the American Academy of Forensic Sciences – Academy Standards Board*). [86]

Το πρότυπο φέρει τον τίτλο “*ANSI/ASB Standard 036: Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology*” και αναπτύχθηκε προκειμένου να παρέχει καθοδήγηση για τις ελάχιστες απαιτήσεις επικύρωσης αναλυτικών μεθόδων στα εργαστήρια δικανικής τοξικολογίας. [63]

2.7 Γενικές αρχές επικύρωσης μεθόδου

2.7.1 Ανάπτυξη & βελτιστοποίηση της μεθόδου

Σκοπός της ανάπτυξης μιας βιοαναλυτικής μεθόδου είναι να καθοριστεί ο σχεδιασμός, οι συνθήκες λειτουργίας, οι περιορισμοί και η καταλληλότητα της μεθόδου για τον επιδιωκόμενο σκοπό εφαρμογής της και να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος είναι βελτιστοποιημένη για επικύρωση. [58]

Πριν από την ανάπτυξη της βιοαναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να έχουν συλλεγεί στοιχεία για τον αναλύτη στόχο, όπως οι φυσικοχημικές του ιδιότητες, ο *in vitro* και *in vivo*

μεταβολισμός του, η δυνατότητας σύνδεσής του με πρωτεΐνες και να έχουν εξεταστεί πτυχές οποιονδήποτε προηγούμενων αναλυτικών μεθόδων μπορούν να εφαρμοστούν. [58] Η ανάπτυξη περιλαμβάνει βελτιστοποίηση των διαδικασιών και συνθηκών, οι οποίες σχετίζονται με την παραλαβή/απομόνωση και ανίχνευση του αναλύτη στόχου. Μεταξύ άλλων μπορεί να περιλαμβάνει την μελέτη και βελτιστοποίηση των ακόλουθων βιοαναλυτικών παραμέτρων, ώστε να διασφαλιστεί ότι η μέθοδος είναι κατάλληλη για επικύρωση [58],[63]:

- x Καμπύλη βαθμονόμησης
- x Δείγματα ελέγχου ποιότητας
- x Εκλεκτικότητα και ειδικότητα
- x Ευαισθησία
- x Ορθότητα
- x Πιστότητα
- x Ανάκτηση
- x Σταθερότητα του αναλύτη στο υπόστρωμα (μήτρα)
- x Καταστολή/ενίσχυση του ιοντισμού
- x Ελάχιστες απαιτούμενες αραιώσεις

Επιπλέον θα πρέπει να βελτιστοποιούνται οι συνθήκες λειτουργίας του χρησιμοποιούμενου αναλυτικού οργάνου, καθώς και παράμετροι του λογισμικού για την παραλαβή των αποτελεσμάτων (*instrumental and data acquisition/processing parameters*).

Είναι ουσιαστικής σημασίας η επικύρωση να λάβει χώρα υπό τις ίδιες αναλυτικές συνθήκες και τεχνικές με αυτές τις ανεπτυγμένης μεθόδου στην τελική της μορφή. [63] Όταν αναπτυχθεί η βιοαναλυτική μέθοδος, η επικύρωσή της αποδεικνύει ότι η βελτιστοποιημένη μέθοδος είναι κατάλληλη για την ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων/δειγμάτων μελέτης. [58]

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι η καταλληλότητα μιας αναλυτικής μεθόδου κατά κύριο λόγο εξαρτάται από την ανάπτυξή της και όχι τόσο από την επικύρωσή της και πως στη βάση αυτής της συλλογιστικής είναι επιτακτική ανάγκη η ίδια η επιλεγείσα μέθοδος να είναι κατάλληλη για το σκοπό για τον οποίο προορίζεται. [67]

2.7.2 Επικύρωση μεθόδου

Η βάση για την παραγωγή υψηλής ποιότητας αναλυτικών δεδομένων είναι οι αξιόπιστες αναλυτικές μέθοδοι. Η επικύρωση μιας βιοαναλυτικής μεθόδου είναι απαραίτητη για να διασφαλιστεί η απόδοση της ανάλυσης και η αξιοπιστία των αναλυτικών αποτελεσμάτων.

Μια βιοαναλυτική μέθοδος ορίζεται ως ένα σύνολο διαδικασιών που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση των συγκεντρώσεων του αναλύτη στόχου σε βιολογικά δείγματα (σωματικά - βιολογικά υγρά και ιστοί). [58]

Επικύρωση μίας βιοαναλυτικής μεθόδου είναι το σύνολο των διαδικασιών που ως στόχο έχουν να παρουσιάσουν και να αποδείξουν την καταλληλότητα της μεθόδου αυτής για τον σκοπό που αναπτύχθηκε και προορίζεται (*“fit for its intended purpose”*). Ως αποτέλεσμα της επιτυχούς εφαρμογής της εξάγονται αντικειμενικά στοιχεία, τα οποία καταδεικνύουν ότι η μέθοδος είναι ικανή να εκτελεστεί με επιτυχία στο επίπεδο της προβλεπόμενης χρήσης της και ότι προσδιορίζει τους περιορισμούς της μεθόδου υπό κανονικές συνθήκες λειτουργίας. [58],[62]

Ο ορισμός αυτός βρίσκεται πολύ κοντά σε αυτόν που παρατίθεται στον οδηγό της EURACHEM περί καταλληλότητας των αναλυτικών μεθόδων. [64]

Ένας άλλος ορισμός είναι αυτός που αναφέρεται στο Διεθνές Λεξιλόγιο Μετρολογίας [87] και σύμφωνα με το οποίο ο όρος επικύρωση αναφέρεται ως επαλήθευση ότι οι συγκεκριμένες απαιτήσεις είναι κατάλληλες για μία προοριζόμενη χρήση. Ο όρος επαλήθευση με τη σειρά του προσδιορίζεται ως η παροχή αντικειμενικών τεκμηρίων για την ικανοποίηση προδιαγεγραμμένων απαιτήσεων δεδομένου αντικειμένου. Στον όρο *“αντικείμενο”* περιλαμβάνονται και οι διαδικασίες μέτρησης.

Ο ορισμός αυτός εμφανίζεται και στην τελευταία έκδοση του ISO/IEC 17025:(2017), που αφορά στις γενικές απαιτήσεις για την ικανότητα των εργαστηρίων δοκιμών και διακριβώσεων. [88]

Η επικύρωση λοιπόν μίας βιοαναλυτικής μεθόδου αποδεικνύει ότι η βελτιστοποιημένη μέθοδος είναι κατάλληλη για την ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων/δειγμάτων μελέτης. [59] Αποτελεί ένα ουσιαστικό στάδιο στην εξέλιξη μιας μεθόδου, από την ανάπτυξη της, στην αποδοχή και εφαρμογή της για κανονιστικούς/ρυθμιστικούς σκοπούς. [89]

Η επικύρωση μιας βιοαναλυτικής μεθόδου συνήθως εκτελείται με εμβολιασμό λευκών δειγμάτων (*blank samples*) ούρων, πλάσματος αίματος, ιστών κ.ά.. [65]

2.7.3 Κατηγορίες επικύρωση

2.7.3.1 Πλήρης επικύρωση

Για μία χρωματογραφική μέθοδο μία πλήρης επικύρωση θα πρέπει να περιλαμβάνει τα ακόλουθα στοιχεία: εκλεκτικότητα (*selectivity*), ειδικότητα (*specificity*) - εάν απαιτείται, φαινόμενα καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού (*matrix effect*), καμπύλη βαθμονόμησης (*calibration curve*)/συνάρτηση απόκρισης (*response function*), εύρος - από το κατώτερο έως το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*range - lower limit of quantification (LLOQ) to upper limit of quantification (ULOQ)*), ορθότητα (*accuracy*), πιστότητα (*precision*), φαινόμενο επιμόλυνσης (*carry-over*), ακεραιότητα αραιώσης (*dilution integrity*), σταθερότητα (*stability*) και επαναληψιμότητα έγχυσης (*reInjection reproducibility*). [58]

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να είναι το ίδιο με το υπόστρωμα των υπό εξέταση δειγμάτων, συμπεριλαμβάνοντας αντιπηκτικούς παράγοντες και πρόσθετα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να είναι δύσκολο να ληφθεί ίδιο υπόστρωμα με εκείνο των δειγμάτων μελέτης (π.χ. σπάνια υποστρώματα, όπως ιστός, εγκεφαλονωτιαίο υγρό, χολή, γαστρικό και υδατοειδές υγρό) και για την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου μπορεί να γίνει αποδεκτή η υποκατάστασή της με άλλη. Το υποκατάστατο υπόστρωμα πρέπει να επιλέγεται και να αιτιολογείται επιστημονικά πριν τη χρήση του στην αναλυτική μέθοδο. [58]

Μια συγκεκριμένη και λεπτομερής, γραπτή περιγραφή της βιοαναλυτικής μεθόδου πρέπει να καθορίζεται εκ των προτέρων. Αυτή η περιγραφή μπορεί να έχει τη μορφή πρωτοκόλλου, σχεδίου μελέτης, έκθεσης ή Τυπικής Διαδικασίας Λειτουργίας (*Standard Operating Procedure, SOP*). [58]

2.7.3.2 Μερική επικύρωση

Η τροποποίηση μίας πλήρως επικυρωμένης μεθόδου μπορεί να αξιολογηθεί μέσω της μερικής επικύρωσης. Αυτή η επικύρωση μπορεί να κυμαίνεται από τον προσδιορισμό της ορθότητας και της ποιότητας, μέχρι και μία σχεδόν πλήρη επικύρωση. Τα στοιχεία αυτά προσδιορίζονται σύμφωνα με την έκταση και τη φύση των αλλαγών στη μέθοδο. [58]

2.7.3.3 Διασταυρούμενη επικύρωση

Όταν τα δεδομένα λαμβάνονται από διαφορετικές μεθόδους εντός της ίδιας μελέτης ή μεταξύ μελετών, ή όταν λαμβάνονται σε μια μελέτη από διαφορετικά εργαστήρια, τα οποία εφαρμόζουν την ίδια μέθοδο, απαιτείται σύγκριση αυτών των δεδομένων και πρέπει να πραγματοποιείται διασταυρούμενη επικύρωση των εφαρμοσμένων αναλυτικών μεθόδων. [58]

2.7.4 Κατασκευή πλάνου επικύρωσης

Πριν ξεκινήσουν τα πειράματα επικύρωσης θα πρέπει να καταστρώνεται ένα κατάλληλο πλάνο για τη διεξαγωγή τους. Στο πλάνο αυτό θα πρέπει να περιλαμβάνονται το χρησιμοποιούμενο αναλυτικό όργανο και οι τεχνικές προκατεργασίας των δειγμάτων. Επιπλέον θα πρέπει να καταγράφονται οι απαιτήσεις επικύρωσης της μεθόδου, καθώς και τα όρια της μεθόδου, που την καθιστούν κατάλληλη για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. Το πλάνο επικύρωσης παρέχει οδηγίες για τα πειράματα που πρόκειται να διεξαχθούν και τα κριτήρια επίδοσης κάθε εξεταζόμενης παραμέτρου. [63]

2.8 Διαδικασία επικύρωσης χρωματογραφικών τεχνικών (πλήρης)

2.8.1 Κρίσιμα αντιδραστήρια

2.8.1.1 Υλικά αναφοράς

Κατά τη διάρκεια της επικύρωσης και της ανάλυσης άγνωστων δειγμάτων/δειγμάτων μελέτης (στο εξής δείγματα), λευκά δείγματα υποστρώματος εμβολιάζονται με τον αναλύτη στόχο, για την παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων βαθμονόμησης (*Calibration standards*), διαλυμάτων ελέγχου ποιότητας (*QCs*) και διαλυμάτων ελέγχου σταθερότητας (*stability QCs*). Ο εμβολιασμός πραγματοποιείται με τη χρήση υλικών αναφοράς (*reference standards*). Η καθαρότητα των υλικών αυτών αποτελεί έναν βασικό παράγοντα, που μπορεί να επηρεάσει τα δεδομένα της ανάλυσης και κατά συνέπεια για την παρασκευή διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων συνιστάται - απαιτείται η χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς γνωστής ταυτότητας και καθαρότητας. [58],[59]

Ως αναλυτέα ουσία νοείται η ουσία που πρέπει να ανιχνευθεί, να ταυτοποιηθεί ή/και να προσδιοριστεί ποσοτικά καθώς και τα παράγωγά της που σχηματίζονται κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. [90],[91]

Επίσης χρησιμοποιείται και ο όρος αναλύτης στόχος.

Ως υλικό αναφοράς νοείται το υλικό του οποίου μία ή περισσότερες ιδιότητες έχουν επιβεβαιωθεί με μία επικυρωμένη μέθοδο, έτσι ώστε αυτό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη βαθμονόμηση συσκευής ή για την επαλήθευση μιας μεθόδου μέτρησης. [90],[91]

Ως πιστοποιημένο υλικό αναφοράς (*Certified Reference Material, CRM*) νοείται ένα υλικό στο οποίο έχει αποδοθεί συγκεκριμένη περιεκτικότητα στην ή στις προς ανάλυση ουσία -ες. [90],[91]

Τα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης και τα διαλύματα ελέγχου θα πρέπει να παρασκευάζονται από διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης ή και από τα ίδια, υπό την προϋπόθεση ότι έχει επαληθευθεί η ακρίβεια και η σταθερότητά τους. Σε όλα τα διαλύματα βαθμονόμησης και ελέγχου, καθώς και σε όλα τα δείγματα θα πρέπει να προστίθενται κατάλληλα εσωτερικά πρότυπα. [58]

Ως εσωτερικό πρότυπο (*Internal Standard, IS*) νοείται μία ουσία που δεν περιέχεται στο δείγμα, με φυσικές-χημικές ιδιότητες όσο το δυνατόν παρόμοιες με εκείνες της αναλυτέας ουσίας, που πρέπει να ταυτοποιηθεί και η οποία προστίθεται σε κάθε δείγμα καθώς και σε κάθε πρότυπο βαθμονόμησης. [90],[91]

Κατάλληλα υλικά αναφορά αποτελούν τα συγκριτικά πρότυπα, εμπορικά διαθέσιμα πρότυπα, επαρκώς χαρακτηρισμένα *in-house* πρότυπα ή πρότυπα που παρέχονται από εξωτερικούς μη εμπορικούς οργανισμούς. Σε κάθε περίπτωση απαιτείται η ύπαρξη πιστοποιητικού ανάλυσης (*Certificate of Analysis, CoA*) ή ισοδύναμου εγγράφου, το οποίο να παρέχει και να διασφαλίζει απαραίτητες πληροφορίες για το υλικό αναφοράς, όπως την καθαρότητά του, τις συνθήκες αποθήκευσής του, την ημερομηνία επανελέγχου ή λήξης του και τον αριθμό παρτίδας του (*lot number*). [58],[59]

Για τα εσωτερικά πρότυπα δεν απαιτείται παροχή πιστοποιητικού ανάλυσης ή απόδειξης καθαρότητας του, εφόσον αποδεικνύεται ότι είναι κατάλληλο για τη χρήση του (π.χ. τόσο το κύριο - επισημασμένο μόριο, όσο και τυχόν υπάρχουσες προσμείξεις δεν παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό του αναλύτη). [58],[59]

Τα εσωτερικά πρότυπα συχνά χρησιμοποιούνται για να ελαχιστοποιήσουν πιθανά προβλήματα εκχύλισης του αναλύτη στόχου (μπορεί να ποικίλουν από αναλύτη σε αναλύτη) και να περιορίσουν την έκταση της ιοντικής καταστολής (όταν χρησιμοποιούνται εσωτερικά πρότυπα επισημασμένα με ισότοπα, *isotopically labeled internal standards, ILIS*). Αυτό επιτυγχάνεται κανονικοποιώντας τις ανακτήσεις του αναλύτη στόχου για αυτές τις δύο διαδικασίες. Έτσι βελτιώνουν την επαναληψιμότητα και την ανάκτηση της μεθόδου και κατά συνέπεια τη γραμμικότητά της. [3],[61],[92]

Στις περιπτώσεις όπου για την ανίχνευση του αναλύτη χρησιμοποιείται η τεχνική της φασματομετρίας μάζας, και ειδικά στην περίπτωση της τεχνικής *LC-MS/MS* [3], συνιστάται εφόσον είναι εφικτή η χρήση ως εσωτερικού προτύπου του σταθερού, επισημασμένου με ισότοπα αναλύτη. Είναι σημαντικό ωστόσο το επισημασμένο πρότυπο να είναι υψηλής ισοτοπικής καθαρότητας και να μην λαμβάνουν χώρα αντιδράσεις ανταλλαγής ισωτόπων. [58]

Τα διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας μπορούν να παρασκευάζονται μόνο από υλικά αναφοράς, που βρίσκονται εντός της βεβαιωμένης περιόδου σταθερότητάς τους, όπως βεβαιώνεται από το σχετικό πιστοποιητικό ανάλυσής τους, είτε πρόκειται για ημερομηνία λήξης, είτε επανεξέτασης. [58]

2.8.1.2 Δείγματα ελέγχου ποιότητας

Τα δείγματα ελέγχου ποιότητας προορίζονται να μιμηθούν τα δείγματα (μελέτης/άγνωστα δείγματα) και θα πρέπει να προκύπτουν με εμβολιασμό του υποστρώματος με γνωστή ποσότητα αναλύτη, να αποθηκεύονται υπό τις ίδιες συνθήκες με τα δείγματα και να αναλύονται, προκειμένου να αξιολογείται η εγκυρότητα της αναλυτικής μεθόδου. [58] Επιπλέον θα πρέπει να είναι φρέσκα - πρόσφατα παρασκευασμένα τουλάχιστον για έναν και ιδανικά για κάθε αναλυτικό γύρο εκτίμησης της ορθότητας και της επαναληψιμότητας. [59]

Τα διαλύματα βαθμονόμησης και τα δείγματα ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να παρασκευάζονται από διαφορετικά διαλύματα παρακαταθήκης, ώστε να αποφεύγονται ανακριβείς εκτιμήσεις που δεν σχετίζονται με την αναλυτική επίδοση της μεθόδου. Κοινή προέλευση ωστόσο μπορούν να έχουν υπό την προϋπόθεση ότι έχει πιστοποιηθεί η ορθότητα και η σταθερότητα των διαλυμάτων παρακαταθήκης. Επίσης δύναται να χρησιμοποιηθεί μία πηγή ως υπόστρωμα, η οποία θα πρέπει να είναι ελεύθερη παρεμποδισμών και συγγενών φαινομένων επίδρασης (βλ. §2.8.9 & 2.8.15).

Κατά τη διάρκεια της επικύρωσης τα δείγματα ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να παρασκευάζονται σύμφωνα με το σχέδιο της εναρμονισμένης οδηγίας του *ICH* [58] σε τουλάχιστον τέσσερα (4) επίπεδα συγκεντρώσεων εντός του εύρους της καμπύλης

βαθμονόμησης και συγκεκριμένα στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*), στο τριπλάσιο αυτού (χαμηλό *QC*), περίπου στο 30 - 50% του εύρους (ενδιάμεσο *QC*) και στο 75% του ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης, *ULOQ* (υψηλό *QC*). Αντίστοιχες είναι και οι απαιτήσεις της Ευρωπαϊκής Οδηγίας ([60]), της Οδηγίας του *FDA* ([59]) και του προτύπου *ANSI/ASB Standard 036* ([63]).

2.8.2 Καμπύλη βαθμονόμησης και εύρος ποσοτικοποίησης

Στο στάδιο της ανάπτυξης μιας μεθόδου θα πρέπει να επιλεγεί το εύρος βαθμονόμησης - ποσοτικοποίησης της δοκιμής και οι συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης, με βάση την αναμενόμενη περιοχή συγκεντρώσεων για τη συγκεκριμένη εφαρμογή. [59]

Ως καμπύλη βαθμονόμησης ή πρότυπη καμπύλη νοείται η γραφική παράσταση, που απεικονίζει τη συσχέτιση μεταξύ της απόκρισης ενός οργάνου (π.χ. εμβαδό κορυφής, ύψος ή σήμα) με τη συγκέντρωση (ποσότητα) ενός αναλύτη στο δείγμα εντός ενός καθορισμένου εύρους (αποκρίσεων και συγκεντρώσεων). [58]

Μία καμπύλη βαθμονόμησης λοιπόν δείχνει την απόκριση μιας αναλυτικής μεθόδου σε γνωστές ποσότητες του αναλύτη. [93]

Για την κατασκευή της χρησιμοποιούνται πρότυπα διαλύματα (βαθμονόμησης), τα οποία θα πρέπει να παρασκευάζονται εμβολιάζοντας το ίδιο βιολογικό υπόστρωμα με αυτό των δειγμάτων ελέγχου. Τα διαλύματα βαθμονόμησης χτίζουν την καμπύλη βαθμονόμησης και καθορίζουν το εύρος της. Το εύρος αυτό προσδιορίζεται από το κατώτερο και ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ* και *ULOQ*), τα οποία αποτελούν το χαμηλότερο και υψηλότερο διάλυμα βαθμονόμησης αντίστοιχα.

Ως εύρος βαθμονόμησης / ποσοτικοποίησης ορίζεται το διάστημα μεταξύ της κατώτερης και της ανώτερης συγκέντρωσης (τις περιλαμβάνει) ενός αναλύτη σε ένα δείγμα, για το οποίο έχει αποδειχθεί ότι η αναλυτική διαδικασία ικανοποιεί τις απαιτήσεις για την πιστότητα, την ορθότητα και τη συνάρτηση απόκρισης. [58]

Όταν η μέθοδος επικυρωθεί, η καμπύλη βαθμονόμησης θα πρέπει να είναι συνεχή και επαναλήψιμη. [59] Για κάθε αναλύτη στόχο θα πρέπει να υπάρχει μια καμπύλη βαθμονόμησης τόσο κατά τη διαδικασία επικύρωσης, όσο και σε κάθε αναλυτικό γύρο. [58]

2.8.2.1 Κατασκευή καμπύλης βαθμονόμησης

Αν και υπάρχει γενική συμφωνία ως προς το ότι τα πρότυπα βαθμονόμησης θα πρέπει να παρασκευάζονται από λευκό δείγμα και τα επίπεδα συγκεντρώσεων θα πρέπει να καλύπτουν το εύρος βαθμονόμησης, οι συστάσεις ως προς τον αριθμό των επιπέδων συγκέντρωσης που θα μελετηθούν και ο αριθμός των επαναλήψεων ανά επίπεδο διαφέρουν σημαντικά. [66]

Η κατασκευή μίας καμπύλης βαθμονόμησης θα πρέπει να περιλαμβάνει ένα λευκό δείγμα, ένα μηδενικό δείγμα (λευκό δείγμα εμβολιασμένο με εσωτερικό πρότυπο) και τουλάχιστον έξι (6) πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης (*Calibration standards*) σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων συμπεριλαμβανομένου του κατώτερου και ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (*LLOQ* και *ULOQ*). Τα πρότυπα θα πρέπει να κατανέμονται εντός του εύρους βαθμονόμησης έτσι, ώστε να προσεγγιστεί το βέλτιστο μοντέλο βαθμονόμησης. [58],[59],[62],[63]

Κάθε πρότυπο βαθμονόμησης μπορεί να αναλύεται σε επαναλήψεις (*replicates*), οπότε τα αποδεκτά δεδομένα των επαναλήψεων θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη διαδικασία της παλινδρόμησης. [58] Γενικά συνιστάται η χρήση λιγότερων επιπέδων συγκέντρωσης με εφαρμογή πολλών επαναλήψεων, παρά το αντίθετο. [67]

Η επιλογή του μοντέλου θα πρέπει να καθοδηγείται από γραπτές διαδικασίες. Το λευκό και το μηδενικό δείγμα δεν θα πρέπει να περιλαμβάνονται στον προσδιορισμό της εξίσωσης παλινδρόμησης. [58]

Για την εφαρμογή της διαδικασίας παλινδρόμησης και την επιλογή του μοντέλου βαθμονόμησης απαιτούνται τουλάχιστον πέντε (5) επαναλήψεις ανά επίπεδο συγκέντρωσης. Οι επαναλήψεις αυτές θα πρέπει να προέρχονται από διαφορετικούς αναλυτικούς γύρους. Όλα τα δεδομένα από τους πέντε αναλυτικούς γύρους θα πρέπει απεικονιστούν μαζί, προκειμένου να καθοριστεί το μοντέλο βαθμονόμησης. [62],[63]

2.8.2.2 Μοντέλο βαθμονόμησης

Για την ανάπτυξη, επικύρωση και εφαρμογή βιοαναλυτικών μεθόδων βασισμένων στην υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά (*LC-MS/MS*), η επιλογή μίας κατάλληλης, σαφώς καθορισμένης και ερμηνευμένης καμπύλης βαθμονόμησης είναι καίριας σημασίας για την αποδοτικότητα της μεθόδου, τη βελτιστοποιημένη ποσοτικοποίηση και τη διασφάλιση της ποιότητας και της αξιοπιστίας των αποτελεσμάτων. [66],[67],[94]

Για το σκοπό αυτό θα πρέπει να διερευνηθεί η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη στόχου σε ένα δείγμα και το αντίστοιχο σήμα - απόκριση του ανιχνευτή του αναλυτικού οργάνου (στις βιοαναλυτικές μεθόδους χρησιμοποιείται κυρίως ο λόγος του εμβαδού της κορυφής του αναλύτη προς το εμβαδό του εσωτερικού προτύπου [67]). Σε αυτό στοχεύει η ανάλυση των προτύπων βαθμονόμησης και η γραφική τους απεικόνιση. Η προκύπτουσα πρότυπη καμπύλη μπορεί εν συνεχεία να αξιολογηθεί με γραφικές ή μαθηματικές μεθόδους, με τις τελευταίες να παρέχουν τη δυνατότητα στατιστικής αξιολόγησης της συνάρτησης απόκρισης. [66]

Κατά την επικύρωση της μεθόδου θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί ένα απλό μοντέλο παλινδρόμησης, το οποίο να περιγράφει τη σχέση συγκέντρωσης του αναλύτη και απόκρισης του ανιχνευτή, και να προσδιορίζεται ένα κατάλληλο σχήμα στάθμισης και η συνάρτηση απόκρισης. [58],[59] Συνεπώς, η επιλογή του κατάλληλου μοντέλου παλινδρόμησης κατά το στάδιο της ανάπτυξης και της επικύρωσής της μεθόδου είναι

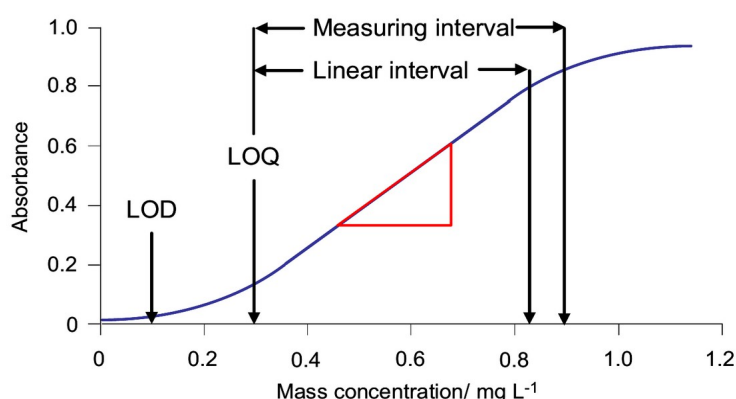
κρίσιμη για την ομαλή μετάβαση από την επικύρωση στην ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων, από αναλυτή σε αναλυτή και από εργαστήριο σε εργαστήριο. [94]

Συνήθως προτιμώνται τα γραμμικά μοντέλα, υπάρχουν όμως περιπτώσεις, όπου η χρήση μη γραμμικών μοντέλων δεν είναι απλά αποδεκτή, αλλά επιπλέον συνιστάται. Ωστόσο για την αξιολόγηση των μη γραμμικών μοντέλων έναντι των γραμμικών απαιτούνται περισσότερα επίπεδα συγκέντρωσης. [66] Τα δύο πιο συχνά χρησιμοποιούμενα μοντέλα σε μεθόδους LC-MS/MS είναι το γραμμικό μοντέλο και το μοντέλο δευτέρου βαθμού χρησιμοποιώντας μη σταθμισμένη ή σταθμισμένη μέθοδο ελαχίστων τετραγώνων. [62], [63],[94]

2.8.2.3 Κριτήρια αποδοχής καμπύλης βαθμονόμησης

Μετά τον υπολογισμό μιας καμπύλης βαθμονόμησης θα πρέπει να αναφέρονται οι αντίστοιχες παράμετροι (b : κλίση και a : τομή της με τον άξονα των τεταγμένων ή άξονα των y στην περίπτωση του γραμμικού μοντέλου, $y = bx + a$), να παρουσιάζονται οι αναδρομικά υπολογισμένες συγκεντρώσεις των προτύπων (*back-calculated concentrations*) μαζί με τις μέσες τιμές ορθότητας και να αξιολογούνται. Θα πρέπει να αναφέρονται επίσης όλες οι αποδεκτές καμπύλες βαθμονόμησης, που κατασκευάστηκαν κατά τη διάρκεια της επικύρωσης και βασίστηκαν σε τουλάχιστον τρεις (3) διακριτούς αναλυτικούς γύρους διαφορετικών ημερών.

Η ορθότητα των αναδρομικά υπολογισμένων συγκεντρώσεων κάθε προτύπου βαθμονόμησης θα πρέπει να βρίσκεται εντός του $\pm 20\%$ της ονομαστικής του συγκέντρωσης στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) και εντός του $\pm 15\%$ σε όλα τα άλλα επίπεδα συγκεντρώσεων. Το κριτήριο αυτό θα πρέπει να πληρείται τουλάχιστον για το 75% των προτύπων βαθμονόμησης από ένα σύνολο τουλάχιστον έξι (6) επιπέδων. [58],[59]



Σχήμα 2.1: Διάγραμμα βαθμονόμησης, το οποίο παρουσιάζει την απορρόφηση συναρτήσει της συγκέντρωσης του αναλύτη. Απεικονίζονται το εύρος μέτρησης, το γραμμικό εύρος, το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) και το όριο ανίχνευσης (LOD). Το σχεδιασμένο κόκκινο τρίγωνο απεικονίζει τον υπολογισμό της εδαισθησίας ή της κλίσης της καμπύλης βαθμονόμησης. [90]

Στην περίπτωση κατά την οποία πραγματοποιούνται επαναληπτικές μετρήσεις (*replicates*) τα παραπάνω όρια αποδοχής της ορθότητας (εντός του $\pm 15\%$ και $\pm 20\%$ για το *LLOQ*) θα πρέπει να ικανοποιούνται για το 50% των προτύπων βαθμονόμησης που αναλύθηκαν σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Εάν ένα πρότυπο βαθμονόμησης δεν ικανοποιεί το κριτήριο αυτό, το αντίστοιχο διάλυμα θα πρέπει να απορρίπτονται και η καμπύλη βαθμονόμησης να προσδιορίζεται εκ νέου, συμπεριλαμβάνοντας και την ανάλυση παλινδρόμησης. Στους αναλυτικούς γύρους από τους οποίους προσδιορίζονται η ορθότητα και η πιστότητα, εάν όλες οι επαναληπτικές μετρήσεις (*replicates*) των προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης στο κατώτερο ή το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης σε έναν αναλυτικό γύρο απορριφθούν, τότε και ο αναλυτικός γύρος εν συνόλω θα πρέπει να απορριφθεί, να αναζητηθούν τα αίτια της αστοχίας και εάν κριθεί απαραίτητο η μέθοδος να αναθεωρηθεί. Εάν δε και στον επόμενο αναλυτικό γύρο κατά την επικύρωση παρουσιαστεί ξανά τέτοια αστοχία, τότε η μέθοδος θα πρέπει να αναθεωρηθεί προτού συνεχιστεί η επικύρωση. [58],[60]

Η καμπύλη βαθμονόμησης θα πρέπει να κατασκευάζεται από πρόσφατα - φρέσκα εμβολιασμένα διαλύματα βαθμονόμησης σε έναν τουλάχιστον προσδιορισμό, ενώ μπορούν να χρησιμοποιούνται και κατεψυγμένα διαλύματα εντός του επιβεβαιωμένου χρόνου ζωής τους. [58]

2.8.3 Ακρίβεια, Ορθότητα & πιστότητα

Οι επιστήμονες ενδιαφέρονται για την ποιότητα (εγγύτητα μετρούμενης ως προς την αληθή τιμή) των αναλυτικών αποτελεσμάτων που παράγουν. Κατά την εκτέλεση ενός πειραματικού προσδιορισμού ωστόσο, το αποτέλεσμα μιας μέτρησης δεν αναμένεται εν γένει να συμπέσει απόλυτα με την αποδεκτή τιμή αναφοράς του αναλύτη στόχου, ενώ η επανάληψη της μέτρησης οδηγεί γενικά σε διαφορετικά μεταξύ τους αποτελέσματα. [96] Τα δύο αυτά φαινόμενα οφείλονται στην εμφάνιση σφαλμάτων κατά τη δειγματοληψία, την εκτέλεση των δοκιμών ή/και κατά την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Οι πηγές των σφαλμάτων μπορεί να είναι πολλές και διακριτές. Τα σφάλματα των μετρήσεων λοιπόν, διακρίνονται σε δύο βασικές κατηγορίες, στα συστηματικά και στα τυχαία. Μαζί συνθέτουν το συνολικό σφάλμα (*total error*). [92]

Τα συστηματικά σφάλματα παραμένουν αμετάβλητα σε διαδοχικές μετρήσεις ή μεταβάλλονται με συστηματικό τρόπο με το χρόνο ή κάποια άλλη παράμετρο και μεταξύ άλλων μπορεί να οφείλονται στον αναλυτή, στην εφαρμοζόμενη μέθοδο ή στο αναλυτικό όργανο. Τα συστηματικά σφάλματα τείνουν να μετατοπίσουν όλες τις μετρήσεις με συστηματικό τρόπο, ώστε η μέση τιμή τους να βρίσκεται μετατοπισμένη ως προς την αποδεκτή τιμή αναφοράς. Ο βασικότερος τρόπος ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των συστηματικών σφαλμάτων είναι η σύγκριση των μετρήσεων με αυτές άλλων οργάνων, τα οποία έχουν μεγαλύτερη ακρίβεια και διαπιστωμένα αμελητέα συστηματικά σφάλματα ή με αυτές άλλων μεθόδων. [96],[97]

Τα τυχαία σφάλματα είναι αναπόφευκτα. Μπορούν να οφείλονται σε πολλούς απρόβλεπτους παράγοντες (π.χ. έλλειψη ευαισθησίας της απόκρισης του αναλυτικού οργάνου ή εσφαλμένη ανάγνωση από τον αναλυτή), μεταβάλλονται χρονικά με ακανόνιστο τρόπο, είναι εξίσου πιθανό να είναι θετικά ή αρνητικά, ενώ μικρές αποκλίσεις από την αποδεκτή τιμή αναφοράς είναι πιο πιθανές απ' ό,τι μεγάλες. [96] Δείχνουν λοιπόν τις διακυμάνσεις που έχουν οι μετρήσεις ενός επαναλαμβανόμενου πειράματος, το οποίο διεξάγεται κάτω από τις ίδιες φαινομενικά συνθήκες και οδηγούν στην κανονική κατανομή των αποτελεσμάτων γύρω από μία μέση τιμή. [97]

Πολλές φορές ο διαχωρισμός μεταξύ συστηματικού και τυχαίου σφάλματος είναι δύσκολος, ενώ πολλά σφάλματα ενδέχεται να είναι συνδυασμός και των δύο τύπων. [97]

2.8.4 Ορθότητα

Προκειμένου να προσδιορίσουμε απολύτως ορθά τη συγκέντρωση ενός αναλύτη σε ένα δείγμα, θα έπρεπε να πραγματοποιήσουμε άπειρο αριθμό μετρήσεων, κάτι το οποίο είναι πρακτικά ανέφικτο. Εκτελώντας λοιπόν πεπερασμένο αριθμό μετρήσεων, εκτιμούμε στατιστικά την πραγματική τιμή μέσω της ορθότητας. [64],[92]

Ως ορθότητα (*trueness*) νοείται η εγγύτητα μεταξύ της τιμής του μέσου όρου που λαμβάνεται από μια μεγάλη σειρά αποτελεσμάτων δοκιμών και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. [87],[90],[91]

Η ορθότητα εκφράζεται και ποσοτικοποιείται συνήθως και ως συστηματικό σφάλμα (*μεροληψία*, *bias*). Ακριβέστερα η μεροληψία (*bias*) αποτελεί εκτιμήτρια του συστηματικού σφάλματος. [87],[90],[91],[92]

Ως συστηματικό σφάλμα (*bias*) νοείται η διαφορά μεταξύ του αναμενόμενου αποτελέσματος της δοκιμής και μιας αποδεκτής τιμής αναφοράς. [90],[91]

Το % (σχετικό) συστηματικό σφάλμα για ένα συγκεκριμένο επίπεδο συγκέντρωσης υπολογίζεται από τον τύπο 2:

$$\% \text{ ορθότητα} = \frac{\text{μέσος όρος μετρήσεων}}{\text{αποδεκτή τιμή αναφοράς}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\% \text{ Συστηματικό σφάλμα } C_x = \frac{\text{μέσος όρος μετρήσεων} - \text{αποδεκτή τιμή αναφοράς}}{\text{αποδεκτή τιμή αναφοράς}} \times 100\% \quad (2)$$

Αυτή η μεροληψία μπορεί να προκαλείται από επιμέρους συστηματικά σφάλματα, οφειλόμενα σε διαφορετικούς παράγοντες [66], συνεπάγοντας την υπό- ή υπερεκτίμηση της αποδεκτής τιμής αναφοράς.

Ο υπολογισμός της ορθότητας μίας μεθόδου ιδανικά γίνεται:

- × με την ανάλυση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς (CRMs), σε υπόστρωμα παρόμοιο με εκείνη του πεδίου στο οποίο πρόκειται να εφαρμοστεί η αναπτυσσόμενη μέθοδος. Η μέθοδος θα πρέπει να προσδιορίσει την πιστοποιημένη τιμή του αναλύτη στο υλικό αναφοράς, μέσα στα όρια της πιστότητας της μεθόδου. [93]
- × με σύγκριση αποτελεσμάτων από δύο ή περισσότερες πρότυπες αναλυτικές μεθόδους. Τα αποτελέσματα θα πρέπει να συμφωνούν μέσα στα όρια της αναμενόμενης πιστότητας. [93],[98]
- × με εμβολιασμό λευκού δείγματος με γνωστή ποσότητα του αναλύτη ενδιαφέροντος. Το υπόστρωμα θα πρέπει να είναι ίδια με εκείνο του πεδίου στο οποίο πρόκειται να εφαρμοστεί η αναπτυσσόμενη μέθοδος. [93]

Η τελευταία είναι η συνηθέστερη μέθοδος υπολογισμού της ορθότητας, καθώς πιστοποιημένα υλικά αναφοράς και πρότυπες αναλυτικές μέθοδοι δεν είναι πάντοτε διαθέσιμα. [93]

Το μετρούμενο συστηματικό σφάλμα οφείλεται κυρίως στα αναλυτικά όργανα ή στις αναλυτικές διαδικασίες και συνήθως δεν εξαλείφεται αυξάνοντας το πλήθος των μετρήσεων, καθώς όλες τους μεροληπτούν συστηματικά έναντι της αποδεκτής τιμής αναφοράς. [99]

2.8.4.1 Η ορθότητα σε βιοαναλυτικές μεθόδους LC-MS

Τα βασικά αίτια εμφάνισης συστηματικών σφαλμάτων σε μεθόδους υγρής χρωματογραφίας συζευγμένης με ανιχνευτές φασματομετρίας μάζας (LC-MS και LC-MS/MS) είναι τα ακόλουθα [92]:

- i. συστηματικά σφάλματα οφειλόμενα στην προκατεργασία του δείγματος, τα οποία εκφράζονται ποσοτικά με την ανάκτηση (βλ. §2.8.9)
- ii. συστηματικά σφάλματα οφειλόμενα στην αστάθεια του αναλύτη στο υπόστρωμα (βλ. §2.8.17)
- iii. συστηματικά σφάλματα λόγω καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού (βλ. §2.8.15)
- iv. συστηματικά σφάλματα οφειλόμενα σε άλλους παράγοντες, όπως η καθαρότητα των πρότυπων ουσιών, η βαθμονόμησης, ο ογκομετρικός εξοπλισμός, οι αναλυτικοί ζυγοί κ.ά.

2.8.5 Πιστότητα

Το τυχαίο σφάλμα (*random error*) ονομάζεται και διακύμανση μιας μεταβλητής (*variability/variance*) ή των μετρήσεων ενός μεγέθους. Συνήθως δε, ορίζεται ποιοτικά ως το αντίθετο της και συγκεκριμένα ως “πιστότητα” (*precision*), όρος αναφερόμενος στην απουσία τυχαίου σφάλματος. [99]

Ως πιστότητα (*precision*) νοείται η εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών υπό ρητά καθορισμένες (προκαθορισμένες) συνθήκες. [87]

Το μέτρο της πιστότητας εκφράζεται συνήθως με όρους μη πιστότητας και υπολογίζεται ως τυπική απόκλιση, διακύμανση ή συντελεστής διακύμανσης του αποτελέσματος της δοκιμής. Μικρότερη πιστότητα προσδιορίζεται με μια μεγαλύτερη τυπική απόκλιση. [87],[90],[91]

Εκφρασμένη ως επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (*Relative Standard Deviation, RSD*) ή ως συντελεστής διακύμανσης (*Coefficient of Variation, %CV*) υπολογίζεται από τον τύπο:

$$\%RSD \text{ ή } \%CV = \frac{\text{τυπική απόκλιση}}{\text{μέση τιμή}} \times 100\% \quad (3)$$

Εν αντιθέσει με την ορθότητα, το μέγεθός της πιστότητας εξαρτάται μόνο από τις παρατηρούμενες μετρήσεις (αποτελέσματα) και είναι εντελώς ανεξάρτητο από την αποδεκτή τιμή αναφοράς. [99] Έτσι, η πιστότητα είναι ένα μέτρο της στατιστικής διακύμανσης των μετρήσεων και συνήθως προσδιορίζεται αριθμητικά σαν “μη πιστότητα” (*imprecision*), εκφρασμένη ως απόλυτη ή σχετική τυπική απόκλιση. [62],[66],[99]

Στους ποσοτικούς προσδιορισμούς η πιστότητα αποκτά αριθμητική υπόσταση, οφειλόμενη στις διακυμάνσεις που προκαλούν κυρίως τα αναλυτικά όργανα, οι αναλυτές, οι αναλυτικές διαδικασίες και τα ίδια τα δείγματα. [99]

Ανάλογα με την έκταση της μεταβλητότητας της πειραματικής διαδικασίας υπάρχουν τρεις κύριες κατηγορίες πιστότητας, η επαναληψιμότητα, η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα.

Ως επαναληψιμότητα (*repeatability*) νοείται η πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας. Ο όρος αναφέρεται στην πιστότητα εντός αναλυτικού γύρου (*within-run / within-day precision*). [66]

Ως συνθήκες επαναληψιμότητας (*repeatability conditions*) νοούνται οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα ανεξάρτητων δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων δοκιμών στο ίδιο εργαστήριο, με τον ίδιο χειριστή που χρησιμοποιεί τον ίδιο εξοπλισμό. [90],[91]

Ως ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (*within-laboratory reproducibility*) νοείται η πιστότητα στο ίδιο εργαστήριο υπό ρητώς καθορισμένες (προκαθορισμένες) συνθήκες (σχετικά π.χ. με μία μέθοδο, τα υλικά δοκιμής, τους χειριστές, το περιβάλλον) σε δικαιολογημένα μεγάλα χρονικά

διαστήματα. [90],[91] Ο όρος αναφέρεται στην πιστότητα μεταξύ διαφορετικών αναλυτικών γύρων (*between-run / between-day precision*). [66]

Ως αναπαραγωγιμότητα (*reproducibility*) νοείται η πιστότητα υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας. [90],[91]

Ως συνθήκες αναπαραγωγιμότητας (*reproducibility conditions*) νοούνται οι συνθήκες υπό τις οποίες τα αποτελέσματα δοκιμών αποκτώνται με την ίδια μέθοδο επί ταυτόσημων τεμαχίων δοκιμής σε διαφορετικά εργαστήρια με διαφορετικούς χειριστές που χρησιμοποιούν διαφορετικό εξοπλισμό. [90],[91]

Υπάρχει μία ειδοποιός διαφορά μεταξύ ορθότητας και πιστότητας: Η εξάλειψη του συστηματικού σφάλματος είναι δυνητικά εφικτή (στο βαθμό που οι παράγοντες που το δημιουργούν έχουν εντοπιστεί και έχει δοθεί η δέουσα προσοχή). Εντούτοις, η τυπική απόκλιση και γενικότερα η διακύμανση στην επαναληψιμότητα και την αναπαραγωγιμότητα (γενικά στις επαναλαμβανόμενες μετρήσεις) αν και μπορούν να μειωθούν, δεν μπορούν να εξαλειφθούν πλήρως. [92]

2.8.6 Ακρίβεια

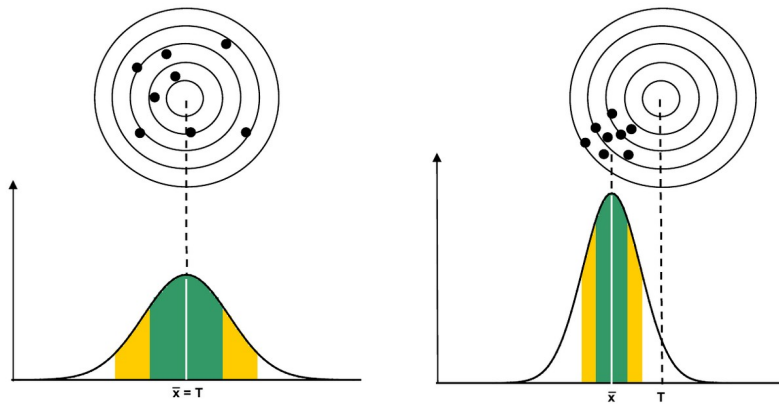
Η επικύρωση μίας μεθόδου επιδιώκει να διερευνήσει και να προσδιορίσει την ακρίβεια των παραγόμενων αποτελεσμάτων, αξιολογώντας τα συστηματικά και τα τυχαία σφάλματα των μεμονωμένων μετρήσεων. Ως διττή έννοια, η ακρίβεια μελετάται και με τις δύο υποστάσεις της, την ορθότητα και την πιστότητα. Ολοένα και πιο συχνά χρησιμοποιούμενος όρος αντί της *ακρίβειας* είναι η “*αβεβαιότητα μέτρησης*” (*measurement uncertainty*). [67]

Αν και δεν αποτελεί παράμετρο της επικύρωσης μπορεί να προσδιοριστεί κυρίως από τα δεδομένα ορθότητας και πιστότητας ή από τα παραγόμενα δεδομένα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας κατά την εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου. [67]

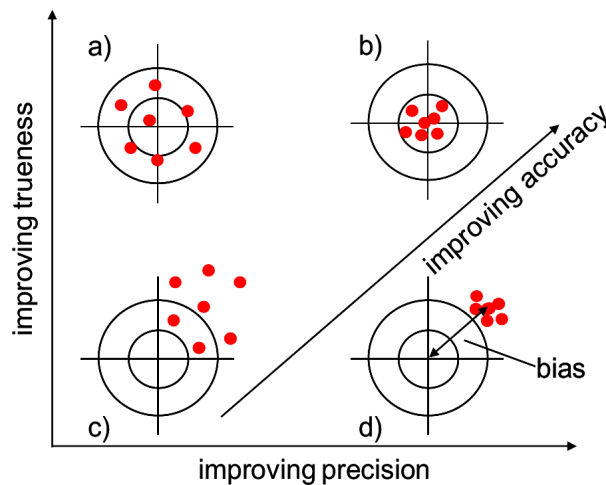
Συσχετίζοντας τα σφάλματα με τις ποιοτικές και ποσοτικές εκφράσεις τους, θα λέγαμε ότι η ορθότητα, η πιστότητα και η ακρίβεια αποτελούν την ποιοτική προσέγγιση των αντίστοιχων τύπων σφαλμάτων, ήτοι του συστηματικού, του τυχαίου και του ολικού σφάλματος και ποσοτικοποιούνται σε συστηματικό σφάλμα (*bias*), στατιστική μέτρηση της διασποράς των μετρήσεων και αβεβαιότητα αντίστοιχα. [64]

Όσο μικρότερη είναι η ορθότητα και η πιστότητα των μετρήσεων, τόσο μικρότερη είναι και η συνολική ικανότητά τους να παρέχουν ακριβείς εκτιμήσεις. [99]

Ως *ακρίβεια* (*accuracy*) νοείται η εγγύτητα μεταξύ του αποτελέσματος μιας δοκιμής και της αποδεκτής τιμής αναφοράς και προσδιορίζεται συνδυάζοντας την ορθότητα και την πιστότητα. [87],[90],[91],[99]



Σχήμα 2.2: Παράλληλισμός της κανονικής κατανομής (συνάρτηση πιθανότητας) μετρήσεων με την κατανομή ρίψεων σε πεδίο στόχο. Η μορφή της καμπύλης της κανονικής κατανομής εξαρτάται από τη διασπορά των μετρήσεων. Αριστερά οι ρίψεις κατανέμονται σε όλο το πεδίο του στόχου, οι μετρήσεις δηλαδή έχουν μεγάλη διασπορά και χαρακτηρίζονται από μικρή επαναληψιμότητα και πιστότητα, οπότε και η αντίστοιχη καμπύλη κατανομής είναι πιο ευρεία. Δεξιά ωστόσο, οι ρίψεις βρίσκονται συγκεντρωμένες σε μια περιοχή του πεδίου, οι μετρήσεις δηλαδή έχουν μικρή διασπορά και χαρακτηρίζονται από υψηλή επαναληψιμότητα και πιστότητα με συνέπεια η καμπύλη να είναι πιο οξεία. Η κορυφή της κατανομής αντιπροσωπεύει την ορθότητα της ανάλυσης. Στην αριστερή περίπτωση η μέση τιμή των μετρήσεων (\bar{x}) συμπίπτει με την αληθή τιμή (αποδεκτή τιμή αναφοράς, T), ενώ στη δεξιά τα αποτελέσματα είναι συστηματικά πολύ χαμηλά. Η ορθότητα υπολογίζεται ως συστηματικό σφάλμα, $\bar{x}-T$ ή ως σχετικό συστηματικό σφάλμα, $(\bar{x}-T)/T$. [97]



Σχήμα 2.3: Σχηματική απεικόνιση ακρίβειας, ορθότητας και πιστότητας σε πεδίο στόχου. Οι ρίψεις στο στόχο αντιπροσωπεύουν ανεξάρτητα αποτελέσματα μετρήσεων και η τιμή αναφοράς απεικονίζεται ως το κέντρο του στόχου. Η καλύτερη ακρίβεια (μικρότερη αβεβαιότητα μέτρησης) επιτυγχάνεται στην περίπτωση *b*, όπου όλες οι ανεξάρτητες μετρήσεις βρίσκονται κοντά στην τιμή αναφοράς. Στις περιπτώσεις *a* & *b* δεν παρουσιάζεται σημαντικό συστηματικό σφάλμα, καθώς όλες οι μετρήσεις βρίσκονται συγκεντρωμένες στο κέντρο του στόχου. Ωστόσο η πιστότητα είναι χαμηλότερη στην περίπτωση *a*, καθώς οι μετρήσεις είναι ευρύτερα διασπαρμένες. Η πιστότητα στην περίπτωση *d* είναι ίδια με αυτή της *b*, στην περίπτωση *d* όμως υπάρχει σημαντικό συστηματικό σφάλμα, καθώς όλες οι μετρήσεις βρίσκονται στην ίδια περιοχή μακριά από το κέντρο του στόχου. Η ακρίβεια είναι χαμηλότερη στην περίπτωση *c*, καθώς οι μετρήσεις έχουν ευρέως διασπαρεί στη δεξιά πλευρά του στόχου. [92]

Όπως και οι συνιστώσες της, έτσι και η ακρίβεια πέρα από την ποιοτική έχει και ποσοτική διάσταση. Πρόκειται για ευρύτερη έννοια, η οποία επηρεάζεται τόσο από συστηματικά, όσο και από τυχαία σφάλματα και έτσι εκφράζει πληρέστερα τη συνολική απόσταση μεταξύ της εκτιμώμενης - παρατηρούμενης τιμής και της πραγματικής τιμής⁶. Υπάρχουν διάφοροι μαθηματικοί ορισμοί αυτής της απόστασης, μερικοί εκ των οποίων συνδυάζουν ρητά την ορθότητα και την πιστότητα. [66],[99]

2.8.7 Εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας

Η εκτίμηση της ορθότητας και τη πιστότητας είναι καίριας σημασίας στο σύνολο του εύρους ποσοτικοποίησης της μεθόδου στο στάδιο της ανάπτυξής της, προκειμένου να διαπιστωθεί εάν η μέθοδος είναι κατάλληλη για επικύρωση. [59]

Η ορθότητα και η πιστότητα θα πρέπει να προσδιορίζονται αναλύοντας δείγματα ελέγχου ποιότητας, τόσο εντός κάθε αναλυτικού γύρου (*within-run*), όσο και μεταξύ διαφορετικών αναλυτικών γύρων (*between-run*). Τα μεγέθη θα πρέπει να αξιολογούνται χρησιμοποιώντας τους ίδιους (κοινούς) αναλυτικούς γύρους και δεδομένα. [58],[62],[63]

Και τα δύο αυτά χαρακτηριστικά επίδοσης είναι πιθανό να διαφέρουν σημαντικά εντός του εύρους βαθμονόμησης και συνεπώς είναι απαραίτητο να αξιολογούνται σε τουλάχιστον τρία (3) επίπεδα συγκεντρώσεων. [66]

Για να προσδιοριστούν οι εντός του ίδιου αναλυτικού γύρου ορθότητα και πιστότητα θα πρέπει να πραγματοποιούνται τουλάχιστον πέντε (5) επαναλήψεις σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης δείγματος ελέγχου ποιότητας (για κάθε αναλυτικό γύρο). [58] Η μεταξύ διαφορετικών αναλυτικών γύρων ορθότητα και πιστότητα θα πρέπει να προσδιορίζονται αναλύοντας κάθε επίπεδο συγκέντρωσης δείγματος ελέγχου ποιότητας σε τρεις (3) τουλάχιστον γύρους τουλάχιστον δύο (2) διαφορετικών ημερών. [58],[59]

Προκειμένου να εντοπιστούν και να αξιολογηθούν τυχόν τάσεις κατά τη χρονική εξέλιξη ενός αναλυτικού γύρου, συνιστάται η ορθότητα και η πιστότητα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας να εκτιμώνται σε τουλάχιστον έναν αναλυτικό γύρο, ο οποίος να έχει ισοδύναμο μέγεθος με αυτό των αναλυτικών γύρων που πρόκειται να περιλαμβάνουν τα άγνωστα δείγματα. Στα καταχωρισμένα δεδομένα επικύρωσης της μεθόδου και στον υπολογισμό της ορθότητας και της πιστότητας θα πρέπει να περιλαμβάνονται όλα τα αποτελέσματα που προέκυψαν, συμπεριλαμβανομένων και μεμονωμένων δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, τα οποία δεν πληρούν τα κριτήρια αποδοχής, εκτός από τις περιπτώσεις στις οποίες τα σφάλματα είναι προφανή και τεκμηριωμένα.

Τα δεδομένα των εν λόγω χαρακτηριστικών επίδοσης κάθε αναλυτικού γύρου θα πρέπει να υπολογίζονται και να αναφέρονται σε κάθε έναν από αυτούς. Εάν τα κριτήρια αποδοχής τους δεν ικανοποιούνται σε όλους τους αναλυτικούς γύρους, θα πρέπει να γίνεται μία συνολική εκτίμηση (από όλους τους αναλυτικούς γύρους) της εντός

6 Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι ο αγγλικός όρος "*accuracy*" χρησιμοποιείται συχνά για να περιγράψει μόνο το συστηματικό σφάλμα (*bias*), δηλαδή την ορθότητα. [66] Αυτό συμβαίνει και στα βασικά κείμενα επικύρωσης που αναλύονται εδώ ([58],[59],[60],[62],[63]) και ο όρος έχει μεταφραστεί ως ορθότητα.

αναλυτικού γύρου ορθότητας και πιστότητας για κάθε επίπεδο δείγματος ελέγχου ποιότητας. Η μεταξύ διαφορετικών αναλυτικών γύρων ορθότητα και πιστότητα θα πρέπει να υπολογίζονται συνδυάζοντας τα δεδομένα από όλους τους αναλυτικούς γύρους. [58]

Οι καμπύλες βαθμονόμησης για αυτούς τους προσδιορισμούς θα πρέπει να κατασκευάζονται χρησιμοποιώντας φρέσκα - πρόσφατα εμβολιασμένα διαλύματα βαθμονόμησης σε τουλάχιστον έναν αναλυτικό γύρο. Για όσους γύρους τα διαλύματα βαθμονόμησης δεν είναι πρόσφατα εμβολιασμένα, αλλά κατεψυγμένα, θα πρέπει να αποδεικνύεται η σταθερότητά τους.

2.8.8 Κριτήρια αποδοχής ορθότητας και πιστότητας

Όρια αποδοχής βάσει του σχεδίου της οδηγίας του *ICH* και των οδηγιών των *EMA & FDA* [58],[59],[60]: Συνολικά η ορθότητα για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να βρίσκεται εντός του $\pm 15\%$ της αντίστοιχης ονομαστικής συγκέντρωσης, εκτός από το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*), όπου θα πρέπει να βρίσκεται εντός του $\pm 20\%$. Αντίστοιχα, η πιστότητα (εκφρασμένη ως *%CV*) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 15%, εκτός από το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*), όπου δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 20%. [58]

Όρια αποδοχή βάσει προτύπου *ANSI/ASB Standard 036* [63]: Ανεξαρτήτως επιπέδου συγκέντρωσης για την ορθότητα (*bias*) $\pm 20\%$ (για ορισμένες μόνο αναλύσεις $\pm 10\%$) και αντίστοιχα για την πιστότητα έως 20%, εκφρασμένη ως *%CV* (για ορισμένες αναλύσεις έως 10%).

2.8.9 Ανάκτηση

Ο προσδιορισμός ενός αναλύτη σε βιολογικό υπόστρωμα, στις περισσότερες περιπτώσεις απαιτεί προκατεργασία (συνήθως κάποια τεχνική εκχύλισης) για την απομόνωση και εκλεκτική παραλαβή του. [101]

Σε αυτές τις περιπτώσεις προκύπτει μια διαφορά μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη στο αρχικό δείγμα και στο δείγμα που ανακτάται μετά την επεξεργασία. Η εκτίμηση και η ελαχιστοποίηση αυτής της διαφοράς είναι ένας σημαντικός παράγοντας, ο οποίος καθορίζει και την αξιοπιστία των μετρήσεων. [3],[74],[102] Πρόκειται για την ανάκτηση, ένα μέτρο της αποδοτικότητας με την οποία η αναλυτική μέθοδος εκχυλίζει - παραλαμβάνει ποσοτικά τον αναλύτη στόχο μέσα από τα στάδια προκατεργασίας των δειγμάτων. [61] Ως χαρακτηριστικό επίδοσης της αναπτυσσόμενης μεθόδου θα πρέπει να αξιολογείται σε περιπτώσεις στις οποίες η μέθοδος περιλαμβάνει και εκχύλιση του αναλύτη στόχου για την παραλαβή του από το δείγμα με χρήση κατάλληλων διαλυτών, προκειμένου να διευκρινιστούν πτυχές της φύσης της αναλυτικής μεθόδου. [58],[61] Η ελλιπής ανάκτηση του αναλύτη στόχου μπορεί να αποτελέσει αιτία συστηματικών σφαλμάτων. [98]

Ως ανάκτηση νοείται το ποσοστό της αληθούς συγκέντρωσης μιας ουσίας που ανακτάται κατά την αναλυτική διαδικασία. [90],[91]

$$\% \text{ ανάκτηση} = \frac{\text{ανακτηθείσα συγκέντρωση}}{\text{αληθής συγκέντρωση}} \times 100\% \quad (4)$$

Η ανάκτηση θεωρείται πλήρης (100%), όταν όλη η ποσότητα του αναλύτη στόχου μεταφερθεί από το δείγμα (αρχικό υπόστρωμα) στο προς μέτρηση τελικό διάλυμα. [85]

2.8.9.1 Προσδιορισμός της ανάκτησης

Η ανάκτηση μπορεί να προσδιοριστεί με έναν από τους ακόλουθους τρόπους:

- i. με σύγκριση των μετρήσεων που λαμβάνονται με την προς επικύρωση μέθοδο με τις μετρήσεις που λαμβάνονται χρησιμοποιώντας μια άλλη μέθοδο αναφοράς
- ii. με χρήση πιστοποιημένων υλικών αναφοράς κατασκευασμένα σε υπόστρωμα που εμπίπτει στο πεδίο εφαρμογής της προς επικύρωση μεθόδου και κατ' επέκταση ίδιο με τα προς ανάλυση δείγματα.
- iii. με μελέτες υποκατάστασης (*surrogate studies*)

Αν και οι δύο πρώτες προσεγγίσεις θεωρούνται ιδανικές, προκύπτουν διάφοροι περιορισμοί αναφορικά με αυτές, καθώς η εγκυρότητα της εκτιμώμενης ανάκτησης προϋποθέτει ότι η αναλυτική μέθοδος είναι κατά τα άλλα αμερόληπτη. Στην περίπτωση που δεν ισχύει η προϋπόθεση αυτή θα προσδιορίζονταν τα συστηματικά σφάλματα της μεθόδου συνολικά, άρα η ορθότητα. Επιπλέον, τέτοια πρότυπα είναι σχετικά περιορισμένα και σε περίπτωση απουσίας κατάλληλων υλικών αναφοράς για τα υπόστρωμα ενδιαφέροντος μπορεί να υπάρξει αναντιστοιχία υποστρώματος (*matrix mismatch*), οπότε και η εκτίμηση να μην είναι απολύτως αντιπροσωπευτική. [3],[98],[103]

Όταν δεν υπάρχουν μέθοδοι αναφοράς ή διαθέσιμα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς ή προκειμένου να εκπονηθούν επικουρικές μελέτες, η ανάκτηση του αναλύτη στόχου μπορεί να εκτιμηθεί προσδιορίζοντας την ανάκτηση μιας ουσίας που προστίθεται εξωτερικά στο υπόστρωμα ενδιαφέροντος και τρόπον τινά υποκαθιστά τον εγγενή αναλύτη (μελέτες υποκατάστασης). Υπάρχουν διάφοροι τρόποι υποκατάστασης, όπως η ισοτοπική αραίωση, ο εμβολιασμός και το εσωτερικό πρότυπο. [92],[103],[104] Ο εμβολιασμός αποτελεί τον πιο κοινό τρόπο προσδιορισμού της ανάκτησης, κυρίως λόγω χαμηλότερου κόστους. [3],[103]

Ο προσδιορισμός της ανάκτησης αναφέρεται πάντα στα απόλυτα σήματα μέτρησης. Έτσι μπορεί να προσδιοριστεί μόνο με μεθόδους στις οποίες ο αναλύτης στόχος είναι διαθέσιμος σε καθαρή μορφή. [85] Υπολογίζεται σαν λόγος του σήματος του αναλύτη σε ένα εμβολιασμένο δείγμα, το οποίο υπέστη την προβλεπόμενη προκατεργασία (με

συγκεκριμένη ποσότητα αναλύτη), προς το σήμα του αναλύτη σε ένα πρότυπο διάλυμα, που έχει την ίδια συγκέντρωση αναλύτη (και αντιστοιχεί στο 100%). [67],[85],[92],[104]

2.8.9.2 Ο εμβολιασμός στην εκτίμηση της ανάκτησης

Οι μελέτες ανάκτησης, όπως περιγράφονται εδώ εκτιμούν τα συστηματικά σφάλματα ειδικά για την περίπτωση εμβολιασμού με τον αναλύτη στόχο (εμβολίασμα). [104]

Θα πρέπει να σημειωθεί λοιπόν, ότι ο προσδιορισμός της ανάκτησης σε εμβολιασμένα δείγματα δεν προσομοιάζει απαραίτητα κατ' απόλυτο τρόπο την εκχύλιση του εγγενούς αναλύτη σε ένα δείγμα. Στην περίπτωση πολλών υποστρωμάτων μπορεί να είναι δύσκολο έως αδύνατο να εισαχθεί το εμβολίασμα στο δείγμα με τέτοιο τρόπο, ώστε το μοριακό περιβάλλον του αναλύτη να είναι το ίδιο με εκείνο των μορίων του εγγενούς αναλόγου του. Δεν είναι λοιπόν απαραίτητο να συμβούν τα ίδια φαινόμενα (εντός του υποστρώματος) με την ίδια ένταση για τον εγγενή αναλύτη και το εμβολίασμα, ενώ επιπλέον φαινόμενα μπορεί να συμβαίνουν στην περίπτωση του εγγενούς αναλύτη. [92],[104]

Συνήθως, τέτοια προβλήματα προκύπτουν κατά την εκχύλιση στερεών. Για παράδειγμα κατά τον εμβολιασμό, τα μόρια του αναλύτη μπορεί να βρίσκονται ελεύθερα στην επιφάνεια των στερεών σωματιδίων του δείγματος, ενώ του εγγενούς αναλύτη να βρίσκονται σταθερά δεσμευμένα εντός τους, με αποτέλεσμα να εκχυλίζονται πολύ λιγότερο. Προβλήματα μπορούν επίσης να εμφανιστούν σε περιπτώσεις υγρών ή ακόμα και χωνευμένων δειγμάτων. Για παράδειγμα στα βιολογικά δείγματα η σύνδεση με βιομόρια φορείς μπορεί να ευθύνεται για τη μειωμένη εκχυλισθείσα ποσότητα, έναντι αυτής του ίδιου αναλύτη, όταν αυτός εισάγεται στο δείγμα με εμβολιασμό. Η αξιολόγηση του σφάλματος (και η αντίστοιχη αβεβαιότητα) που προκύπτει από τη μερική ανάκτηση ενός αναλύτη από σύνθετα υποστρώματα μπορεί να μην είναι πάντοτε εφικτό να προσδιοριστεί. [98]

Επιπλέον πρέπει να λαμβάνονται υπόψη φαινόμενα χημικής αλληλεπίδρασης του αναλύτη με συστατικά του υποστρώματος, όπως για παράδειγμα ο μεταβολισμός του αναλύτη από ένζυμα, ειδικά κατά την εισαγωγή του σε βιολογικά υποστρώματα.

Έτσι, οι μοριακές αλληλεπιδράσεις του εμβολιάσματος ενδέχεται να διαφέρουν από αυτές του εγγενούς αναλύτη, με αποτέλεσμα τα μόρια του αναλύτη να συμπεριφέρονται διαφορετικά στις δύο περιπτώσεις και αυτό να οδηγεί σε εσφαλμένη εκτίμηση του συστηματικού σφάλματος ή της ανάκτησης που υπάρχει στα πραγματικά δείγματα. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο εγγενής αναλύτης συγκρατείται ισχυρότερα από το υπόστρωμα σε σχέση με το εμβολίασμα, προκαλώντας μία ψευδή υπερεκτίμηση της αποδοτικότητας της εκχύλισης και κατ' επέκταση υποεκτίμηση του αντίστοιχου συστηματικού σφάλματος. [3],[92]

Συνεπώς, οι μελέτες ανάκτησης με εμβολιασμό υπόκεινται έντονα στην παρατήρηση ότι ενώ οι υψηλές ανακτήσεις δεν εγγυώνται υψηλή ορθότητα (χαμηλό συστηματικό σφάλμα), χαμηλές ανακτήσεις αποτελούν σίγουρη ένδειξη χαμηλής ορθότητας (υψηλό συστηματικό

σφάλμα). Όσο μικρότερη είναι η ανάκτηση, τόσο μεγαλύτερο είναι το συστηματικό σφάλμα που επηρεάζει τη μέθοδο και τόσο μικρότερη η ορθότητά της. [92],[104]

2.8.9.3 Η ανάκτηση σε βιοαναλυτικές μεθόδους LC-MS

Ως όρος η ανάκτηση χρησιμοποιείται στη βιβλιογραφία με περισσότερους του ενός τρόπους, οπότε οι ακόλουθες διευκρινίσεις είναι μάλλον απαραίτητες:

Όπως αναφέρθηκε ήδη (βλ. §2.8.4), η ορθότητα εκτιμάται ως μεροληψία, δηλαδή συστηματικό σφάλμα και ως όρος στοχεύει να καλύψει καθολικά τη μέθοδο ως προς αυτόν τον παράγοντα.

Η ανάκτηση, ως κριτήριο επίδοσης, χρησιμοποιείται και αυτή προκειμένου να προσδιοριστούν τάσεις ή συστηματικά σφάλματα στη μέθοδο, περιορίζοντας όμως το πεδίο τους. Εν γένει εστιάζει σε αυτά που προκύπτουν από την προκατεργασία των δειγμάτων. Ωστόσο, στην περίπτωση τεχνικών υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας (LC-MS και LC-MS/MS) η ανάκτηση αποκτά μια πιο σύνθετη υπόσταση. [92]

Το ζητούμενο στην περίπτωση αυτή είναι σε ποιο στάδιο της μεθόδου (από την προκατεργασία έως τη μέτρηση) θέλουμε να εστιάσουμε κάθε φορά, προκειμένου να προσδιορίσουμε τα παρατηρούμενα σφάλματα και τις συνοδές αβεβαιότητες και ει δυνατόν να παρέμβουμε για βελτιστοποιήσεις. Πιο συγκεκριμένα, στις μεθόδους αυτές είναι χρήσιμο να γίνεται διάκριση μεταξύ των όρων α. “ανάκτηση” ή “σχετική ανάκτηση” (*recovery/relative recovery*) - αναφέρεται στις απώλειες του αναλύτη στόχου κατά την προκατεργασία του δείγματος - και β. “αποτελεσματικότητα της διαδικασίας”, “διαδικασία εξαγωγής” ή “απόλυτη ανάκτηση” (*Process efficiency, PE or process extraction, PE or absolute recovery*) - αναφέρεται στις απώλειες στο σήμα του αναλύτη από την προκατεργασία, την ανάκτηση, τον ιοντισμό και τελικά την ανίχνευσή του. Ο όρος λοιπόν “αποτελεσματικότητα της διαδικασίας” περιλαμβάνει την ανάκτηση και την καταστολή/ενίσχυση ιοντισμού, φαινόμενο που μπορεί να λάβει χώρα στην πηγή ιοντισμού του φασματογράφου μάζας (βλ. §2.8.15). Στη σχετική βιβλιογραφία συχνά χρησιμεύει σαν ειδικός όρος της τεχνικής LC-MS για τη συνολική ορθότητα. [3],[82],[92]

Τα τρία μεγέθη (ανάκτηση - καταστολή/ενίσχυση ιοντισμού στην πηγή ιοντισμού - αποτελεσματικότητα της διαδικασίας) που εμπλέκονται σε αυτούς τους όρους μπορούν να προσδιοριστούν ως διακριτά μεγέθη. Στις τεχνικές LC-MS το σημαντικότερο θεωρείται το δεύτερο (συναντάται και ως “φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος - μήτρας”, *Matrix Effect, ME*) και ιδιαίτερα στις βιοαναλυτικές μεθόδους, όπου τα υποστρώματα είναι σύνθετα. [3],[92] Για τους λόγους αυτούς το φαινόμενο στις περισσότερες οδηγίες αναπτύσσεται σε χωριστή παράγραφο. [58],[59],[60],[62],[63] Ο συλλογισμός αυτός ακολουθήθηκε και στην παρούσα εργασία (βλ. §2.8.15).

Για τον προσδιορισμό λοιπόν της ανάκτησης (σχετικής ανάκτησης), θα πρέπει να ακολουθηθεί άλλος σχεδιασμός από αυτόν που περιγράφηκε παραπάνω, καθώς στην περίπτωση των μεθόδων LC-MS μέρος της μεταβολής στην απόκριση του αναλύτη στα

προκατεργασμένα δείγματα σε σχέση με τα αντίστοιχα πρότυπα διαλύματα, μπορεί να οφείλεται σε φαινόμενα καταστολής ή ενίσχυσης του ιοντισμού. Ακολουθώντας τον αρχικό σχεδιασμό θα προσδιορίζαμε την αποτελεσματικότητα της διαδικασίας (απόλυτη ανάκτηση). [67]

$$\% \text{ σχετική ανάκτηση} = \frac{\text{απόκριση δείγματος εμβολιασμένου μετά την επεξεργασία}}{\text{απόκριση δείγματος εμβολιασμένου πριν την επεξεργασία}} \times 100\% \quad (5)$$

$$\% \text{ απόλυτη ανάκτηση} = \frac{\text{απόκριση δείγματος εμβολιασμένου πριν την επεξεργασία}}{\text{απόκριση προτύπου διαλύματος}} \times 100\% \quad (6)$$

Έτσι λοιπόν, για τη σχετική ανάκτηση θα μπορούσε να δοθεί ο ακόλουθος ορισμός:

Η ανάκτηση (*recovery*) ορίζεται ως η απόδοση της εκχύλισης (*extraction efficiency*) μίας αναλυτικής διαδικασίας και αποδίδεται ως το ποσοστό της γνωστής συγκέντρωσης του αναλύτη (εγγενής ή εμβολιασμού), το οποίο εκχυλίστηκε από το δείγμα, πέρασε τα διάφορα στάδια επεξεργασίας της μεθόδου και τελικά μετρήθηκε. [58],[61],[74],[92],[103]

Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς, η ανάκτηση πρέπει να προσδιορίζεται κατά την επικύρωση με πειράματα που χρησιμοποιούν εμβολιασμένο λευκό υπόστρωμα. [90],[91] Υπολογίζεται με σύγκριση της απόκρισης του αναλύτη σε ένα βιολογικό δείγμα, που εμβολιάστηκε με τον αναλύτη και εν συνεχεία υπέστη όλη τη επεξεργασία (*spiked sample*) με αυτή ενός λευκού βιολογικού δείγματος, το οποίο πρώτα υπέστη όλη τη επεξεργασία και έπειτα εμβολιάστηκε με τον αναλύτη (*Matrix-matched sample*) (βλ. εξίσωση 5). [58],[61]

Αν και επιθυμητό, το ποσοστό της ανάκτησης δεν είναι απαραίτητο να είναι 100%. Ωστόσο τα αποτελέσματα της ανάκτησης του αναλύτη και του εσωτερικού προτύπου (προσδιορίζεται στο επίπεδο συγκέντρωσής της προσθήκης του, εφόσον χρησιμοποιείται) θα πρέπει να είναι ακριβή και επαναλήψιμα. [3],[58],[59]

Μη ποσοτική ανάκτηση εισάγει ένα σφάλμα στη μέτρηση ($\sigma_{\text{ανάκτησης}}$), το οποίο θα πρέπει να συνυπολογιστεί μαζί με τα λοιπά σφάλματα (σφάλμα δειγματοληψίας και σφάλμα μέτρησης). Πολλές φορές το σφάλμα ανάκτησης είναι ο βασικός παράγοντας, που καθορίζει το συνολικό σφάλμα των μετρήσεων. [102] Μία άλλη σημαντική πηγή συστηματικού σφάλματος είναι η σταθερότητα (στην πραγματικότητα η αστάθεια) του αναλύτη (βλ. §2.8.17). [92]

Είναι επίσης σημαντικό να λαμβάνεται υπόψη ο τρόπος με τον οποίο η απόδοση της μεθόδου ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναλύτη στόχου. Στις περισσότερες

περιπτώσεις, η διασπορά των αποτελεσμάτων αυξάνεται με τη συγκέντρωση και η ανάκτηση μπορεί να διαφέρει σημαντικά σε υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις. [104]

Κατά τη διαδικασία επικύρωσης θεωρείται προτιμότερο τα πειράματα ανάκτησης να εκτελούνται μαζί με τα πειράματα προσδιορισμού καταστολής/ενίσχυσης ιονισμού. [3], [67]

2.8.9.4 Η σημασία της ανάκτησης

Για πολλούς οι μελέτες ανάκτησης αποτελούν σημαντικό τμήμα της επικύρωσης όλων των αναλυτικών μεθόδων [98],[103] και αντιμετωπίζεται ως επιπλέον παράμετρος, καθώς μπορεί να υπολογιστεί από τα πειράματα ορθότητας και πιστότητας. Άλλοι πάλι δε θεωρούν ουσιαστικό τον υπολογισμό της κατά την επικύρωση (π.χ. στη δικανική και κλινική τοξικολογία) [67], στηριζόμενοι πιθανώς στο γεγονός ότι αποτυπώνεται στο συστηματικό σφάλμα, άρα και στην ορθότητα (και στην ειδικότητα) της μεθόδου και συνεπώς κατά τη διάρκεια μίας πλήρους επικύρωσης θεωρείται ικανοποιητικό να εκτιμηθεί το συστηματικό σφάλμα. [72] Οι περισσότεροι συγγραφείς δε, συμφωνούν ότι η τιμή της ανάκτησης δεν είναι σημαντική, όσο τα δεδομένα για την ορθότητα, την πιστότητα, το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης και ειδικά το όριο ανίχνευσης της μεθόδου είναι αποδεκτά. [66]

Εντούτοις επισημαίνεται ότι κατά την ανάπτυξη της μεθόδου η ανάκτηση θα πρέπει σαφώς να βελτιστοποιείται ([66]), καθώς κατά τη διεξαγωγή μελετών ανάκτησης σε διερευνητικά στάδια ενδέχεται να υποδεικνύουν την απαίτηση για περαιτέρω ανάπτυξη της μεθόδου. [72]

2.8.9.5 Ερμηνεία, στοιχεία οδηγιών & απαιτήσεις ανάκτησης

Ανακτήσεις σημαντικά διαφορετικές από το απόλυτο ποσοστό της (100%) φανερώνουν την ύπαρξη συστηματικού σφάλματος στη μέθοδο. [104] Είναι σημαντικότερο να επιτυγχάνεται ανάκτηση με αρκετά υψηλή επαναληψιμότητα, που να ικανοποιεί τις απαιτήσεις ανίχνευσης ή/ και ποσοτικοποίησης δειγμάτων χαμηλής συγκέντρωσης, ακόμα και αν η ίδια η ανάκτηση είναι χαμηλή. [61],[72] Οι χαμηλές τιμές ανάκτησης μπορεί να επηρεάσουν το όριο ανίχνευσης και το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου, οδηγώντας τις αντίστοιχες τιμές εκτός ορίων ανοχής. [3]

Υψηλότερες τιμές ανάκτησης αποτελούν ένδειξη αποδοτικής εκχύλισης, υψηλότερης ευαισθησίας και ακρίβειας της αναλυτικής μεθόδου. Καλύτερη ανάκτηση ή αποτελεσματικότερη εκχύλιση μπορεί να επιτευχθεί με βελτιστοποίηση του pH , των διαδικασιών εκχύλισης και κατάλληλου συνδυασμού διαλυτών εκχύλισης (εκχυλιστικών μέσων). [82]

Όταν οι ανακτήσεις εμβολιασμένων δειγμάτων υπερβαίνουν το 100%, θα πρέπει να επαληθεύεται (ποιοτικά) εάν προσδιορίζεται μόνο ο αναλύτης στόχος. [3]

Ορισμένες οδηγίες ([63]) ζητούν τον προσδιορισμό της ανάκτησης σε υψηλές και χαμηλές συγκεντρώσεις, η ακόμα θέτουν το κριτήριο ότι η ανάκτηση θα πρέπει να είναι υψηλότερη από 50%. [67],[85]

Ενώ η οδηγία της *EMA* ([60]) και το πρότυπο του *ANSI/ASB* ([63]) δεν ορίζουν ούτε παρέχουν καμία σύσταση σχετικά με την ανάκτηση, άλλες οδηγίες προτείνουν τον προσδιορισμό της ανάκτησης σε δείγματα. Στο σχέδιο της οδηγίας του *ICH* και στη οδηγία του *FDA* παρέχονται κάποιες γενικές πληροφορίες, χωρίς ωστόσο να ορίζονται κριτήρια επίδοσης. [58],[59] Επιπλέον, στο σχέδιο της οδηγίας του *ICH* παρατίθενται αρκετές πρόσθετες πληροφορίες, για την περίπτωση όμως που ο αναλύτης στόχος είναι και εγγενές συστατικό του υποστρώματος. [82]

Τα πειράματα ανάκτησης θα πρέπει να λαμβάνουν χώρα με σύγκριση των αναλυτικών αποτελεσμάτων των εκχυλισμένων δειγμάτων τυπικά σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλό, ενδιάμεσο και υψηλό). [58],[59]

2.8.10 Εκλεκτικότητα

Είναι η ικανότητα μίας αναλυτικής μεθόδου να διακρίνει και να μετρά μόνον τον αναλύτη για το οποίο αναπτύσσεται ή προορίζεται να εφαρμοστεί, παρουσία και άλλων συστατικών του υποστρώματος, τα οποία δυνητικά μπορούν να παρεμποδίσουν τον προσδιορισμό. [58]

Η εκλεκτικότητα αξιολογείται χρησιμοποιώντας λευκά δείγματα (δείγματα υποστρώματος χωρίς προσθήκη κάποιου αναλύτη ή εσωτερικού προτύπου), τα οποία λαμβάνονται από τουλάχιστον έξι (6) διαφορετικές πηγές (ή και λιγότερες σε περιπτώσεις σπανιότερου υποστρώματος). Τα λευκά δείγματα ελέγχονται για την παρουσία/απουσία παρεμποδίσεων. Επιπλέον θα πρέπει να αξιολογείται και η εκλεκτικότητα των εσωτερικών προτύπων. [58],[63]

Κατά την αξιολόγηση της εκλεκτικότητας δεν θα πρέπει να υπάρχει σημαντική απόκριση του ανιχνευτή από τη συνεισφορά ουσιών που παρεμποδίζουν στο χρόνο έκλουσης του αναλύτη ή του εσωτερικού προτύπου. [58]

Το χαμηλότερο, μη μηδενικό πρότυπο βαθμονόμησης (*LLOQ*) καθορίζει την ευαισθησία. [59] Έτσι, η παρουσία των παρεμποδίσεων γίνεται αποδεκτή όταν η απόκριση είναι μικρότερη από 20% του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (*LLOQ*) για τον αναλύτη στόχο και 5% για το εσωτερικό πρότυπο. [58],[59],[60]

Η ικανότητα της μεθόδου να διακρίνει και να μετρά μόνο τον αναλύτη στόχο εξαρτάται από την προετοιμασία του δείγματος και τις διαχωριστικές ικανότητες του οργάνου και μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη χημική τάξη του αναλύτη και του υποστρώματος. [90]

2.8.11 Ειδικότητα

Πρόκειται για την ικανότητα μίας βιοαναλυτικής μεθόδου να ανιχνεύει και να διαφοροποιεί τον αναλύτη στόχο από άλλες ουσίες, συμπεριλαμβανομένων και σχετικών του ουσιών, όπως για παράδειγμα ουσίες που εμφανίζουν δομική ομοιότητα, μεταβολίτες του, ισομερείς ενώσεις κ.ά..

Εάν η παρουσία τέτοιων σχετικών ουσιών είναι πιθανή στο μελετούμενο βιολογικό υπόστρωμα, η επίδρασή τους θα πρέπει να αξιολογηθεί κατά την επικύρωση. Στην περίπτωση μεθόδων *LC-MS*, για να εκτιμηθεί η δυνητική επίδραση μίας παρεμποδίζουσας ουσίας η αξιολόγηση μπορεί να περιλαμβάνει σύγκριση της μοριακής μάζας της με αυτή του αναλύτη στόχου καθώς και τον χρωματογραφικό τους διαχωρισμό.

Και εδώ, όπως και στην περίπτωση της εκλεκτικότητας η παρουσία των παρεμποδίσεων γίνεται αποδεκτή όταν η απόκριση είναι μικρότερη από 20% του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (*LLOQ*) για τον αναλύτη στόχο και 5% για το εσωτερικό πρότυπο.

Τόσο η εκλεκτικότητα, όσο και η ειδικότητα εξαρτώνται από το υπόστρωμα, στο οποίο εφαρμόζεται η βιοαναλυτική μέθοδος, καθώς παρεμποδίσεις από τα συστατικά του επηρεάζουν άμεσα τις παραμέτρους αυτές. Κατά συνέπεια η βελτιστοποίησή τους εξαρτάται και από την προετοιμασία του δείγματος και τις διαχωριστικές ικανότητες του αναλυτικού οργάνου. [58]

2.8.12 Το φαινόμενο της επιμόλυνσης - μόλυνσης εκ μεταφοράς ("*Carry-over*")

Οι περισσότερες χρωματογραφικές διαδικασίες είναι επιρρεπείς στη μόλυνση εκ μεταφοράς και πρέπει να αξιολογούνται για αυτό το φαινόμενο. [105] Πρόκειται για μία μεταβολή της μετρούμενης συγκέντρωσης ενός αναλύτη σε ένα επεξεργασμένο δείγμα, λόγω της υπολειμματικής του παρουσίας στο αναλυτικό όργανο από προηγούμενες εγχύσεις που περιείχαν τον συγκεκριμένο αναλύτη. [58] Η συνεισφορά αυτή μπορεί να προκαλέσει ψευδώς θετικές και αυξημένες συγκεντρώσεις σε άγνωστα δείγματα. Τα αίτια του φαινομένου συχνά είναι δύσκολο να προσδιοριστούν και να αποκατασταθούν, καθιστώντας την παρακολούθησή του απαιτητή σε κάθε αναλυτικό γύρο, ακόμα και αν κατά την επικύρωση έχουν καταγραφεί αποδεκτά αποτελέσματα. Αυτό μπορεί να συμβεί, γιατί κατά την πορεία της υγρής χρωματογραφίας η έγχυση και η χρωματογραφική στήλη μπορούν να συνεισφέρουν ποικιλοτρόπως στο φαινόμενο της επιμόλυνσης - μόλυνσης εκ μεταφοράς, ανάλογα με την κατάστασή τους, μεταβάλλοντας χωρικά και χρονικά την εξέλιξη του φαινομένου, επηρεάζοντας τελικά την ανάλυση των δειγμάτων. [105]

Το φαινόμενο θα πρέπει να αξιολογείται και να ελαχιστοποιείται κατά το στάδιο της ανάπτυξης μιας μεθόδου, ενώ στο στάδιο της επικύρωσης θα πρέπει να εκτιμάται αναλύοντας λευκά δείγματα μετά από διαλύματα βαθμονόμησης στο υψηλότερο όριο ποσοτικοποίησης (*ULOQ*). Το φαινόμενο μεταφοράς στην περίπτωση αυτή δεν θα πρέπει να είναι υψηλότερο από το 20% της απόκρισης στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*) για τον αναλύτη και στο 5% για το εσωτερικό πρότυπο. Εάν το φαινόμενο δεν

μπορεί να αποφευχθεί τα άγνωστα δείγματα - δείγματα μελέτης δεν θα πρέπει να τυχαιοποιούνται. Θα πρέπει δε να ληφθούν υπόψη συγκεκριμένες μετρήσεις και να ελεγχθούν κατά τη διάρκεια της επικύρωσης και να εφαρμοστούν κατά την ανάλυση των δειγμάτων μελέτης, προκειμένου το φαινόμενο να μην επηρεάσει την ορθότητα και την πιστότητα. Η διαδικασία αυτή θα μπορούσε να περιλαμβάνει την έγχυση λευκών δειγμάτων μετά από δείγματα που αναμένεται να έχουν υψηλή συγκέντρωση, πριν από το επόμενο δείγμα μελέτης. [58]

2.8.13 Ευαισθησία

Σύμφωνα με τη διεθνή βιβλιογραφία η ευαισθησία μιας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται με διάφορους τρόπους (αν και συγγενείς).

Σύμφωνα με το *Διεθνές Λεξιλόγιο μετρολογίας ως αναλυτική ευαισθησία ορίζεται το πηλίκο της μεταβολής μιας ένδειξης ενός συστήματος μέτρησης και της αντίστοιχης μεταβολής της τιμής μιας μετρούμενης ποσότητας (για παράδειγμα της συγκέντρωσης ενός αναλύτη)*. [87] Έτσι, η ευαισθησία περιγράφει την ικανότητα μιας μεθόδου να διακρίνει μικρές διαφορές π.χ στη συγκέντρωση του μετρούμενου αναλύτη ως συνέπεια μικρών μεταβολών στην απόκριση του οργάνου μέτρησης. Στην περίπτωση γραμμικής απόκρισης η ευαισθησία είναι η κλίση της πρότυπης καμπύλης. [64],[95],[106]

Αν και η ευαισθησία μιας αναλυτικής μεθόδου δύναται να επηρεάσει τόσο το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ) [58],[59] όσο και το όριο ανίχνευσης (LOD) [64] δεν ταυτίζεται με αυτά (βλ. §2.8.14).

Εντούτοις, το σχέδιο της οδηγίας του ICH ([58]) και η οδηγία του FDA ([59]) ορίζουν ως ευαισθησία τη χαμηλότερη συγκέντρωση ενός αναλύτη στο υπόστρωμα, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί με αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα (ήτοι το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης, LLOQ).

2.8.14 Όρια

2.8.14.1 Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ)

Αποτελεί τη χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη σε ένα δείγμα, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με προκαθορισμένη ορθότητα και πιστότητα. [58]

Το όριο αυτό καθορίζει την ευαισθησία της μεθόδου και πρέπει να προσδιορίζεται στο στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου. Η μέθοδος πρέπει να αναπτυχθεί και να επικυρωθεί έτσι, ώστε να πληροί τις αναγκαίες απαιτήσεις για τα επιδιωκόμενα άγνωστα δείγματα - δείγματα μελέτης. Ο προσδιορισμός του LLOQ μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους. Μπορεί να αποτελεί το χαμηλότερο μη μηδενικό διάλυμα βαθμονόμησης με αποδεκτά όρια ορθότητας και πιστότητας $\pm 20\%$ και 20% αντίστοιχα (κοινά όρια για ICH, EMA & FDA). [58],[59],[60] Στη συλλογιστική αυτή, η εκτίμηση του LLOQ μπορεί να γίνει είτε μεμονωμένα, είτε σαν τμήμα της εκτίμησης της ορθότητας και της πιστότητας για την καμπύλη βαθμονόμησης (βλ. §2.8.2.3). [58],[63] Η επιπλέον απαίτηση για το σημείο αυτό

σε σχέση με τα υπόλοιπα της καμπύλης βαθμονόμησης είναι το σήμα (η απόκριση) του ανιχνευτή του αναλυτικού οργάνου να είναι τουλάχιστον πέντε (5) φορές μεγαλύτερο από το σήμα του λευκού δείγματος (*EMA & FDA*) για τους ίδιους χρόνους έκλυσης. [59],[60] Εναλλακτικά, το *LLOQ* μπορεί να προσδιοριστεί από το λόγο σήματος προς θόρυβο, με στατιστική ανάλυση του υποβάθρου σε λευκά δείγματα ή με τη χρήση γραμμικής καμπύλης βαθμονόμησης στην περιοχή του *LLOQ* (βλ. §2.8.14.3). [66]

Η ποσοτικοποίηση σε επίπεδα συγκεντρώσεων χαμηλότερα του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (*LLOQ*) είναι εξ ορισμού μη αποδεκτή. Συνεπώς κάτω από το όριο αυτό η μέθοδος μπορεί να παράγει μόνο ημιποσοτικά ή ποιοτικά αποτελέσματα. [66] Άγνωστα δείγματα ή δείγματα μελέτης με συγκεντρώσεις κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης θα πρέπει να αναφέρονται ως “κάτω από το όριο ποσοτικοποίησης”. [59]

Οι κανονιστικές αρχές δηλώνουν επανειλημμένα ότι η επέκταση πέραν του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης θα πρέπει να αποφεύγεται και πως εάν πρόκειται να γίνει ποσοτικοποίηση σε επίπεδο συγκέντρωσης χαμηλότερο του ορίου αυτού, θα πρέπει να πραγματοποιηθούν επιπλέον πειράματα επικύρωσης που να επιβεβαιώνουν την ικανοποιητική επίδοση της μεθόδου στα επίπεδα αυτά. Ο προβληματισμός έγκειται στην πιθανή υποβίβαση της ορθότητας, της πιστότητας και της γραμμικότητας που μπορεί να συμβούν κάτω από το επικυρωμένο όριο της μεθόδου. [105] Εντούτοις, μπορεί να είναι σημαντικό να γνωρίζουμε το όριο ανίχνευσης της μεθόδου. [66]

2.8.14.2 Ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*ULOQ*)

Πρόκειται για την υψηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη σε ένα δείγμα, η οποία μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με προκαθορισμένη ορθότητα και πιστότητα.

Ο ορισμός αυτός έρχεται αντίστοιχα με αυτόν του *LLOQ* παραπάνω, από το σχέδιο της οδηγίας του *ICH* ([58]), με τα ανώτερα όρια ορθότητας και πιστότητας εδώ να τροποποιούνται σε $\pm 15\%$ και 15% αντίστοιχα (κοινά όρια για *ICH, EMA & FDA*). [58],[59], [60]

2.8.14.3 Όριο ανίχνευσης (*LOD*)

Σύμφωνα με τον ICH το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) της μεθόδου ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη σε ένα δείγμα, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί ως ακριβής τιμή. [67]

Πρόκειται για το πιο αμφιλεγόμενο μέρος της επικύρωσης μιας βιοαναλυτικής μεθόδου. Δεν ορίζεται στις τρέχουσες εκδόσεις των οδηγιών της *EMA* και του *FDA*, αλλά ορίζεται στο πρότυπο του *ANSI/ASB* ([63]), ως μία εκτίμηση της χαμηλότερης συγκέντρωσης ενός αναλύτη σε ένα δείγμα που μπορεί να διαφοροποιηθεί αξιόπιστα από το λευκό υπόστρωμα και να αναγνωριστεί από την αναλυτική μέθοδο. Στο πρότυπο αυτό γίνεται αναφορά σχετικά με διάφορους τρόπους προσδιορισμού του *LOD*, ανάλογα με το είδος της εφαρμοζόμενης μεθόδου. Το μέγεθος θα πρέπει να εκτιμάται από περισσότερους του ενός γύρους με τη

χρήση φορτισμένων - εμβολιασμένων δειγμάτων από τουλάχιστον τρεις (3) διαφορετικές πηγές λευκού υποστρώματος.

Γενικά, όταν προσδιορίζονται συγκεντρώσεις ενός αναλύτη σε επίπεδα χαμηλότερα του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη παράμετροι, όπως ο λόγος σήματος προς θόρυβο (*Signal to Noise ratio, S/N*), η μορφή και η κατάσταση της βασικής γραμμής (*baseline*), το φαινόμενο καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού (βλ. §2.8.15), η απορρόφηση και η σταθερότητα του αναλύτη σε χαμηλές συγκεντρώσεις και το φαινόμενο της επιμόλυνσης - μόλυνσης εκ μεταφοράς ("*carryover*") (βλ. §2.8.12). [105]

Η τιμή του λόγου σήματος προς θόρυβο αποτελεί τον βασικό παράγοντα που υπαγορεύει και την επέκταση σε χαμηλότερο επίπεδο από αυτό του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης. Η μορφή και η δομή της βασικής γραμμής αποτελούν επίσης ένα σημαντικό ζήτημα (βλ. σχήμα 2.1). Καθώς προχωρούμε σε χαμηλότερα επίπεδα συγκεντρώσεων, χαρακτηριστικά της βασικής γραμμής (όπως η ασυμμετρία και ο κυματισμός) μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά το σχήμα των χρωματογραφικών κορυφών και την ολοκλήρωσή τους, η οποία πρέπει να αξιολογείται με ιδιαίτερη προσοχή. Το πραγματικό όριο ανίχνευσης ενός αναλυτικού οργάνου μπορεί να προσδιοριστεί απευθείας ή να προβλεφθεί από τον λόγο σήματος προς θόρυβο κατά την εκτίμηση του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης. [105]

Σύμφωνα με το πρότυπο του *ANSI/ASB* ([63]), δύο από τους τρόπους προσδιορισμού του ορίου ανίχνευσης είναι οι ακόλουθοι: α) Με τη χρήση του λόγου σήματος προς θόρυβο ή β) με τη χρήση της γραμμικής εξίσωσης της καμπύλης βαθμονόμησης ($y = bx + a$). Η περίπτωση α επιτυγχάνεται με δύο επιλογές: α₁) Φόρτιση τριών (3) τουλάχιστον διακριτών λευκών δειγμάτων ανά υπόστρωμα με προοδευτικά μειούμενες συγκεντρώσεις του αναλύτη στόχου και εις διπλούν ανάλυση για τουλάχιστον τρεις (3) διαφορετικούς αναλυτικούς γύρους ή α₂) στατιστική ανάλυση του υποβάθρου. [63]

Στην περίπτωση α₁, το *LOD* θα είναι η συγκέντρωση, η οποία θα αντιστοιχεί σε απόκριση του αναλυτικού οργάνου μεγαλύτερη ή ίση από 3,3 φορές το επίπεδο του θορύβου (ένταση του σήματος του υποβάθρου) σε μία περιοχή γύρω από την κορυφή του αναλύτη, όπως περιγράφεται στη συνθήκη - ανίσωση 7. Η περίπτωση β είναι χρήσιμη για κάθε μέθοδο ποσοτικοποίησης που ακολουθεί το γραμμικό μοντέλο βαθμονόμησης $y = bx + a$. Το *LOD* προσδιορίζεται με εφαρμογή της μαθηματικής εξίσωσης 8, όπου b η κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης και S_a η τυπική απόκλιση της εκτίμησης της τετμημένης a (από τρεις τουλάχιστον διαφορετικές καμπύλες τριών διακριτών αναλυτικών γύρων, ακόμα και με μία πηγή ανά τύπο υποστρώματος). Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να χρησιμοποιούνται μόνο διαλύματα βαθμονόμησης χαμηλής φόρτισης με τον αναλύτη στόχο (κοντά στο *LOD*). [66]

Αντίστοιχα με το *LOD* μπορεί να προκύψει και το *LLOQ*, εάν στην ανίσωση 7 και την εξίσωση 8 ο συντελεστής 3,3 αντικατασταθεί με τον συντελεστή 10.

$$LOD \rightarrow \text{Λόγος σήματος προς θόρυβο (S/N)} = \frac{\text{Ένταση σήματος αναλύτη}}{\text{Ένταση θορύβου}} \geq 3,3 \quad (7)$$

$$LOD = 3,3 \times \frac{S_a}{b} \quad (8)$$

Τα τελευταία χρόνια έχει σημειωθεί μεγάλη πρόοδος αναφορικά με τη βελτιστοποίηση της ευαισθησίας στην οργανολογία της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά (LC-MS/MS). Ωστόσο όταν απαιτείται υψηλή ευαισθησία για να επιτευχθούν χαμηλά όρια ανίχνευσης, το φαινόμενο καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού κάνει πιο αισθητή την παρουσία του. Επιπλέον εντείνεται και η επίδραση του χημικού θορύβου, που στην LC-MS/MS ορίζεται ως η επίδραση συστατικών της ανάλυσης, αλλά όχι του εξεταζόμενου αναλύτη, στη βασική γραμμή του χρωματογραφήματος. Οι παράμετροι αυτές δεν προσδιορίζονται εύκολα και μπορεί να προέρχονται από την κινητή φάση ή το υπόστρωμα. Πολλές φορές ο χημικός θόρυβος μπορεί απλά να εμφανιστεί στο χρωματογράφημα ως θόρυβος ή ακανόνιστη βασική γραμμή. [105]

2.8.15 Καταστολή/ενίσχυση ιοντισμού (Matrix Effect)

Στη βιοπαρακολούθηση η ικανότητα ποσοτικού προσδιορισμού των επιπέδων συγκέντρωσης των αναλυτών στόχων σε βιολογικά δείγματα με ακρίβεια (ορθότητα και πιστότητα) περιλαμβάνει τη χρήση αναλυτικών οργάνων υψηλής ευαισθησίας και εκλεκτικότητας, όπως υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά (LC-MS/MS) και διεξοδική κατανόηση του εξαιρετικά μεταβλητού φαινομένου επίδρασης υποστρώματος - μήτρας. [107]

Η υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας της φασματομετρίας μάζας σε σειρά (*tandem MS*) συζευγμένη με τη διαχωριστική ισχύ της σύγχρονης υγρής χρωματογραφίας (UHPLC) επιτρέπουν τον προσδιορισμό ιχνών αναλύτη σε όργανα με υψηλή διεκπεραιωτική ικανότητα (*high-throughput*), ακόμη και παρουσία σύνθετου υπόβαθρου, μειώνοντας την προετοιμασία των δειγμάτων στο ελάχιστο (βλ. Κεφάλαιο 3). Εντούτοις η υψηλή εκλεκτικότητα της LC-MS/MS δεν μπορεί να εγγυηθεί την αποτελεσματική εξάλειψη των παρεμποδισέων των ενδογενών μορίων του υποστρώματος. Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκάσμο ή ηλεκτροδιάχυση (*Electrospray ionization, ESI*) ή με χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (*Atmospheric - pressure chemical ionization, APCI*) μπορεί να επηρεαστεί ουσιαστικά από την αλλαγή της αποτελεσματικότητας του ιοντισμού και συγκεκριμένα την καταστολή (*ionization/ion suppression*) ή την ενίσχυση (*ionization/ion enhancement*) των ιόντων του αναλύτη ενδιαφέροντος - στόχου, οφειλόμενες σε εγγενή

μόρια του υποστρώματος ή σε άλλες παρεμποδίσσεις από το δείγμα, επηρεάζοντας ποσοτικούς προσδιορισμούς. [108],[109]

Καταστολή/ενίσχυση ιοντισμού ή φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος ή μήτρας (Matrix Effect, ME) καλείται η αλλοίωση στο σήμα ανίχνευσης του αναλύτη στόχου κατά την ποσοτική του ανάλυση, συγκρινόμενο με το σήμα ανίχνευσής του σε πρότυπα διαλύματα, λόγω παρεμβολής συχνά άγνωστων συστατικών του υποστρώματος, τα οποία συνεκλούνται. [58],[63],[101]

2.8.15.1 Πηγές πρόκλησης και ένταση του φαινομένου

Οι κύριες πηγές πρόκλησης φαινομένων επίδρασης υποστρώματος, τόσο στην υγρή, όσο και στην αέρια χρωματογραφία (συζευγμένες με φασματογράφους μάζας, HPLC-MS & GC-MS) είναι ενδογενείς (του υποστρώματος) και εξωγενείς ουσίες, που βρίσκονται στα βιολογικά δείγματα. Στις ενδογενείς συμπεριλαμβάνονται άλατα, υδατάνθρακες, αμίνες, ουρίες, λιπίδια, πεπτιδία, φωσφολιπίδια και πρωτεΐνες, ενώ στις εξωγενείς συστατικά της κινητής φάσης (π.χ. τριφθοροοξικό οξύ, TFA και άλατα ρυθμιστικών διαλυμάτων), πλαστικές ύλες (π.χ. φθαλικοί εστέρες) και αντιπηκτικοί παράγοντες (π.χ. άλας λιθίου της ηπαρίνης). [107] Μία από τις πιο καλά περιγεγραμμένες παρεμποδίσσεις που περιέχονται στο πλάσμα είναι τα φωσφολιπίδια. [77],[110]

Ο καθαρισμός των δειγμάτων στο στάδιο της προκατεργασίας και οι πιο αποδοτικοί χρωματογραφικοί διαχωρισμοί μπορούν να μειώσουν την είσοδο συστατικών του υποστρώματος στον αναλυτή μάζας, συχνά ωστόσο απαιτούν περισσότερο κόπο και χρόνο και μπορεί να οδηγήσουν σε απώλεια αναλύτη. Επίσης έχουν γίνει προσπάθειες με χρήση εσωτερικών προτύπων επισημασμένων με ισότοπα, χωρίς ωστόσο να είναι τόσο οικονομικά και επιπλέον διαθέσιμα για όλες τις ουσίες. [109]

Η έκταση του φαινομένου παρουσιάζει μεγάλο εύρος εκδήλωσης και εξαρτάται από τη φύση του δείγματος, προκαλώντας αβεβαιότητα ακόμα και σε μία σειρά επαναληπτικών μετρήσεων του ίδιου δείγματος. Εξαιτίας δε του απρόβλεπτου χαρακτήρα του φαινομένου, μπορεί να παρατηρηθεί διακύμανση στην απόκριση του ανιχνευτή μεταξύ διαφορετικών παρτίδων του ίδιου δείγματος ή με την εφαρμογή της ίδιας μεθόδου. [109]

Η παρατηρούμενη αλλοίωση του σήματος οφείλεται στις περισσότερες περιπτώσεις σε καταστολή των ιόντων του αναλύτη ενδιαφέροντος [107], ενώ σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να οδηγήσει και σε ενίσχυσή τους. [105],[108] Η έκταση της επίδρασης του φαινομένου σε έναν αναλύτη εξαρτάται από τον τύπο του υποστρώματος και τη συγκέντρωσή του, τη δομή του αναλύτη, το χρωματογραφικό σύστημα, το οποίο μπορεί να επιτρέψει τη συνέκλωση με τον αναλύτη παραγόντων παρεμπόδισης και την ευαισθησία της πηγής ιοντισμού του οργάνου LC-MS/MS στην καταστολή ή στην ενίσχυση. [105]

2.8.15.2 Κριτήρια αποδοχής του φαινομένου

Τα φαινόμενα επίδρασης υποστρώματος μίας συγκεκριμένης δοκιμασίας θα πρέπει να διερευνάται, να μετράται και να καθίσταται κατά το δυνατόν διαχειρίσιμο συνήθως κατά την επικύρωση και την εφαρμογή της μεθόδου, καθώς τέτοια φαινόμενα ενδέχεται να επηρεάσουν κρίσιμα χαρακτηριστικά επίδοσης, όπως το όριο ανίχνευσης (*LOD*), το όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*, *ULOQ*), η γραμμικότητα, η ορθότητα και η πιστότητα, οδηγώντας σε αναξιόπιστα και εσφαλμένα ποσοτικά αποτελέσματα. [107],[108],[109] Τα δεδομένα που παράγονται δεν παρέχουν πληροφορίες για τις πηγές που προκάλεσαν την ενδεχόμενη καταστολή ή ενίσχυση. Τα φαινόμενα αυτά είναι συνήθως πολυπαραγοντικά, με αποτέλεσμα να καθίσταται συχνά δύσκολος ο έλεγχος, ακόμα και η παρακολούθησή τους, καθώς οι συνθήκες της δοκιμής μεταβάλλονται. [105]

Κατά την επικύρωση μίας μεθόδου θα πρέπει αξιολογείται το φαινόμενο μεταξύ διαφορετικών ανεξάρτητων πηγών/παρτίδων. Αναλυτικότερα, θα πρέπει να πραγματοποιούνται τουλάχιστον τρεις (3) επαναλήψεις του χαμηλού και του υψηλού δείγματος ελέγχου ποιότητας, καθένα παρασκευασμένο χρησιμοποιώντας υποστρώματα από τουλάχιστον τρεις διαφορετικές και ανεξάρτητες πηγές/παρτίδες. Η ορθότητα θα πρέπει να βρίσκεται εντός του $\pm 15\%$ της ονομαστικής συγκέντρωσης και η πιστότητα (εκφρασμένη ως επί τοις εκατό συντελεστής διακύμανσης, *%CV*) δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 15% σε όλα τα ανεξάρτητα υποστρώματα. Η χρήση λιγότερων πηγών/παρτίδων μπορεί να γίνεται ανεκτή στην περίπτωση σπάνιων υποστρωμάτων. [58] Κατά την οδηγία της *EMA* ([60]), τα κριτήρια παραμένουν ίδια, προτείνεται ωστόσο η αξιολόγηση του φαινομένου σε τρία (3) επίπεδα συγκέντρωσεων (*LLOQ*, *3xLLOQ*, *ULOQ*).

Σύμφωνα με το πρότυπο του *ANSI/ASB* ([63]) το φαινόμενο θα πρέπει να μην ξεπερνά το $\pm 25\%$ και το *%CV* το 20% και να προσδιορίζεται σε δύο ακραία επίπεδα συγκέντρωσης, σε κάθε ένα ως μέσος όρος δέκα (10) κατ' ελάχιστο διακριτών πηγών μήτρας (*matrix sources*). Το φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης μπορεί να ποσοτικοποιηθεί βάσει των μαθηματικών εξισώσεων 9 και 10.

$$\% \text{ Καταστολή/ενίσχυση ιοντισμού} = (MF - 1) \times 100\% \quad (9)$$

Ο παράγοντας μήτρας (*Matrix Factor*, *MF*) αποτελεί το λόγο του εμβαδού της χρωματογραφικής κορυφής παρουσία και απουσία υποστρώματος και υπολογίζεται, για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης του αναλύτη στόχου, από τον μέσο όρο των εμβαδών των κορυφών στα δείγματα, το οποία πρώτα υπέστησαν όλη τη επεξεργασία - προκατεργασία και έπειτα εμβολιάστηκαν με τον αναλύτη στόχο (*matrix-matched sample*) διαιρεμένο με τον μέσο όρο των αντίστοιχων εμβαδών προτύπων διαλυμάτων, όπου ο αναλύτης στόχος βρίσκεται σε καθαρό διαλύτη, απουσία υποστρώματος.

$$MF = \frac{\bar{E}_{\text{Διαλυμάτων εμβολιασμένων μετά την επεξεργασία}}}{\bar{E}_{\text{Προτύπων διαλυμάτων}}} \quad (10)$$

2.8.15.3 Μηχανισμοί πρόκληση του φαινομένου

Από τότε που το φαινόμενο καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού παρατηρήθηκε στον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό για πρώτη φορά τη δεκαετία του 1990, έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί πρόκλησής του. Σχετίζονται δε την επίδραση συστατικών του υποστρώματος, τα οποία παρεμποδίζουν την πρόσληψη φορτίου από τα μόρια του αναλύτη στόχου ή την ανταγωνίζονται, επηρεάζουν την ικανότητα των μορίων του αναλύτη να παραμένουν φορτισμένα στην αέρια φάση, αυξάνουν την επιφανειακή τάση των σταγονιδίων ή αυξάνουν την ηλεκτρική αντίσταση. Παρότι οι ακριβείς μηχανισμοί του φαινομένου δεν έχουν κατανοηθεί πλήρως, έχει γίνει ευρέως αποδεκτό ότι η συνέκλυση συστατικών του υποστρώματος μπορούν να μεταβάλλουν την απόδοση του ιονισμού του αναλύτη στόχου και να επηρεάσουν την ένταση του σήματος στον ανιχνευτή, εξαιτίας του ανταγωνισμού στα διαθέσιμα φορτία και στην πρόσβαση στην επιφάνεια των σταγονιδίων πριν την επικείμενη εξάτμιση κατά τη διάρκεια του ηλεκτροψεκασμού (βλ. §3.9.1).

Για την περίπτωση της καταστολής των ιόντων του αναλύτη ενδιαφέροντος - στόχου έχουν προταθεί πολλοί διαφορετικοί μηχανισμοί και οι περισσότεροι σχετίζονται ειδικά με τη χρησιμοποιούμενη τεχνική ιονισμού. Αν και το φαινόμενο έχει δυσμενείς επιπτώσεις τόσο στον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (ESI), όσο και στον χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (APCI), φαίνεται πως η διεπαφή (interface) στον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό είναι πιθανότερο να επηρεαστεί. Η διαδικασία ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό, που οδηγεί στη μετάβαση των ιόντων στην αέρια φάση μπορεί να υποδιαιρεθεί σε τέσσερα στάδια:

1. φόρτιση των μορίων του αναλύτη όντας στην υγρή φάση
2. παραγωγή φορτισμένων σταγονιδίων στο τριχοειδές μέσω του *κώνου του Taylor*
3. μετασχηματισμός των φορτισμένων σταγονιδίων λόγω εξάτμισης του διαλύτη και σχάσης τους
4. σχηματισμός του ιόντος στην αέρια φάση, που περιγράφεται είτε από το *μοντέλο υπολειμματικού φορτίου (Charge Residue Model, CRM)*, είτε από το *μοντέλο ιοντικής εξάτμισης (Ion Evaporation Model, IEM)*

Κάθε γεγονός που μπορεί να μειώσει τον ρυθμό παραγωγής σταγονιδίων και τον τελικό σχηματισμό των ιόντων στην αέρια φάση θα μπορούσε να συμβάλλει στην καταστολή του σήματος. Για το λόγο αυτό μηχανισμοί που οδηγούν σε μείωση της απόδοσης ιονισμού μπορούν εύκολα να σχετιστούν με δύο κατηγορίες διαδικασιών που λαμβάνουν χώρα στην υγρή και την αέρια φάση αντίστοιχα. [109]

Συνεπώς κάθε διαδικασία που μεταβάλλει την απόδοση του ιονισμού και λαμβάνει χώρα στην υγρή ή την αέρια φάση οδηγεί σε φαινόμενο καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού.

Ορισμένες μελέτες για παράδειγμα έχουν δείξει ότι παρουσία παρεμποδιζουσών ουσιών σε υψηλότερες συγκεντρώσεις μπορούν να αυξηθούν το ιξώδες και η επιφανειακή τάση των σταγονιδίων και κατά συνέπεια η απόδοση σχηματισμού και εξάτμισής τους. Οι αλλαγές στην υγρή φάση θα μπορούσαν να οδηγήσουν στη μεταβολή της ποσότητας φορτισμένων σωματιδίων στην αέρια φάση. Επιπλέον, συστατικά του υποστρώματος ή συστατικά της κινητής φάσης, τα οποία δρουν ως αντιδραστήρια ζεύγους ιόντων (*ion-pairing reagents*) συνήθως μειώνουν την απόδοση ιονισμού με αποτέλεσμα τη μείωση της απόκρισης του ανιχνευτή. [108]

Η κατανόηση των μηχανισμών, που βρίσκονται πίσω από το φαινόμενο καταστολής/ενίσχυσης ιονισμού στον ιονισμό με ηλεκτροψεκασμό (*ESI*), όσο και στον χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης (*APCI*) αποτελεί ένα κύριο βήμα κατά την ταυτοποίηση των συστατικών του υποστρώματος, καθώς δυνητικά μπορούν να αποτελούν μία αιτία εμφάνισης του φαινομένου κατά την ανάπτυξη μιας μεθόδου *LC-API-MS*. [109]

2.8.16 Ακεραιότητα αραίωσης

Στις περιπτώσεις στις οποίες απαιτείται αραίωση του δείγματος, είναι επιτακτική η αξιολόγηση της διαδικασίας, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι δεν επηρεάζεται η ορθότητα και η πιστότητα της μετρούμενης συγκέντρωσης του αναλύτη. Για τις αραιώσεις αυτές θα πρέπει να χρησιμοποιούνται ίδια υποστρώματα από τα ίδια είδη με αυτά που χρησιμοποιήθηκαν και για την παρασκευή των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (*QCs*).

Τα προς αραιώση δείγματα ελέγχου ποιότητας (*dilution QCs*), που θα χρησιμοποιηθούν στην εκτίμηση της ακεραιότητας της αραιώσης, θα πρέπει να παρασκευάζονται με συγκεντρώσεις αναλύτη υψηλότερες από το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*ULOQ*) και εν συνεχεία να αραιώνονται με λευκό δείγμα. Προκειμένου να διασφαλιστεί η ορθότητα και η πιστότητα των μετρούμενων συγκεντρώσεων θα πρέπει να λαμβάνουν χώρα τουλάχιστον πέντε (5) επαναληπτικές μετρήσεις για κάθε συντελεστή αραιώσης εντός του αναλυτικού γύρου βαθμονόμησης. Ο/οι αναλογία/ες αραιώσης που πραγματοποιούνται κατά την ανάλυση των δειγμάτων μελέτης θα πρέπει να βρίσκονται εντός των αναλογιών αραιώσης που αξιολογήθηκαν κατά τη διαδικασία της επικύρωσης της μεθόδου. Η μέση ορθότητα της προσδιοριζόμενης συγκέντρωσης για τα προς αραιώση δείγματα ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να βρίσκεται εντός του $\pm 15\%$ της ονομαστικής συγκέντρωσης και η πιστότητα (*%CV*) δεν θα πρέπει να υπερβαίνει το 15%. [58]

Στις περιπτώσεις σπάνιων υποστρωμάτων μπορεί να γίνει αποδεκτή η χρήση υποκατάστατου υποστρώματος, εφόσον έχει αποδειχθεί ότι αυτό δεν επηρεάζει την ορθότητα και την πιστότητα.

2.8.17 Εκτέλεση δοκιμών μελέτης σταθερότητας

Προκειμένου να ελεγχθεί η ακεραιότητα της συγκέντρωσης του αναλύτη στα στάδια προετοιμασίας, επεξεργασίας, ανάλυσης, καθώς και οι συνθήκες αποθήκευσης που εφαρμόζονται θα πρέπει να πραγματοποιούνται σχετικές μελέτες.

Οι εφαρμοζόμενες αυτές μελέτες (χρονική και θερμοκρασιακή σταθερότητα, σταθερότητα υποστρώματος, επίδραση αντιπηκτικών συστατικών ή συστατικών του περιέκτη) θα πρέπει να είναι αντιπροσωπευτικές των συνθηκών που θα εμφανιστούν στη διαχείριση των δειγμάτων μελέτης, ενώ η απλή βιβλιογραφική αναφορά σε ήδη εκπονημένες μελέτες δεν θεωρείται επαρκής. Η επικύρωση που αφορά στη διασφάλιση της χρονικής σταθερότητας θα πρέπει να διενεργείται χρησιμοποιώντας αντίστοιχα διαλύματα ελέγχου ποιότητας, τα οποία προορίζονται για τον έλεγχο της σταθερότητας του αναλύτη ενδιαφέροντος (*stability QCs*), τα οποία θα υπόκεινται σε χρονικές συνθήκες αποθήκευσης ισοδύναμες ή μεγαλύτερες από αυτές που πρόκειται να εφαρμοστούν μετέπειτα στα δείγματα μελέτης.

Για την εκτίμηση της σταθερότητας του αναλύτη στο υπό μελέτη υπόστρωμα θα πρέπει να χρησιμοποιούνται δύο διαλύματα ελέγχου ποιότητας, ένα χαμηλό και ένα υψηλό. Κατάλληλες ποσότητες των δύο αυτών διαλυμάτων αναλύονται κατά το χρόνο παρασκευής τους (χρόνος μηδέν, *time zero*) και μετά από τους υπό αξιολόγηση χρόνους. Για κάθε διαφορετικό επίπεδο συγκέντρωσης αναλύτη, διαφορετικές συνθήκες αποθήκευσης και διαφορετικό χρονικό διάστημα αποθήκευσης θα πρέπει να παρασκευάζονται τουλάχιστον τρία (3) διαλύματα ελέγχου ποιότητας.

Εν συνεχεία η συγκέντρωση του αναλύτη ενδιαφέροντος στα διαλύματα αυτά (*stability QCs*) προσδιορίζεται μέσω καμπύλης βαθμονόμησης, η οποία κατασκευάζεται από φρέσκα εμβολιασμένα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης, ενώ στον ίδιο αναλυτικό γύρο αναλύονται και δείγματα ελέγχου ποιότητας (*QCs*), άμεσα παρασκευασμένα ή παλαιότερα, των οποίων η σταθερότητα είναι αποδεδειγμένη. Η μέση συγκέντρωση σε κάθε επίπεδο διαλύματος ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να βρίσκεται εντός του $\pm 15\%$ της αντίστοιχης ονομαστικής συγκέντρωσης. Εάν η συγκέντρωση των υπό μελέτη δειγμάτων είναι συστηματικά υψηλότερη από το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης του εφαρμοζόμενου εύρους βαθμονόμησης, η υψηλή συγκέντρωση του διαλύματος ελέγχου ποιότητας για τον έλεγχο της σταθερότητας θα πρέπει να είναι αντίστοιχα υψηλό, προκειμένου να καλύπτει τις περιπτώσεις αυτές.

Σε περιπτώσεις πολυδύναμων μεθόδων, στις οποίες προσδιορίζονται πολλοί αναλύτες ταυτόχρονα, ο έλεγχος σταθερότητας ενός αναλύτη εντός του υποστρώματος θα πρέπει να πραγματοποιείται παρουσία και των υπολοίπων.

Κατά τη μελέτη σταθερότητας θα πρέπει να διεξάγονται και να αξιολογούνται οι παρακάτω έλεγχοι με τη χρήση ενός χαμηλού και ενός υψηλού διαλύματος ελέγχου ποιότητας για τον έλεγχο της σταθερότητας, προσομοιάζοντας τον χειρισμό των δειγμάτων μελέτης:

- i. Σταθερότητα πρότυπων διαλυμάτων (*Stability of stock and working solutions*). Αφορά διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας του αναλύτη ενδιαφέροντος καθώς και τα αντίστοιχα χρησιμοποιούμενα εσωτερικά πρότυπα.
- ii. Σταθερότητα κύκλων κατάψυξης - απόψυξης (*Freeze-thaw matrix stability*). Αποσκοπεί στην εκτίμηση της συνεισφορά της επαναλαμβανόμενης απόψυξης ενός δείγματος στη σταθερότητα του αναλύτη, επαναλαμβάνοντας πολλάκις τον κύκλο θερμοκρασιακής μεταβολής (ψύξης και απόψυξης).
- iii. Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα (*Bench top, short-term matrix stability*).
- iv. Σταθερότητα δειγμάτων μετά την προκατεργασία (*Processed sample stability*). Περιλαμβάνει και το χρόνο παραμονής μέχρι την ολοκλήρωση της ανάλυσης (εισαγωγή και παραμονή στον αυτόματο δειγματολήπτη του οργάνου μέτρησης μέχρι τη διεξαγωγή της ανάλυσης - έγχυση).
- v. Μακροπρόθεσμη σταθερότητα (*Long-term matrix stability*). Αποσκοπεί στην εκτίμηση της σταθερότητας του αναλύτη σε θερμοκρασία κατάψυξης για μεγάλα χρονικά διαστήματα.
- vi. Σταθερότητας ολικού αίματος (*Whole blood stability*). Αποσκοπεί στον έλεγχο της σταθερότητας του αναλύτη αμέσως μετά τη συλλογή του δείγματος και πριν την προετοιμασία για την αποθήκευσή του, προκειμένου να διασφαλιστεί ότι οι προσδιοριζόμενη συγκέντρωση με την υπό ανάπτυξη/επικύρωση αναλυτική μέθοδο αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του αναλύτη στο αίμα του υποκειμένου κατά τη στιγμή της αιμοληψίας. Ο έλεγχος πρέπει να πραγματοποιείται και στην περίπτωση που το υπόστρωμα της μεθόδου είναι το πλάσμα ή ο ορός του αίματος. [58]

2.8.18 Επαναληψιμότητα έγχυσης

Οι διακυμάνσεις στην ενέσιμη ποσότητα που εισάγεται σε ένα αναλυτικό όργανο και στην απόκριση του οργάνου μπορεί να οδηγήσουν σε μεταβλητότητα. [93]

Αν και η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκτιμάται μέσω της πολλαπλής μέτρησης διαλυμάτων ελέγχου ποιότητας (QCs) και συνήθως περιλαμβάνεται στην εκτίμηση της πιστότητας (και της ορθότητας), εάν τα δείγματα θα μπορούσαν να εγχυθούν εκ νέου σε ένα όργανο (π.χ. σε περιπτώσεις διακοπής λειτουργίας του οργάνου ή σε άλλες περιπτώσεις, όπως για λόγους αστοχίας του εξοπλισμού), θα πρέπει να εκτιμάται η επαναληψιμότητα της επανέγχυσης και να περιλαμβάνεται στην έκθεση της επικύρωσης ή να παρέχεται στη βιοαναλυτική έκθεση της μελέτης στην οποία διεξήχθη. [58]

Η επαναληψιμότητα αυτή παρατηρείται κατά την επαναλαμβανόμενη εισαγωγή (πάνω από δέκα (10) φορές) της ίδιας ποσότητας δείγματος σε ένα όργανο και καλείται πιστότητα οργάνου ή πιστότητα/αναπαραγωγιμότητα επανέγχυσης (*Reinjection reproducibility*). [93]

2.9 Ανάλυση δειγμάτων μελέτης

2.9.1 Χειρισμός των δειγμάτων

Η λήψη, ο χειρισμός και η επεξεργασία των δειγμάτων πρέπει να γίνονται κατά τρόπο ώστε η δυνατότητα ανίχνευσης του αναλύτη στόχου να είναι η μέγιστη. Οι διαδικασίες χειρισμού του δείγματος πρέπει να εμποδίζουν την τυχαία επιμόλυνση ή απώλεια του αναλύτη. [90],[91]

Η επικύρωση της βιοαναλυτικής μεθόδου θα πρέπει να έχει ολοκληρωθεί κατά την αποστολή των δεδομένων σε κάποια κανονιστική/ρυθμιστική αρχή. Αν και η ανάλυση άγνωστων δειγμάτων ή δειγμάτων μελέτης ξεκινά μετά την ολοκλήρωση της επικύρωσης, ορισμένες παράμετροι, όπως η μελέτη μακροπρόθεσμης σταθερότητας μπορούν να ολοκληρωθούν σε μετέπειτα στάδιο. Τα άγνωστα δείγματα ή τα δείγματα μελέτης, τα δείγματα ελέγχου ποιότητας και τα διαλύματα βαθμονόμησης θα πρέπει να υπόκεινται στους χειρισμούς που περιγράφονται στην επικυρωμένη μέθοδο. Εάν έχει εκτιμηθεί η σταθερότητα του συστήματος (περιλαμβάνει τις συνθήκες λειτουργίας και απόδοσης του αναλυτικού οργάνου), θα πρέπει να χρησιμοποιείται ένα συγκεκριμένο και προκαθορισμένο σχέδιο μελέτης, πρωτόκολλο ή τυπική/τυποποιημένη διαδικασία λειτουργίας (*Standard Operating Procedure, SOP*). Η σταθερότητα θα πρέπει να προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας δείγματα που να μη σχετίζονται με τα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης και τα δείγματα ελέγχου ποιότητας για τον αναλυτικό γύρο και να μην είναι δείγματα υποκειμένων. Θα πρέπει τέλος να παρακολουθείται και η απόκριση των εσωτερικών προτύπων στα δείγματα μελέτης για πιθανή εμφάνιση συστηματικής μεταβλητότητάς τους. [58]

2.9.2 Δομή αναλυτικού γύρου

Ένας αναλυτικός γύρος αποτελείται από:

- ✗ ένα λευκό δείγμα
- ✗ ένα μηδενικό δείγμα
- ✗ πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης σε τουλάχιστον έξι (6) επίπεδα συγκεντρώσεων
- ✗ δείγματα ελέγχου ποιότητας (QCs) σε τουλάχιστον τρία (3) επίπεδα συγκεντρώσεων (χαμηλή, ενδιάμεση και υψηλή) εις διπλούν ή τουλάχιστον στο 5% του συνόλου των άγνωστων δειγμάτων ή των δειγμάτων μελέτης, όποιο είναι υψηλότερο
- ✗ τα άγνωστα δείγματα ή τα δείγματα μελέτης

Τα διαλύματα ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να είναι κατανεμημένα με τέτοιο τρόπο μέσα στον αναλυτικό γύρο, ώστε να διασφαλίζεται η ορθότητα και η πιστότητα στο σύνολό του. Τα άγνωστα δείγματα ή τα δείγματα μελέτης θα πρέπει πάντοτε να βρίσκονται μεταξύ δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.

Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι κατά την ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων ή δειγμάτων μελέτης θα πρέπει να αξιολογείται και να αναφέρεται η επίπτωση τυχόν εμφάνισης του φαινομένου μόλυνσης εκ μεταφοράς (βλ. §2.8.12). Εάν ανιχνευθεί, θα πρέπει η επίδρασή του στα άγνωστα δείγματα να περιορίζεται (π.χ. να μην τυχαιοποιούνται τα άγνωστα δείγματα ή μετά την έγχυση δειγμάτων με υψηλές συγκεντρώσεις να ακολουθεί έγχυση λευκού δείγματος), είτε να τεκμηριώνεται η εγκυρότητα των αποδιδόμενων συγκεντρώσεων στη βιοαναλυτική έκθεση. [58]

2.9.2.1 Κριτήρια αποδοχής αναλυτικού γύρου

Τα κριτήρια αποδοχής ή απόρριψης ενός αναλυτικού γύρου θα πρέπει να καθορίζονται στο πρωτόκολλο, στο σχέδιο μελέτης ή σε μία τυπική διαδικασία λειτουργίας.

Οι αναδρομικά υπολογισμένες τιμές συγκεντρώσεων των προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης θα πρέπει να βρίσκεται εντός του εύρους $\pm 15\%$ της αντίστοιχης ονομαστικής συγκέντρωσης, εκτός από το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*), για το οποίο το εύρος διευρύνεται σε $\pm 20\%$. Το κριτήριο αυτό θα πρέπει να το ικανοποιεί τουλάχιστον το 75% των προτύπων βαθμονόμησης από ένα σύνολο τουλάχιστον έξι (6) επιπέδων συγκεντρώσεων. Εφόσον χρησιμοποιηθούν περισσότερα επίπεδα συγκεντρώσεων και ένα εξ αυτών δεν ικανοποιεί το παραπάνω κριτήριο, τότε το επίπεδο αυτό απορρίπτεται και η καμπύλη βαθμονόμησης επαναξιολογείται, εκτελώντας νέα ανάλυση παλινδρόμησης.

Εάν το απορριφθέν πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης είναι το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*), το νέο κατώτερο όριο του αναλυτικού αυτού γύρου καθίσταται το αμέσως επόμενο χαμηλότερο και αποδεκτό πρότυπο της καμπύλης βαθμονόμησης. Αυτό το νέο κατώτερο πρότυπο βαθμονόμησης διατηρεί το αρχικό του κριτήριο αποδοχής, ήτοι το εύρος $\pm 15\%$. Αντίστοιχα, εάν το απορριφθέν πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης είναι το ανώτερο πρότυπο βαθμονόμησης, το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*ULOQ*) για αυτόν τον αναλυτικό γύρο καθίσταται το επόμενο υψηλότερο και αποδεκτό πρότυπο της καμπύλης βαθμονόμησης. Το αναθεωρημένο εύρος βαθμονόμησης θα πρέπει να καλύπτει τουλάχιστον τρία (3) επίπεδα συγκεντρώσεων δειγμάτων ποιοτικού ελέγχου (χαμηλό, ενδιάμεσο και υψηλό). Τα άγνωστα δείγματα ή τα δείγματα μελέτης που βρέθηκαν εκτός του αναθεωρημένου εύρους πρέπει να επανεξετάζονται. Εάν δε πραγματοποιούνται πολλαπλές μετρήσεις των προτύπων βαθμονόμησης και μόνο μία από το πρότυπο βαθμονόμησης του κατώτερου ή ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης αστοχεί, τότε το εύρος βαθμονόμησης δεν τροποποιείται.

Τουλάχιστον τα 2/3 όλων των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας και τουλάχιστον το 50% για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να βρίσκεται εντός του $\pm 15\%$ της αντίστοιχης ονομαστικής συγκέντρωσης. Εάν τα κριτήρια αυτά δεν ικανοποιούνται, ο αναλυτικός γύρος θα πρέπει να απορρίπτεται και όλα τα άγνωστα δείγματά του να περιλαμβάνονται σε νέα αναλυτική παρτίδα για μεταγενέστερη ανάλυση. Στην περίπτωση που αστοχία

οφείλεται σε τεχνικό αίτιο που μπορεί να προσδιοριστεί, τα δείγματα μπορούν να επανεγχυθούν.

Αναλυτικοί γύροι, στους οποίους περιλαμβάνονται δείγματα που αραιώθηκαν και αναλύονται εκ νέου, θα πρέπει να περιέχουν τα προς αραιώση δείγματα ελέγχου ποιότητας (*dilution QCs*), προκειμένου να επαληθευτεί η ορθότητα και η πιστότητα της μεθόδου αραιώσης που ακολουθήθηκε κατά την αραιώσης των αγνώστων δειγμάτων. Η συγκέντρωση των προς αραιώση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας (*dilution QCs*) θα πρέπει να υπερβαίνει αυτή των αραιωμένων αγνώστων δειγμάτων (ή το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης, ULOQ) και να αραιώνονται με τον ίδιο συντελεστή αραιώσης. Τα εντός της ίδιας σειράς προσδιορισμών (*within-run*) κριτήρια αποδοχής των προς αραιώση δειγμάτων ελέγχου ποιότητας αφορούν την αποδοχή μόνο των αραιωμένων αγνώστων δειγμάτων και όχι τον αναλυτικό γύρο εν συνόλω.

Σε περιπτώσεις στις οποίες μελετώνται πολλοί αναλύτες ταυτόχρονα (περιπτώσεις πολυδύναμων μεθόδων) θα πρέπει να υφίσταται μία καμπύλη βαθμονόμησης για κάθε αναλύτη ενδιαφέροντος. Έτσι εάν ένας αναλυτικός γύρος κριθεί ως αποδεκτός για έναν αναλύτη και ως απορριπτός για έναν άλλο, τότε τα δεδομένα του αποδεκτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Όσον αφορά τον απορριφθέντα, τα δείγματα θα πρέπει να κατεργαστούν και να αναλυθούν εκ νέου.

Όλες οι αναδρομικά υπολογιζόμενες συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης και των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας των επιτυχημένων και αποδεκτών αναλυτικών γύρων θα πρέπει να καταγράφονται. Επιπλέον, για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης θα πρέπει να υπολογίζεται η συνολική (*between-run*) ορθότητα και πιστότητα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας μεταξύ όλων των αποδεκτών αναλυτικών γύρων και να καταγράφεται σε αντίστοιχη αναλυτική έκθεση. Εάν η συνολική μέση ορθότητα και πιστότητα δεν ικανοποιούν το κριτήριο του 15% (βλ. §2.8.8), πρέπει να πραγματοποιείται διερεύνηση αιτιών.[58]

2.9.3 Εύρος βαθμονόμησης

Αναφέρεται και ως εύρος εργασίας (*working range*). [62],[63] Στην περίπτωση κατά την οποία πριν από την έναρξη της ανάλυσης είναι ήδη γνωστό ή αναμένεται το εύρος των συγκεντρώσεων του αναλύτη στα άγνωστα δείγματα να είναι μικρό συνιστάται είτε να περιοριστεί το εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης, προσαρμόζοντας κατάλληλα τις συγκεντρώσεις των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας, είτε να προστεθούν καταλλήλως νέα δείγματα σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων, ώστε να ικανοποιούν τις συγκεντρώσεις των αγνώστων δειγμάτων.

Τέτοια είναι για παράδειγμα η περίπτωση κατά την οποία σε μία παρτίδα αγνώστων δειγμάτων η συγκέντρωση του αναλύτη υπερβαίνει το ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (ULOQ) σε πολλά από αυτά. Η καμπύλη βαθμονόμησης θα πρέπει να τροποποιηθεί εάν είναι δυνατό, είτε προσθέτοντας δείγματα ελέγχου ποιότητας, είτε τροποποιώντας τα επίπεδα συγκέντρωσης των υπάρχοντων. Εάν αυτό δεν είναι εφικτό ή εάν ο αριθμός των

δειγμάτων, των οποίων η συγκέντρωση του αναλύτη είναι υψηλότερη του ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης δεν είναι μεγάλος, τα δείγματα πρέπει να αραιώνονται σύμφωνα με την επικυρωμένη μέθοδο αραιώσης και να επανεγχέται.

Τουλάχιστον δύο (2) επίπεδα δειγμάτων ελέγχου ποιότητας θα πρέπει να βρίσκονται εντός του εύρους των μετρούμενων συγκεντρώσεων των αγνώστων δειγμάτων. Εάν το εύρος της καμπύλης βαθμονόμησης τροποποιηθεί, η μέθοδος θα πρέπει να επικυρωθεί εκ νέου (μερική επικύρωση), προκειμένου να επαληθευθεί η λειτουργική της απόκριση και να επιβεβαιωθεί η ορθότητα και η πιστότητά της. [58]

2.9.4 Επανεξέταση δειγμάτων μελέτης

Οι πιθανοί λόγοι για την επανεξέταση άγνωστων δειγμάτων, ο αριθμός των επαναληπτικών μετρήσεων και τα κριτήρια απόφασης για την επιλογή της δοθείσας τιμής θα πρέπει να είναι προκαθορισμένα στο πρωτόκολλο, στο πλάνο μελέτης ή σε μία τυπική διαδικασία λειτουργίας (SOP), προτού ξεκινήσει η ανάλυση των άγνωστων δειγμάτων.

Ο αριθμός των δειγμάτων και το ποσοστό τους επί του συνόλου των αναλυθέντων δειγμάτων θα πρέπει να αναφέρεται και να συζητείται στη βιοαναλυτική έκθεση.

Παραδείγματα αιτιών που μπορούν να οδηγήσουν σε επανεξέταση ενός δείγματος είναι τα ακόλουθα:

- × απόρριψη του αναλυτικού γύρου λόγω αστοχίας του στα κριτήρια αποδοχής που αφορούν στην ορθότητα των προτύπων διαλυμάτων βαθμονόμησης και/ή την πιστότητα και την ορθότητα των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας.
- × η απόκριση του εσωτερικού προτύπου στο δείγμα είναι σημαντικά διαφορετική από την απόκριση του στα πρότυπα διαλύματα βαθμονόμησης και στα δείγματα ελέγχου ποιότητας (όπως έχει προκαθοριστεί σε κάποια τυπική διαδικασία λειτουργίας)
- × η μετρηθείσα συγκέντρωση είναι υψηλότερη του ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (ULOQ)
- × η μετρηθείσα συγκέντρωση είναι χαμηλότερη του αναθεωρημένου κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (*revised LLOQ*), σε αναλυτικούς γύρους στους οποίους το χαμηλότερο πρότυπο διάλυμα βαθμονόμησης έχει απορριφθεί από την αντίστοιχη καμπύλη βαθμονόμησης, οδηγώντας στον ορισμό επόμενου - υψηλότερου προτύπου ως κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης συγκριτικά με άλλους αναλυτικούς γύρους, όπου το αρχικό κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης δεν έχει απορριφθεί
- × ακατάλληλη έγχυση του δείγματος ή δυσλειτουργία του εξοπλισμού
- × το αραιωμένο δείγμα έχει συγκέντρωση χαμηλότερη του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης (LLOQ)

- × πτωχή χρωματογραφική εικόνα (όπως έχει προκαθοριστεί σε κάποια τυπική διαδικασία λειτουργίας)

Οιοδήποτε δείγμα αναλύεται εκ νέου, θα πρέπει να επισημαίνεται στη βιοαναλυτική έκθεση και να αναφέρονται: η αρχική μετρηθείσα συγκέντρωση, ο λόγος της επανεξέτασής του, οι μετρηθείσες τιμές κατά την επανεξέταση, η τελική αποδεκτή τιμή, καθώς και μία αιτιολόγηση της αποδοχής αυτής. Σε περιπτώσεις στις οποίες η αρχική ανάλυση ενός δείγματος έδωσε ένα αποτέλεσμα το οποίο δεν μπορεί να αποδοθεί, π.χ. λόγω υπέρβασης του ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης ή δυσλειτουργίας του εξοπλισμού, μία απλή επανεξέτασή του θεωρείται ικανοποιητική. Εάν πάλι η αρχική τιμή χρίζει επιβεβαίωσης απαιτείται επανεξέταση εφόσον ο όγκος του δείγματος είναι επαρκής.

Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι η ασφάλεια των υποκειμένων από τα οποία ελήφθησαν τα δείγματα θα πρέπει να υπερισχύει οποιασδήποτε άλλης πτυχής της πειραματικής διαδικασίας. Κατά συνέπεια, ενδέχεται να υπάρχουν και άλλες περιστάσεις, στις οποίες να κριθεί απαραίτητο να αναλυθούν συγκεκριμένα δείγματα για λόγους διερεύνησης. [58]

2.9.5 Επανεέγχυση δειγμάτων μελέτης

Τα επεξεργασμένα δείγματα μπορούν να αναλυθούν εκ νέου (να γίνει επανεέγχυσή τους), σε περίπτωση αστοχίας του εξοπλισμού, εφόσον η επαναληψιμότητα επανεέγχυσης έχει εξεταστεί κατά την επικύρωση ή έχει προβλεφθεί στη βιοαναλυτική έκθεση αυτής. Ωστόσο η επανεέγχυση ενός πλήρους αναλυτικού γύρου ή ενός μεμονωμένου προτύπου βαθμονόμησης ή ενός δείγματος ελέγχου ποιότητας απλώς και μόνο λόγω αστοχίας των προτύπων βαθμονόμησης ή των δειγμάτων ελέγχου ποιότητας χωρίς να υπάρχει κάποιο αναγνωρισμένο αναλυτικό αίτιο δεν είναι αποδεκτή. [58]

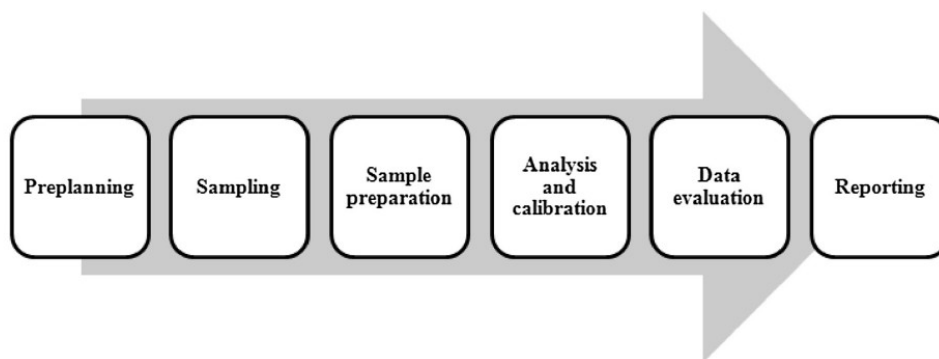
2.9.6 Ολοκλήρωση χρωματογραφήματος

Η ολοκλήρωση των χρωματογραφημάτων, καθώς και η επανολοκλήρωσή τους θα πρέπει να περιγράφεται σε ένα πλάνο μελέτης, ένα πρωτόκολλο ή μία τυπική διαδικασία λειτουργίας (SOP). Κάθε παρέκκλιση από την *a priori* περιγεγραμμένη τακτική θα πρέπει να αναλύεται στη βιοαναλυτική έκθεση. Η έκθεση θα πρέπει να περιλαμβάνει τη λίστα των χρωματογραφημάτων που απαιτούν επανολοκλήρωση (μεταξύ αυτών και όσα απαιτούν χειροκίνητη ολοκλήρωση – ολοκλήρωση από τον χειριστή), καθώς και τους λόγους της απαίτησης αυτής. [58]

Κεφάλαιο 3 Αναλυτικές τεχνικές

3.1 Εισαγωγικά στοιχεία

Η βιοανάλυση αποτελεί πρόκληση για έναν αναλυτικό τοξικολόγο, εξαιτίας της πολυπλοκότητας των υποστρωμάτων των δειγμάτων. Είναι γνωστό ότι δείγματα σε σύνθετα υποστρώματα, όπως αίμα, πλάσμα ή ορό αίματος και ούρα, απαιτούν εντατική και μεθοδευμένη προκατεργασία πριν από την έγχυσή τους στα αναλυτικά όργανα. Στη σύγχρονη βιοανάλυση αναγκαία στοιχεία είναι η προκατεργασία δειγμάτων υψηλής διεκπεραιωτικής ικανότητας (*high-throughput*) και τα αναλυτικά όργανα που εφαρμόζουν συζευγμένες τεχνικές. Η υγρή χρωματογραφία (*LC*) συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά (*MS/MS*) χρησιμοποιείται εδώ και πολύ καιρό στη βιοανάλυση φαρμακευτικών ουσιών, καθιστώντας σαφή τη σημασία της συνδυαστικής αυτής τεχνικής. Η επικύρωση των χρησιμοποιούμενων μεθόδων είναι το σημαντικότερο κομμάτι σε κανονιστικό επίπεδο, ενώ είναι απαραίτητη προκειμένου να αποδειχθεί η αναλυτική της επίδοση. Η βιοαναλυτική ροή εργασιών περιλαμβάνει πολλά στάδια, από τη συλλογή του δείγματος, μέχρι την ανάλυσή του και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων. [77]



Σχήμα 3.1: Σχηματικό διάγραμμα ροής εργασιών στη βιοανάλυση. [77]

Καθοριστικός, *ab initio* (εξ αρχής) παράγοντας είναι η λήψη αντιπροσωπευτικού κυρίως δείγματος από το υπό εξέταση υποκείμενο ή αντικείμενο, μέσω κατάλληλης διαδικασίας δειγματοληψίας. Από το κυρίως δείγμα μπορεί να δημιουργηθεί ένα μικρότερο ομοιογενές εργαστηριακό δείγμα, το οποίο θα πρέπει να έχει την ίδια σύσταση με αυτό. Για τις περαιτέρω αναλύσεις χρησιμοποιούνται κλάσματα του εργαστηριακού δείγματος. Εκτός όμως από τη συνετή επιλογή του δείγματος, σημαντικός είναι και ο ορθός τρόπος αποθήκευσής του. Μετά τη συλλογή του, η αρχική του σύσταση ενδέχεται να μεταβληθεί με την πάροδο του χρόνου, λόγω φυσικών, χημικών ή βιολογικών διεργασιών (π.χ. μέσω αντίδρασης συστατικών του με τον αέρα ή μέσω αλληλεπίδρασης με το δοχείο αποθήκευσης ή εγγενούς δραστηριότητας των συστατικών του μεταξύ τους). Όσον αφορά στο στάδιο της προκατεργασία και ανάλυσης, είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται όλες οι ποιοτικές και

ποσοτικές τεχνικές προκατεργασίας των δειγμάτων (καθαρισμοί ή/και εκχυλίσεις) και η ταυτοποίηση και η ποσοτικοποίηση των αναλυτών στόχων. [3],[111],[112],[113]

3.2 Προκατεργασία βιολογικών δειγμάτων

Ο ποιοτικός προσδιορισμός ενός αναλύτη στόχου (ή περισσότερων) δεν θα έχει κανένα νόημα εάν το χρησιμοποιούμενο δείγμα δεν είναι “κατάλληλο”. Για τον σκοπό αυτό, από τη στιγμή της λήψης του μέχρι την εισαγωγή του στο αναλυτικό όργανο, το δείγμα διέρχεται από διάφορα στάδια, από τα οποία το πλέον καθοριστικό και επίπονο είναι η προκατεργασία. [111],[112]

Η προκατεργασία ενός δείγματος αποτελεί το σύνολο των διαδικασιών που απαιτούνται για τη μετατροπή ενός αντιπροσωπευτικού κυρίως δείγματος σε δείγμα κατάλληλο για χημική ανάλυση.

Ο όρος αναφέρεται μεταξύ άλλων στα βήματα που απαιτούνται για την τροποποίηση του υποστρώματος και την απελευθέρωση και απομόνωση του αναλύτη στόχου και μπορεί να περιλαμβάνουν τη διάλυση, τη διήθηση, τη φυγοκέντρωση ή την εξάτμιση του δείγματος, την απομάκρυνση/κατακρήμνιση πρωτεϊνών, την εκχύλιση, την παραγωγοποίηση του αναλύτη (σχηματισμός χημικών παραγώγων του) από ένα σύνθετο υπόστρωμα σε έναν διαλύτη συμβατό με το αναλυτικό όργανο που θα χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό του, την προσυγκέντρωση του αναλύτη (συγκέντρωση αραιού αναλύτη σε μετρήσιμα επίπεδα), τη χημική μετατροπή του αναλύτη σε ανιχνεύσιμη μορφή για την επακόλουθη μέθοδο προσδιορισμού του και απομάκρυνση ή κάλυψη ουσιών που δύναται να παρεμποδίσουν την ανάλυση. [111],[112],[114]

Πολλά ανόργανα υλικά μπορούν για παράδειγμα να διαλυθούν σε ισχυρά οξέα με θέρμανση, ενώ τα οργανικά υλικά μπορούν να διασπαστούν με υγρή αποτέφρωση σε πυκνό και θερμό οξύ ή ξηρή αποτέφρωση μέσω θέρμανσης. Οι αναλύτες στόχοι μπορούν να διαχωριστούν από σύνθετα υποστρώματα - δείγματα με τεχνικές υγρής-υγρής εκχύλισης, εκχύλισης στερεάς φάσης, εκχύλισης με υπερκρίσιμα ρευστά κ.ά.. Αραιοί ιοντικοί αναλύτες στόχοι μπορούν να προσυγκεντρωθούν με προσρόφηση σε ρητίνη ιονανταλλαγής, ενώ οι μη ιοντικοί με εκχύλιση στερεάς φάσης. Τα βιολογικά δείγματα - βιολογικά υγρά (όπως το πλάσμα, ο ορός, το ολικό αίμα και τα ούρα) και ιστοί - αποτελούν σύνθετα υποστρώματα και απαιτούν καθαρισμό πριν από την έγχυσή τους στα αναλυτικά όργανα. Συνήθεις πρακτικές αποτελούν η κατακρήμνιση πρωτεϊνών (*Protein precipitation, PPT*), η υγρή - υγρή εκχύλιση (*Liquid-Liquid Extraction, LLE*) και η εκχύλιση στερεάς φάσης (*Solid phase extraction, SPE*). [77],[112]

Το στάδιο της προκατεργασίας των δειγμάτων είναι ζωτικής σημασίας και ίσως το πιο κρίσιμο στην αναλυτική διαδικασία κάθε σχετικής εφαρμογής (βιοανάλυση, δικανική τοξικολογία, ανάλυση τροφίμων, περιβαλλοντική παρακολούθηση κ.ά.). Επιπλέον είναι ο καθοριστικός παράγοντας, που προσδιορίζει τον συνολικό χρόνο, που απαιτείται για την ολοκλήρωση των αναλύσεων, όντας το πιο χρονοβόρο τμήμα μιας αναλυτικής πορείας, ευάλωτο και επιρρεπές σε πιθανά σφάλματα, καθώς συνήθως αποτελείται από πολλά

επιμέρους στάδια, σε κάθε ένα από τα οποία μπορούν να παρατηρηθούν απώλειες των συστατικών ή προσθήκες προσμίξεων από τα αντιδραστήρια και τους διαλύτες που χρησιμοποιούνται. [111],[114]

Αναμφίβολα, ιδανική περίπτωση θα αποτελούσε η απευθείας έγχυση της απαιτούμενης ποσότητας δείγματος στο εκάστοτε αναλυτικό όργανο χωρίς προκατεργασία. Ωστόσο, χάρη στη σύγχρονη τεχνολογική ανάπτυξη έχουν δημιουργηθεί ιδιαίτερα εξελιγμένα και ευαίσθητα αναλυτικά όργανα, με αποτέλεσμα κάτι τέτοιο να μην καθίσταται συνήθως εφικτό, επειδή η φύση και η συνθετότητα των περισσότερων υποστρωμάτων, ιδιαίτερα στον κλάδο της αναλυτικής τοξικολογίας όπου τα επίπεδα ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης τοξικών ουσιών είναι συνήθως πολύ χαμηλά, δημιουργούν ιδιαίτερες πολυπλοκότητες στην παραγωγή και την ερμηνεία των αναλυτικών αποτελεσμάτων. [114]

Έτσι λοιπόν, θα πρέπει από την πλευρά των αναλυτικών χημικών να σταθμιστούν όλοι οι παραπάνω παράγοντες και να αναπτυχθεί και να εφαρμοστεί ένα κατάλληλο πρωτόκολλο για την προκατεργασία των δειγμάτων, το οποίο να διασφαλίζει ότι η σύσταση του αρχικού, κυρίως δείγματος παραμένει σταθερή, όλες οι δυνητικές παρεμποδίσεις έχουν αρθεί, δεν έχει επιμολυνθεί κατά τον χειρισμό του, η συγκέντρωση του αναλύτη στόχου δεν βρίσκεται μόνο σε ανιχνεύσιμα επίπεδα, αλλά μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ικανοποιητική ακρίβεια (ορθότητα και πιστότητα) και ότι το υπόστρωμα του δείγματος είναι συμβατό με την σκοπούμενη προς εφαρμογή αναλυτική τεχνική (*"fit for the intended purpose"*). [114]

Υπάρχουν διαθέσιμες πολλές τεχνικές προκατεργασίας, οι οποίες μπορούν να εξασφαλίσουν τα περισσότερα, αν όχι όλα από τα παραπάνω. Για την επιλογή των καταλληλότερων για τη σκοπούμενη εφαρμογή, αποφασιστικό ρόλο παίζουν οι φυσικοχημικές ιδιότητες, τόσο των επιθυμητών ενώσεων, όσο και των ενώσεων που παρεμποδίζουν, η φυσική κατάσταση του δείγματος, αλλά και η διαθέσιμη σε κάθε εργαστήριο απαιτούμενη οργανολογία. [111],[114]

Τέλος, οι απαιτήσεις της *Πράσινης Αναλυτικής Χημείας* καθορίζουν και αυτές με τη σειρά τους τις επιλεγείσες αναλυτικές επιλογές και εφαρμογές. Για παράδειγμα, αναφορικά με τα δείγματα, ειδικά στην περίπτωση των βιοαναλυτικών εφαρμογών στην Τοξικολογία, η τάση είναι να χρησιμοποιούνται μικρότερες ποσότητες ([19],[25],[115],[116],[117]), ενώ ιδιαίτερη έμφαση δίνεται στην ασφάλεια του αναλυτή, στη χρήση όσο το δυνατό λιγότερο τοξικών αντιδραστηρίων σε μικρότερους όγκους (προς αντικατάσταση άλλων, δυνητικά πιο επιβλαβών) και στη μείωση των παραγόμενων από τις αναλυτικές διαδικασίες αποβλήτων. Σε ότι αφορά τη σύγχρονη οργανολογία, υπάρχει η τάση αυτοματοποίησης με την κατασκευή και χρήση οργάνων υψηλής διεκπεραιωτικής ικανότητας (*high-throughput*), με χρήση αυτόματων δειγματοληπτών και ρομποτικών διατάξεων, με ταυτόχρονη προσπάθεια περιορισμού του μεγέθους τους. [111]

3.3 Κατακρήμνιση πρωτεϊνών και χημική δέσμευση φωσφολιπιδίων

Τα βιολογικά υποστρώματα περιέχουν σε μικρότερο ή μεγαλύτερο ποσοστό πρωτεΐνες⁷. Οι πρωτεΐνες αυτές θα πρέπει να απομακρύνονται από το δείγμα στο στάδιο της προκατεργασίας του, και ιδιαίτερα στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας (*HPLC*), όπου παρουσία οργανικού διαλύτη καθιζάνουν στην κινητή φάση, δεσμεύονται μη εκλεκτικά και μη αναστρέψιμα ή μετουσιώνονται από τις ελεύθερες σιλανόλες στην επιφάνεια του υλικού της χρωματογραφικής στήλης. [101]

Λόγω του μεγέθους τους προσροφώνται ή καταβυθίζονται στην εξωτερική επιφάνεια της πορώδους στατικής φάσης, όπου και μπλοκάρουν την πρόσβαση στους πόρους με αποτέλεσμα να ελαττώνονται οι θέσεις προσρόφησης και έτσι να προκαλείται μη αναστρέψιμη αύξηση της πίεσης, ελάττωση της χωρητικότητας της στήλης, μείωση της εκλεκτικότητας (καθώς τα αμινοξέα των προσροφημένων πρωτεϊνών μεταβάλλουν την επιφάνεια του υποστρώματος) και τελικά καταστροφή της στήλης. [101]

Οι συμβατικές τεχνικές προκατεργασίας για απομάκρυνση πρωτεϊνών περιλαμβάνουν τη μετουσίωσή τους με προσθήκη αναμιξιμού οργανικού διαλύτη, όπως μεθανόλη (CH_3OH), ακετόνη (CH_3COCH_3) ή ακετονιτρίλιο (CH_3CN), αλάτων (π.χ. NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), μεταλλικών ιόντων (π.χ. ZnSO_4) ή με ελάττωση του pH (π.χ. με HClO_4 ή CCl_3COOH) και ακολούθως φυγοκέντρωση. Οι τεχνικές αυτές κατακρήμνιση πρωτεϊνών είναι γρήγορες και απλές, ενώ μπορούν να εφαρμοστούν, τόσο για υδρόφιλες, όσο και για υδρόφοβες ενώσεις, ακολουθούμενες από υγρή - υγρή εκχύλιση ή εκχύλιση στερεάς φάσης, ώστε να επιτευχθούν υψηλότερες αποδόσεις. Εντούτοις έχουν το μειονέκτημα ότι κατά την καταβύθιση μπορεί να παρασυρθούν και να καταβυθιστούν και τα συστατικά, των οποίων η ανάλυση ενδιαφέρει ή να εγκλειστούν στο ίζημα. [77],[101],[118]

Τα φωσφολιπίδια βρίσκονται σε όλα τα κύτταρα ως βασικό συστατικό των μεμβρανών τους και κατά συνέπεια υπάρχουν σε όλα τα βιολογικά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένων του ορού, του πλάσματος, του ολικού αίματος και των ούρων⁸. Τέτοιου είδους μόρια δύνανται να παρεμποδίσουν την ανάλυση μικρών μορίων, στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά (*LC-MS/MS*) (βλ. §2.8.15.1), καθώς συχνά συνεκλούνται με τον αναλύτη στόχο. Έτσι,

7 Στα ούρα, οι πρωτεΐνες υπό φυσιολογικές συνθήκες προέρχονται κυρίως από αποιπωτικά επιθηλιακά κύτταρα του ουροποιητικού συστήματος μετά τους νεφρούς, καθώς εκεί πραγματοποιείται διήθηση του αίματος και περνούν ελάχιστα πρωτεϊνικά μόρια (βλ. §1.3.2). Αντίθετα, σε περιπτώσεις τοξικότητας και νεφροπάθειας, λόγω βλάβης των νεφρών το ποσοστό πρωτεϊνών στα ούρα δύνανται να είναι αυξημένο. [118]

8 Φυσιολογικά, η περιεκτικότητα των ούρων σε λιπίδια είναι μικρή, αλλά μπορεί να αυξηθεί σε ορισμένες νεφρικές παθήσεις και το φαινόμενο καλείται λιπιδουρία. Οι συγκεντρώσεις συγκεκριμένων λιπιδικών ειδών εξαρτώνται από το είδος της πάθησης, αλλά γενικά είναι αρκετά χαμηλές. Άλλες μελέτες έχουν δείξει ότι φωσφολιπίδια, τα οποία βρίσκονται σε αφθονία στις μεμβράνες των νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων είναι ανιχνεύσιμα σε ασθενείς που εμφανίζουν λιθίαση νεφρού. Επιπλέον, αρκετές μελέτες σε ζώα έχουν δείξει ότι η φωσφολιπιδουρία είναι αποτέλεσμα κατεστραμμένων μεμβρανών νεφρικών επιθηλιακών κυττάρων, μετά από έκθεση των ζώων σε ορισμένα φάρμακα ή τοξικές χημικές ουσίες. [119], [120]

προκειμένου να εξασφαλιστεί ολική απομάκρυνσή τους μπορεί να ακολουθήσει καθαρισμός των δειγμάτων με ειδικές μικροστήλες, οι οποίες συγκρατούν εκλεκτικά τα φωσφολιπίδια (βλ. 4.2). [77],[121]

3.4 Τεχνικές εκχύλισης

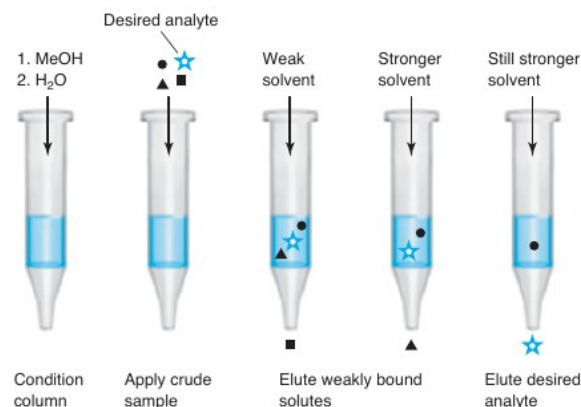
Οι τεχνικές εκχύλισης αποτελούν ένα πολύ ισχυρό εργαλείο στα χέρια των αναλυτών. Συνήθως στηρίζονται σε τεχνικές εκχύλισης με βάση αλληλεπιδράσεις των συστατικών του δείγματος με διαλύτες ή στερεά προσροφητικά υλικά, που μπορούν να βελτιωθούν και να ενισχυθούν με εφαρμογή πίεσης ή θερμοκρασίας, με ενέργεια μικροκυμάτων, υπερήχων, φυγοκέντρισης ή έντονης ανάδευσης. [111],[114]

Μπορούν να εφαρμοστούν στη συμβατική τους μορφή, με καλύτερα ίσως αποτελέσματα ανακτήσεων και καθαρισμού, ή ως τεχνικές μικροεκχύλισης που ανταπεξέρχονται πλήρως στις απαιτήσεις της *Πράσινης Αναλυτικής Χημείας*. Τέτοιες αποτελούν η υγρή - υγρή εκχύλιση (*Liquid-Liquid Extraction, LLE*), η εκχύλιση στερεάς φάσης (*Solid Phase Extraction, SPE*), η εκχύλιση στερεού-υγρού (*Solid-Liquid Extraction, SLE*), η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά με στήλη (*Disposable Pipette Extraction, DPX*), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης στον υπερκείμενο χώρο (*Headspace-Solid phase microextraction, HS-SPME*) και η εκχύλιση με την τεχνική *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe extraction*). [111],[114]

3.4.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης

Πρόκειται για την πιο διαδεδομένη μέθοδο προκατεργασίας δειγμάτων σήμερα, επειδή προσφέρει υψηλά ποσοστά ανάκτησης, έχει καλή επαναληψιμότητα, είναι οικονομική, εύκολη στην εφαρμογή της, αυτοματοποιημένη, καλύπτει σε μεγάλο βαθμό τις απαιτήσεις της *Πράσινης Αναλυτικής Χημείας* χρησιμοποιώντας μικρό όγκο διαλυτών και είναι κατάλληλη για τη μετέπειτα ανάλυση με διάφορες τεχνικές χρωματογραφίας (*HPLC, GC* κ.ά.). Η εκχύλιση στερεάς φάσης έχει το πλεονέκτημα του διαχωρισμού και της προσυγκέντρωσης του αναλύτη στόχου (ενός ή περισσότερων) που βρίσκεται στα βιολογικά δείγματα σε ίχνη, άροντας ταυτόχρονα τις όποιες παρεμποδίσεις από συστατικά του υποστρώματος, απομακρύνοντάς τα. [77],[101]

Η αρχή της εκχύλισης στερεάς φάσης (*Solid phase extraction, SPE*) περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε δύο φάσεις, τη στερεά φάση που αποτελεί το προσροφητικό υλικό και την υγρή που αποτελεί το υπόστρωμα με όλες τις παρεμποδίσεις. Οι προσδιοριζόμενες ενώσεις πρέπει να εμφανίζουν μεγαλύτερη συγγένεια με τις ομάδες της στερεάς φάσης, έτσι ώστε να διαχωριστούν. Η παραλαβή των ενώσεων από το στερεό υπόστρωμα γίνεται με την επιλογή κατάλληλων διαλυτών. Οι διαμοριακές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των προσδιοριζόμενων συστατικών, των ενεργών ομάδων στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού και της υγρής φάσης του υποστρώματος του δείγματος ή του διαλύτη, είναι υπεύθυνες για τους διάφορους μηχανισμούς συγκράτησης και έκλουσης των ενώσεων. [101]



Σχήμα 3.2: Τα τυπικά στάδια εκχύλισης στερεάς φάσης. Η περίπτωση αφορά στην απομόνωση στεροειδών από ούρα. [113]

Στην SPE χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης παρόμοια με αυτά που χρησιμοποιούνται στην HPLC, αλλά σε άλλη κοκκομετρική σύσταση. Οι μηχανισμοί διαχωρισμού περιλαμβάνουν:

- ✕ την SPE αντίστροφης/ανάστροφης φάσης (*Reversed-Phase, RP-SPE*), για μη πολικές ενώσεις σε πολικά διαλύματα με χρήση μη πολικού προσροφητικού υλικού, όπως κυκλοεξυλο-, οκτυλο-, δεκαοκτυλο σιλάνιο (C6, C8 & C18 αντίστοιχα). Γενικά οι αναλύτες είναι μερικώς πολικοί προς μη πολικοί και ο διαχωρισμός βασίζεται στην εμφάνιση ελκτικών δυνάμεων *van der Waals* ή δυνάμεων διασποράς μεταξύ αυτών και του προσροφητικού υλικού. Η παραλαβή της επιθυμητής ένωσης στη συνέχεια γίνεται με χρήση κατάλληλου διαλύτη. Τυπικές εφαρμογές της τεχνικής *RP-SPE* αποτελούν τα φάρμακα σε βιολογικά υγρά και οι περιβαλλοντικοί ρυπαντές στο νερό. Αυτός ο τύπος SPE είναι λιγότερο εκλεκτικός συγκριτικά με του δύο ακόλουθους (*SPE κανονικής φάσης & SPE με ιονανταλλαγή*). [77],[101]
- ✕ την *SPE κανονικής φάσης (Normal-Phase, NP-SPE)*, η οποία εφαρμόζεται για πολικές ενώσεις σε μη πολικά διαλύματα, χρησιμοποιώντας πολικά προσροφητικά υλικά, όπως διοξείδιο του πυριτίου (στο εξής ΔΠ) (*silica*) με πολικές λειτουργικές ομάδες (*Si-CN, Si-NH₂, Si-Diol* και καθαρό ΔΠ). Ο μηχανισμός συγκράτησης στηρίζεται στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου μεταξύ των σωματιδίων του αναλύτη στόχου και του δεσμευμένου προσροφητικού. [77],[101]
- ✕ την *SPE με ιονανταλλαγή (Ion (anion and cation)-exchange SPE)*, η οποία χρησιμοποιείται για αναλύτες, που βρίσκονται σε ιοντική μορφή. Ο κύριος μηχανισμός συγκράτησης της ένωσης βασίζεται στις ηλεκτροστατικές έλξεις της φορτισμένης δραστικής ομάδας του συστατικού προς τις φορτισμένες ομάδες, οι οποίες είναι συνδεδεμένες στο υπόστρωμα ΔΠ. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται σουλφονυλο-, καρβοξυλο-, διαιθυλαμινο- και τριμεθυλαμινοομάδες, για τη δημιουργία δεσμευμένης φάσης. Για τη συγκράτηση μιας ένωσης στον ιονανταλλάκτη από ένα υδατικό διάλυμα πρέπει το pH του

δείγματος να είναι τέτοιο, ώστε και η προσδιοριζόμενη ένωση και η δραστική ομάδα που είναι προσδεμένη στο προσροφητικό υλικό να είναι φορτισμένες. Για την αποδέσμευση των συστατικών αρκεί είτε αυτά είτε το υπόστρωμα να βρίσκονται σε μη ιονισμένη μορφή. Εναλλακτικά χρησιμοποιείται διάλυμα υψηλής ιοντικής ισχύος ή διάλυμα το οποίο περιέχει ιόντα που δρώντας ανταγωνιστικά αντικαθιστούν την ένωση. [101]

3.5 Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί

Ο όρος χρωματογραφία αποδίδεται σε μία μεγάλη ποικιλία μεθόδων, οι οποίες βοηθούν στον διαχωρισμό ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες από σύνθετα μείγματα. Πρόκειται για μία πολύ ισχυρή διαχωριστική τεχνική, η οποία βρίσκει εφαρμογή σε κάθε κλάδο της επιστήμης.⁹

3.5.1 Αρχή και γενική περιγραφή της χρωματογραφίας

Σε όλους τους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς το δείγμα κινείται σε μία *κινητή φάση* (*mobile phase*), η οποία μπορεί να είναι ένα υγρό, ένα αέριο ή ένα υπερκρίσιμο ρευστό. Στη συνέχεια, η κινητή φάση εξαναγκάζεται να διέλθει μέσω μιας *στατικής φάσης* (*stationary phase*), η οποία είναι καθηλωμένη σε μία στήλη ή σε μία στερεή επιφάνεια. Οι δύο φάσεις επιλέγονται έτσι, ώστε τα συστατικά του δείγματος να κατανέμονται μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης σε διαφορετικό βαθμό. Τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση κινούνται αργά κατά τη ροή της κινητής φάσης. Αντίθετα, τα συστατικά τα οποία κατακρατούνται ασθενέστερα από τη στατική φάση, κινούνται ταχύτερα. Ως αποτέλεσμα αυτών των διαφορών στην ευκινησία, τα συστατικά του μείγματος διαχωρίζονται, καταλαμβάνοντας το καθένα ξεχωριστές ζώνες, απ' όπου στη συνέχεια μπορούν να προσδιοριστούν ποιοτικά ή/και ποσοτικά. [122]

Η ισορροπία κατανομής, που εμπλέκεται στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς περιγράφεται από την εξίσωση κατανομής του αναλύτη μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Για μία διαλυμένη ουσία A λοιπόν θα ισχύει:

$$A_{\text{κινητή}} \rightleftharpoons A_{\text{στατική}}$$

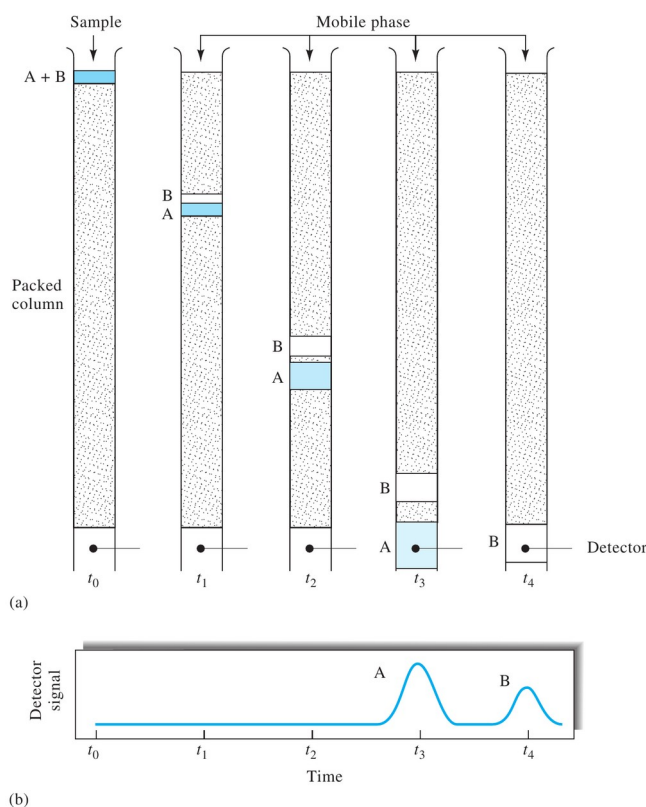
Η σταθερά ισορροπίας για τη δυναμική αυτή κατάσταση ονομάζεται *συντελεστής κατανομής* K ορίζεται ως:

⁹ Από το 1937 έως το 1972 δόθηκαν 12 βραβεία Νόμπελ σε επιστήμονες των οποίων η έρευνα βασίστηκε σε σημαντικό βαθμό σε χρωματογραφικές μεθόδους. [122]

$$K = \frac{[A_{\text{στατική}}]}{[A_{\text{κινητή}}]} \quad (11)$$

όπου $[A_{\text{στατική}}]$ και $[A_{\text{κινητή}}]$ οι γραμμομοριακές συγκεντρώσεις της ουσίας στη στατική και στην κινητή φάση αντίστοιχα.

Στην ιδανική περίπτωση η τιμή του συντελεστή K παραμένει σταθερή σε μία ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων της ουσίας, δηλαδή η $A_{\text{στατική}}$ είναι ευθέως ανάλογη της $A_{\text{κινητή}}$.¹⁰



Σχήμα 3.3: Η ιδέα πίσω από τη χρωματογραφία: a. Η ουσία A διαθέτοντας μικρότερη συγγένεια με τη στατική φάση σε σχέση με την ουσία B, εξέρχεται πρώτη από στήλη. b. Η απεικόνιση του σήματος του ανιχνευτή στα διάφορα στάδια έκλουσης του τμήματος a. [123]

Μία θεμελιώδης ταξινόμηση των χρωματογραφικών μεθόδων βασίζεται στον τύπο των κινητών φάσεων, οπότε προκύπτουν οι τρεις γενικές κατηγορίες χρωματογραφιών:

1. η *υγρή χρωματογραφία* (*Liquid Chromatography, LC*), όπου η κινητή φάση είναι κάποιο υγρό

¹⁰ Η χρωματογραφία στην οποία ισχύει η εξίσωση αυτή ονομάζεται γραμμική χρωματογραφία και χαρακτηρίζεται από συμμετρικές κορυφές τύπου *Gauss* (κανονικές κατανομές), καθώς επίσης και από χρόνους ανεξάρτητους από την ποσότητα της διαχωριζόμενης ουσίας. [123]

2. η *αέρια χρωματογραφία* (*Gas Chromatography, GC*), όπου η κινητή φάση είναι κάποιο αέριο
3. η *χρωματογραφία υπερκρίσιμων ρευστών* (*Supercritical Fluid Chromatography, SFC*), όπου η κινητή φάση είναι κάποιο υπερκρίσιμο ρευστό

Μία άλλη βασική ταξινόμηση μπορεί να γίνει σύμφωνα με τον μηχανισμό αλληλεπίδρασης της διαλυμένης ουσίας με τη στατική φάση, οπότε προκύπτουν η *χρωματογραφία κατανομής*¹¹, η *χρωματογραφία προσρόφησης* (αλλιώς *χρωματογραφία υγρής - στερεάς φάσης*), η *χρωματογραφία ιονανταλλαγής*, η *χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού* (αλλιώς *χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους* ή *χρωματογραφία πηκτής*) και η *χρωματογραφία συγγένειας*. [123]

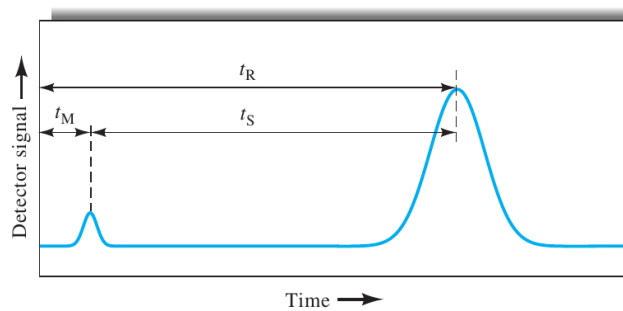
Η έκλυση των συστατικών - ουσιών ενός μείγματος μέσω χρωματογραφικής στήλης συνίσταται στην παραλαβή των σωματιδίων (μορίων ή ιόντων) του κάθε συστατικού με συνεχή διέλευση της κινητής φάσης δια μέσου της στήλης, όπου βρίσκεται η στατική φάση. Αρχικά, προστίθεται μία και μοναδική ποσότητα του μείγματος στην αρχή της στήλης, οπότε τα συστατικά του κατανέμονται μεταξύ των δύο φάσεων. Καθώς προστίθεται νέα ποσότητα κινητής φάσης, πραγματοποιείται νέα κατανομή των συστατικών του μείγματος μεταξύ της κινητής φάσης και νέου τμήματος της στατικής. Ταυτόχρονα, πραγματοποιείται κατανομή μεταξύ της καθαρής κινητής φάσης και της στατικής στη θέση στην οποία βρισκόταν το αρχικό μείγμα.

Καθώς εξακολουθεί η ροή νέας ποσότητας κινητής φάσης, μόρια των εκλουόμενων ουσιών μετακινούνται προς την έξοδο της στήλης με μία σειρά συνεχών μεταφορών μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Η κίνηση κάθε ουσίας πραγματοποιείται μόνο στην κινητή φάση, με συνέπεια η μέση ταχύτητα μετακίνησης της αντιστοιχίας ζώνης προς την έξοδο να εξαρτάται από το χρονικό κλάσμα παραμονής της ουσίας στη φάση αυτή. Το κλάσμα αυτό είναι μικρό για τις ουσίες οι οποίες κατακρατούνται ισχυρότερα από τη στατική φάση και μεγάλο για εκείνες οι οποίες κατακρατούνται ισχυρότερα από την κινητή. Στην ιδανική περίπτωση οι διαφορές ταχύτητας διαχωρίζουν τα συστατικά του μείγματος σε ζώνες κατά μήκος της στήλης. Απομόνωση των ουσιών επιτυγχάνεται με το πέρασμα αρκετής ποσότητας κινητής φάσης, μέσω της στήλης, ώστε να εξέλθει από τη στήλη η κάθε ζώνη, οπότε και να συλλεχθεί και να ανιχνευθεί.

Εάν ένας ανιχνευτής, ο οποίος αποκρίνεται στη συγκέντρωση των διαλυμένων ουσιών τοποθετηθεί στην έξοδο της στήλης και το σήμα του καταγράφεται συναρτήσει του χρόνου, λαμβάνεται σειρά κορυφών, οι οποίες αντιστοιχούν στις εξερχόμενες χρωματογραφικές ζώνες και αποτυπώνουν την κατανομή των ουσιών εντός τους. Ένα τέτοιο διάγραμμα ονομάζεται χρωματογράφημα και δύναται να είναι ιδιαίτερα χρήσιμο τόσο για την ποιοτική, όσο και για την ποσοτική ανάλυση των συστατικών του μείγματος. Οι θέσεις των κορυφών ως προς τον άξονα του χρόνου εξυπηρετούν στην ταυτοποίηση των συστατικών του μείγματος, ενώ το ύψος ή το εμβαδό κάθε κορυφής αποτελεί ποσοτικό μέτρο κάθε συστατικού.

11 Οι *Archer John Porter Martin & Richard Laurence Millington Synge* τιμήθηκαν το 1952 με το βραβείο *Νόμπελ Χημείας* για την εφεύρεση της *χρωματογραφίας κατανομής*. [122]

Ο χρόνος που μεσολαβεί από τη στιγμή της έγχυσης του δείγματος μέχρι τη στιγμή που η ουσία φθάνει στον ανιχνευτή και αποτυπώνεται ως χρωματογραφική κορυφή ονομάζεται *χρόνος κατακράτησης* ή *χρόνος ανάσχεσης* (*retention time, t_R or RT*), ενώ ο αντίστοιχος χρόνος για μία ουσία η οποία δεν κατακρατείται συχνά αναφέρεται ως *νεκρός χρόνος* (*dead time, t_M*) και διευκολύνει στην ταυτοποίηση των κορυφών. Η ταχύτητα μετανάστευσης της μη κατακρατούμενης ουσίας είναι ίση προς τη μέση ταχύτητα των μορίων της κινητής φάσης. [122],[123]



Σχήμα 3.4: Τυπικό χρωματογράφημα ενός μείγματος δύο συστατικών. Η μικρή κορυφή στα αριστερά αντιστοιχεί στο έκλουσμα που δεν κατακρατείται στη στήλη, με συνέπεια να φθάνει στον ανιχνευτή σχεδόν αμέσως μετά την έναρξη της διαδικασία έκλουσης. [123]

3.5.2 Διεύρυνση ζώνης και αποδοτικότητα στήλης

Ένα σημαντικό γενικό χαρακτηριστικό της διαδικασίας ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού των συστατικών – αναλυτών ενός μείγματος είναι ότι το εύρος της ζώνης που αρχικά περιείχε τα συστατικά του μείγματος (στην είσοδο της στήλης)¹², είναι μικρότερο από το εύρος των ζωνών που περιέχουν τα διαχωρισμένα συστατικά στην έξοδο της στήλης. Το γεγονός αυτό σχεδόν πάντοτε συνεπάγεται την αραίωση των αναλυτών κατά τον διαχωρισμό. Η διεύρυνση των ζωνών (και κατ' επέκταση των αντίστοιχων χρωματογραφικών κορυφών) είναι αποτέλεσμα της πεπερασμένης ταχύτητας πραγματοποίησης διαφόρων διεργασιών μεταφοράς μάζας κατά τη μετανάστευση μιας ουσίας κατά μήκος της στήλης. Μερικές από τις ταχύτητες αυτές είναι δυνατό να ελεγχθούν με ρύθμιση ορισμένων πειραματικών μεταβλητών, γεγονός που επιτρέπει τη βελτίωση των διαχωρισμών.

Μία μαθηματική προσέγγιση της συμπεριφοράς των χρωματογραφικών στηλών, που χρησιμοποιεί τέτοιους όρους ως μεταβλητές, προκειμένου να περιγράψει δυνατούς τρόπους βελτίωσης της απόδοσης των χρωματογραφικών στηλών είναι η *εξίσωση van Deemter* (εξίσωση 12):

12 Ορισμένοι παράγοντες που υπάρχουν έξω από τη στήλη συνεισφέρουν στη διεύρυνση των ζωνών. Για παράδειγμα, μία ουσία δεν είναι δυνατόν να εισέλθει στη στήλη ως μία απειροελάχιστα στενή ζώνη, συνεπώς η ζώνη έχει ένα δεδομένο πλάτος, ακόμα και πριν εισέλθει στη στήλη. [112]

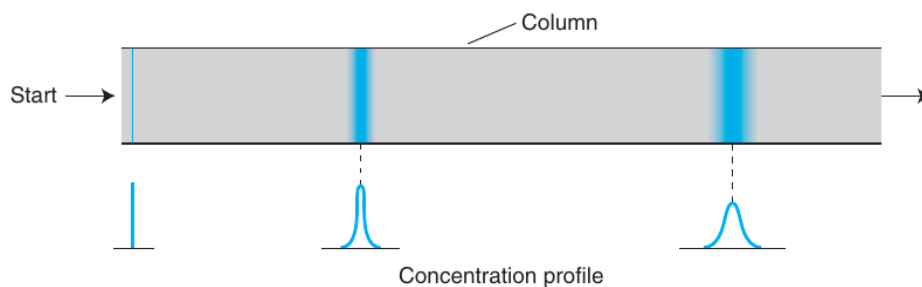
$$H = A + \frac{B}{u} + (C_S + C_M) u \quad (12)$$

όπου:

H , το ύψος πλάκας σε cm από τη θεωρία των πλακών των *Martin & Synge*. Η αύξηση της αποδοτικότητας μίας στήλης ισοδυναμεί με μείωση του ύψους πλάκας¹³. [122]

u , η γραμμική ταχύτητα της κινητής φάσης σε cm/s

A , B και C συντελεστές που σχετίζονται με φαινόμενα πολλαπλότητας διαδρομών ροής, διαμήκους διάχυσης και μεταφοράς μάζας μεταξύ φάσεων αντίστοιχα.



Σχήμα 3.5: Σχηματική αναπαράσταση της προοδευτικής διαπλάτυνσης μίας αρχικά λεπτής ζώνης εκλούσματος, καθώς κινείται κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης. [113]

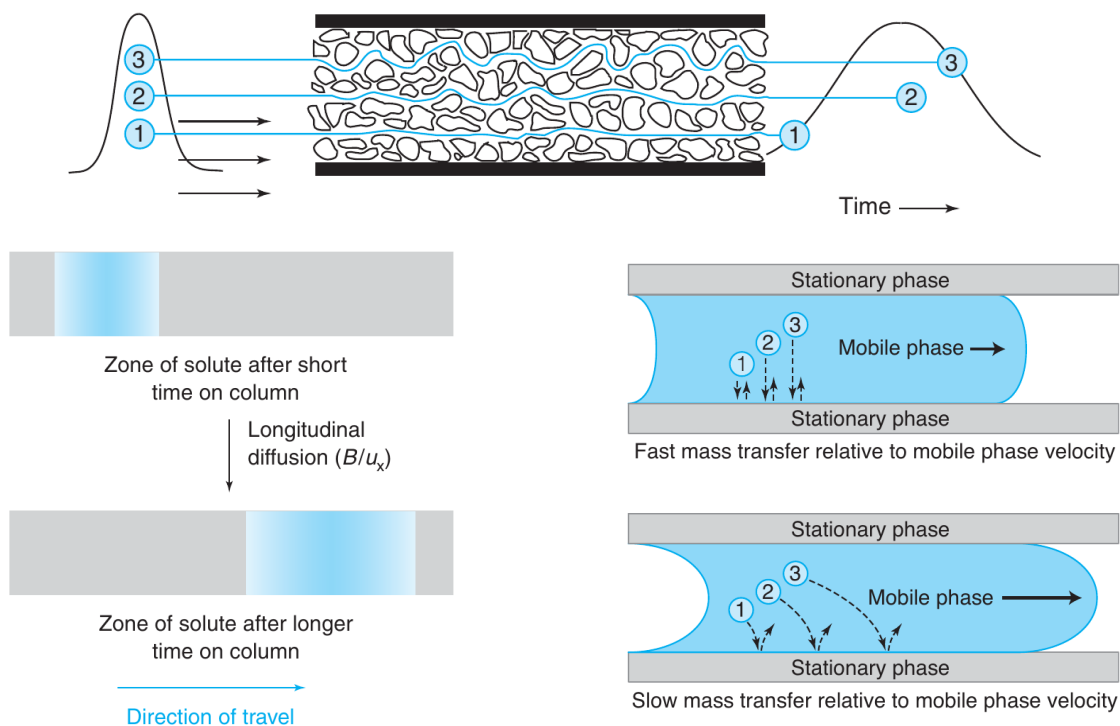
Οι όροι της εξίσωσης *van Deemter* (12) περιγράφουν κινητικές διεργασίες, οι οποίες συνεισφέρουν στη διεύρυνση των κορυφών και αναλύονται παρακάτω.

Πολλαπλότητα διαδρομών ροής - όρος A : Ένα σωματίδιο (μόριο ή ιόν) ενός αναλύτη μπορεί να ακολουθήσει διάφορες διαδρομές κατά μήκος της χρωματογραφικής στήλης, γεγονός που εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το μέγεθος, το σχήμα και την ομοιομορφία των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της (βλ. σχήμα 3.6). Το μήκος των διαδρομών αυτών μπορεί να διαφέρει σημαντικά, άρα και ο χρόνος παραμονής των μορίων ή ιόντων (της ίδιας ουσίας) στη στήλη, με αποτέλεσμα να φθάνουν στην έξοδο της κατά τη διάρκεια κάποιου χρονικού διαστήματος και όχι ταυτόχρονα. Το φαινόμενο αυτό συχνά αναφέρεται ως *διάχυση περιδίνησης* (*eddy diffusion*) και είναι ανάλογο προς τη διάμετρο των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης. Όσο μικρότερα τα σωματίδια του υλικού πλήρωσης,

¹³ Επειδή οι χρωματογραφικές ζώνες υποτίθεται πως έχουν τη μορφή καμπύλης *Gauss*, εξυπηρετεί να ορισθεί η αποδοτικότητα της στήλης σε μεταβλητότητα ανά μονάδα μήκους της στήλης ($H = \sigma^2 / L$). Οι *Martin & Synge* θεώρησαν τη χρωματογραφική στήλη ως ανάλογη με μία αποστακτική στήλη, η οποία αποτελείται από έναν αριθμό διακριτών, αλλά συνεχών στενών θαλάμων που ονομάζονται θεωρητικές πλάκες. Σε κάθε θάλαμο υποτίθεται ότι πραγματοποιείται μία πλήρης εξισορρόπηση μεταξύ της κινητής και της στατικής φάσης. Η κίνηση των ουσιών προς την έξοδο της στήλης θεωρείται ως βήμα προς βήμα μεταφορά της εξισορροπημένης κινητής φάσης από τη μία πλάκα στην άλλη. [122]

τόσο λιγότερο σημαντική η επίδραση της διεργασίας, η οποία δεν παρατηρείται σε ανοικτές στήλες. [112],[122]

Διαμήκης διάχυση - όρος B/u : Η διαμήκης διάχυση στη χρωματογραφική στήλη αποτελεί παράγοντα διεύρυνσης των χρωματογραφικών ζωνών (και κορυφών), λόγω διάχυσης της ουσίας από το πυκνό κέντρο της ζώνης προς το αραιότερο πρόσθιο και οπίσθιο τμήμα της, δηλαδή κατά την κατεύθυνση ροής της κινητής φάσης και αντίθετα προς αυτή (βλ. σχήμα 3.6). Η παρουσία της γραμμικής ταχύτητας (u) στον παρονομαστή του όρου υποδηλώνει ότι τα μεγέθη είναι αντιστρόφως ανάλογα. Όσο μεγαλύτερη ή γραμμική ροή της κινητής φάσης, τόσο λιγότερο χρόνο παραμένει ο αναλύτης στη στήλη, τόσο μικρότερη είναι η διαμήκης διάχυση, τόσο λιγότερη είναι η διεύρυνση της κορυφής λόγω της διάχυσης αυτής και το ύψος πλάκας (H) μικρότερο.¹⁴ [112],[122]



Σχήμα 3.6: Σχηματική απεικόνιση των φαινομένων που σχετίζονται με τους όρους της εξίσωσης Deemter. Επάνω ο όρος A, κάτω αριστερά ο όρος B/u και δεξιά ο όρος $(C_s + C_m)u$. [113]

Μεταφορά μάζας στη στατική και κινητή φάση - όρος $(C_s + C_m)u$: Η ανάγκη εισαγωγής των δύο συντελεστών μεταφοράς μάζας (C_s και C_m) οφείλεται στο ότι ο χρόνος που απαιτείται προκειμένου να εξισορροπηθεί η ουσία μεταξύ κινητής και στατικής φάσης είναι καθορισμένος (βλ. σχήμα 3.6). Η αποκατάσταση ισορροπίας μεταξύ κινητής και

14 Η επίδραση του όρου στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας είναι λιγότερο καθοριστική, επειδή οι συντελεστές διάχυσης στα υγρά είναι κατά πολλές τάξεις μεγέθους μικρότεροι απ' ό,τι στα αέρια. Στα περισσότερα υγρά ο όρος B/u είναι σχεδόν μηδενικός σε σχέση με τους άλλους όρους της εξίσωσης van Deemter. [122]

στατικής φάσης είναι τόσο αργή, με αποτέλεσμα η χρωματογραφική στήλη να λειτουργεί πάντοτε σε συνθήκες μη ισορροπίας. Συνεπώς τα σωματίδια του αναλύτη στο μέτωπο της ζώνης παρασύρονται πριν ακόμα βρουν τον χρόνο να εξισορροπήσουν με τη στατική φάση, ώστε να κατακρατηθούν. Ανάλογα, ισορροπία δεν επέρχεται ούτε στο οπίσθιο τμήμα της ζώνης (ουρά) και τα μόρια παραμένουν πίσω στη στατική φάση χωρίς να παρασυρθούν από την ταχέως κινούμενη κινητή φάση. [122]

Η διεύρυνση της ζώνης λόγω φαινομένων μεταφοράς μάζας οφείλεται στον μεγάλο αριθμό ρευμάτων στην κινητή φάση της στήλης και στη στοιβάδα της στατικής φάσης, με αποτέλεσμα και τα δύο να έχουν καθορισμένα εύρη. Συνεπώς, απαιτείται κάποιος χρονικό διάστημα, ώστε τα σωματίδια του αναλύτη να διαχυθούν από το εσωτερικό αυτών των φάσεων προς τη διεπιφάνειά τους, όπου και λαμβάνει χώρα η ανταλλαγή. Όσο μικρότερη η γραμμική ταχύτητα (u), τόσο πιο ολοκληρωμένη είναι η εξισορρόπηση, τόσο μικρότερη η διεύρυνση της ζώνης και το ύψος πλάκας (H) μικρότερο. Εάν οι ταχύτητες μεταφοράς μάζας ήταν άπειρες, δεν θα υπήρχε διεύρυνση αυτού του είδους. [112],[122]

3.5.3 Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης

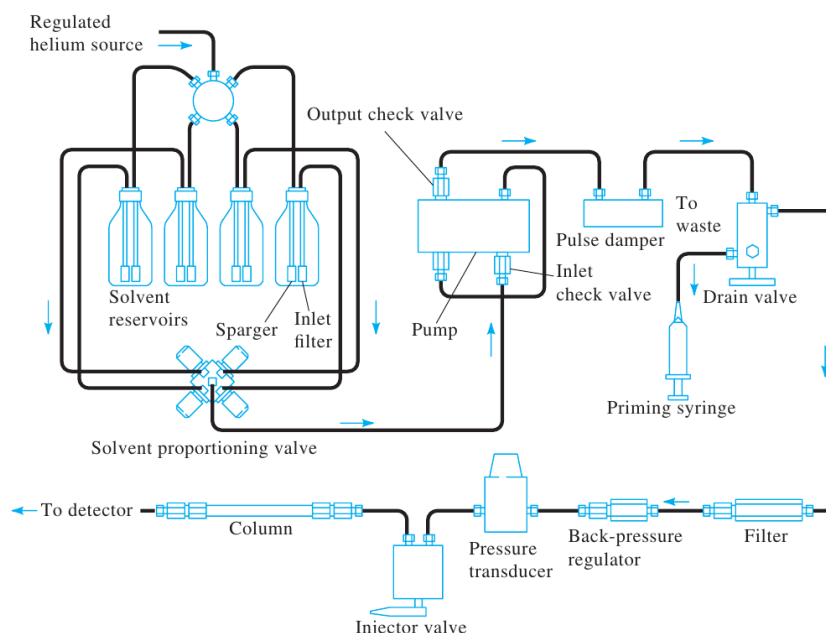
Αρχικά, η υγρή χρωματογραφία, συμπεριλαμβανομένης της πρωτοποριακής εργασίας του *M. Tswett*¹⁵, πραγματοποιείτο με υάλινες στήλες διαμέτρου 1 – 5cm και μήκους 50 – 500cm. Για την επίτευξη ρεαλιστικών ταχυτήτων ροής, η διάμετρος των σωματιδίων της στερεάς φάσης ήταν συνήθως 150 – 250 μ m. Ακόμα και έτσι οι ταχύτητες ροής ήταν μικρές, της τάξης των μερικών δεκάτων του χιλιοστόλιτρου ανά λεπτό, με αποτέλεσμα οι χρόνοι διαχωρισμού να είναι μεγάλη, φθάνοντας συχνά τις μερικές ώρες. Απόπειρες επιτάχυνσης με εφαρμογή κενού ή με άντληση, δεν ήταν αποτελεσματικές και οδηγούσαν σε ελαττωμένες αποδόσεις. [122]

Κατά τη διάρκεια της εξέλιξης της υγρής χρωματογραφίας, οι επιστήμονες κατάλαβαν ότι σημαντική βελτίωση στην απόδοση της στήλης θα μπορούσε να επιτευχθεί με ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 αναπτύχθηκε η τεχνολογία παραγωγής και χρήσης πληρωτικών υλικών με σωματίδια διαμέτρου 3 – 10 μ m. Η τεχνολογία αυτή απαιτούσε εξελιγμένα όργανα, με δυνατότητα λειτουργίας σε υψηλές πιέσεις, κάτι που ήταν αδύνατο να επιτευχθεί με τις απλές υάλινες στήλες της κλασικής υγρής χρωματογραφίας με βαρυτική ροή. Έτσι λοιπόν την ίδια περίπου περίοδο αναπτύχθηκε από τον Ουγγροαμερικανό *Csaba Horváth* η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (*High Performance/Pressure Liquid Chromatography, HPLC*). Η ονομασία αυτή χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να διακρίνει αυτές τις νεότερες τεχνικές

15 Ο Ρώσος βοτανολόγος *Mikhail Tswett* ήταν αυτός που εφηύρε τη χρωματογραφία στις αρχές του 20^{ου} αιώνα (1903). Οι ιστορικοί έχουν δώσει δύο πιθανές ερμηνείες για την ονομασία “χρωματογραφία”: α. Με την τεχνική αυτή ο *Tswett* διαχώρισε διάφορες φυτικές χρωστικές. Της έδωσε το όνομα αυτό πιθανώς εμπνευσμένος από την ελληνική γλώσσα και β. στα ρωσικά η λέξη “*tswett*” σημαίνει χρώμα, οπότε έτσι κωδικοποίησε στην τεχνική το όνομά του. [122],[124]

από τις παλαιότερες μεθόδους βαρυτικής ροής¹⁶. Η νέα τεχνολογία αποτέλεσε καθοριστικό σταθμό στην εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας. [122],[123]

Ένα δεύτερο πολύ σημαντικό ορόσημο στην εξέλιξη της υγρής χρωματογραφίας, που συντελέστηκε περίπου στα μέσα της δεκαετία του 2000, αποτελεί η ανάπτυξη και χρήση νέων υλικών πλήρωσης με σωματίδια πολύ μικρής διαμέτρου (< 2μm). Ωστόσο, η χρήση τέτοιων υλικών είχε ως απαιτητή συνοδεία και επακόλουθη συνέπεια την ανάπτυξη και εξέλιξη της τεχνολογίας, καθώς στην επονομαζόμενη υγρή χρωματογραφία υπερυψηλής απόδοσης (*Ultra High Performance/Pressure Liquid Chromatography, UHPLC or UPLC*) χρησιμοποιούνται πολύ υψηλότερες πιέσεις, λόγω των νέων σωματιδίων του προσροφητικού υλικού. Το όφελος είναι σημαντικό, τόσο στον χρωματογραφικό διαχωρισμό, όσο και στον χρόνο ανάλυσης, στην κατανάλωση διαλυτών (μπορεί να είναι τοξικοί και επιβλαβείς για το περιβάλλον) και στον απαιτούμενο για την ανάλυση όγκο δείγματος, παράγοντας πολύ σημαντικός ειδικά σε περιπτώσεις που ο διαθέσιμος όγκος είναι περιορισμένος (π.χ. στην ιατροδικαστική ανάλυση). [124]



Σχήμα 3.7: Σχηματική απεικόνιση των τμημάτων μίας τυπικής συσκευής HPLC. [123]

Η HPLC είναι είναι η πιο διαδεδομένη απ' όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, λόγω της ευαισθησίας της, της εύκολης προσαρμογής της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, της καταλληλότητάς της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως λόγω της εφαρμοσιμότητάς της σε προσδιορισμούς ουσιών υψηλού ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, τη δημόσια υγεία και πολλά επιστημονικά πεδία. Παραδείγματα αποτελούν τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά

16 Σήμερα, σχεδόν όλες οι υγρές χρωματογραφίες πραγματοποιούνται υπό πίεση ροής και οι χρησιμοποιούμε τις συντομογραφίες LC και HPLC χρησιμοποιούνται εναλλακτικά. [123]

οξέα, οι υδρογονάνθρακες, οι υδατάνθρακες, οι φαρμακευτικές ουσίες, τα τερπενοειδή, τα φυτοπροστατευτικά προϊόντα και τα βιοκτόνα, τα αντιβιοτικά, τα στεροειδή, οι οργανομεταλλικές ενώσεις, στερεοϊσομερείς ενώσεις και μια ποικιλία ανόργανων ουσιών. [122]

Προκειμένου να αναπτυχθούν ικανοποιητικές ταχύτητες ροής της κινητής φάσης όταν χρησιμοποιούνται υλικά πλήρωσης αποτελούμενα από σωματίδια μεγέθους 3 - 10 μm, οι απαιτούμενες πιέσεις από τις αντλίες φθάνουν τις μερικές χιλιάδες psi (1 atm = 14.696 psi). Ως συνέπεια των υψηλών αυτών πιέσεων η οργανολογία της HPLC είναι πολυπλοκότερη και δαπανηρότερη από την οργανολογία άλλων ειδών χρωματογραφίας. Στο σχήμα 3.7 απεικονίζονται τα σημαντικότερα τμήματα από τα οποία αποτελείται μία διάταξη HPLC. [123]

3.5.3.1 Η στατική φάση

Τα πιο συνηθισμένα υλικά στήριξης είναι τα ομοιόμορφα, υψηλής καθαρότητας, πορώδη και μηχανικά σκληρά σφαιρικά μικροπορώδη σωματίδια διοξειδίου του πυριτίου (στο εξής ΔΠ) (*silica*) ή που βασίζονται στο ΔΠ και προκύπτουν μέσω σύνθεσης. Τα σωματίδια αυτά είναι περατά από τον διαλύτη και συνήθως έχουν διάμετρο 3, 5 ή 10 μm και εμβαδόν επιφάνειας μερικές εκατοντάδες τετραγωνικά μέτρα ανά γραμμάριο. Περισσότερο από το 99% της επιφάνειάς τους βρίσκεται εντός των πόρων. Το ΔΠ δεν πρέπει να χρησιμοποιείται σε $pH > 8$, καθώς διαλύεται. Ειδικές κατηγορίες ΔΠ είναι σταθερές έως και σε $pH = 10$. [112],[113]

Μία επιφάνεια πλήρως υδρολυμένου ΔΠ έχει έως και 8 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ χημικά ενεργών ομάδων σιλανόλης (Si - OH). Οι ομάδες αυτές είναι πρωτονιωμένες σε $pH \approx 2 - 3$, ενώ διίστανται σε αρνητικά Si - O⁻ σε μεγάλο εύρος pH άνω του 3. Οι εκτεθειμένες ομάδες Si - O⁻ κατακρατούν ισχυρά πρωτονιωμένες βάσεις, όπως για παράδειγμα αμίνες (RNH₃⁺), με αποτέλεσμα τον σχηματισμό "ουρών" (*tailing*) στις κορυφές του χρωματογραφήματος. Οι μεταλλικές ακαθαρσίες του ΔΠ σχηματίζουν επίσης ουρά. Το ΔΠ *τύπου Β* έχει λιγότερες εκτεθειμένες ομάδες σιλανόλης και λιγότερες μεταλλικές ακαθαρσίες, ενώ το ΔΠ *τύπου C* σχηματίζει ακόμα μικρότερη ουρά, επειδή το 90% των ομάδων Si - OH έχουν αντικατασταθεί από δεσμούς Si - H, οι οποίοι δεν κατακρατούν τις ουσίες μέσω δεσμών υδρογόνου. [112],[122]

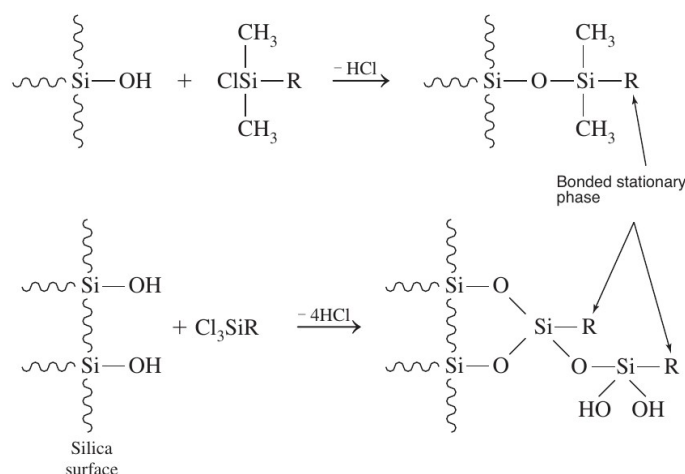
Το ακάλυπτο ΔΠ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως στατική φάση στη χρωματογραφία προσρόφησης (HPLC *συνδεδεμένης φάσης*). Συνήθως η χρωματογραφία υγρού - υγρού πραγματοποιείται με μία συνδεδεμένη στατική φάση, ομοιοπολικά δεσμευμένη στην επιφάνεια του ΔΠ. Οι πιο χρήσιμες επιστρώσεις είναι τα σιλοξάνια (οργανοπυριτικές ενώσεις, *siloxane*), που σχηματίζονται κατά την αντίδραση της υδρολυμένης επιφάνειας με ένα οργανοχλωριωμένο σιλάνιο, τα αλκύλια (R-) του οποίου συνήθως είναι:

- × για πολικές φάσεις: *κvanoμάδα* (-C₂H₄CN), *διόλη* (-C₃H₆OCH₂CHOHCH₂OH), *αμινομάδα* (-C₃H₆NH₂), *διμεθυλοαμινομάδα* (-C₃H₆N(CH₃)₂)

- × για μη πολικές φάσεις: *n*-δεκαοκτώλιο ((CH₂)₁₇CH₃, C18), *n*-οκτώλιο ((CH₂)₇CH₃, C8), φαινολομάδα, κρανομάδα ((CH₂)₃C≡N)

Η κάλυψη της επιφάνειας με σιλανοποίηση περιορίζεται σε 4μmol/m² ή λιγότερο, λόγω στερεοχημικών παρεμποδίσεων. Για τον διαχωρισμό οπτικών ισομερών χρησιμοποιούνται ειδικές χειραλικές στήλες με οπτικά ενεργές ομάδες R- . [112],[122]

Με βάση τη σχετική πολικότητα της κινητής και της στατικής φάσης διακρίνονται δύο τύποι χρωματογραφίας κατανομής. Οι πρώτες εργασίες στην υγρή χρωματογραφία βασίστηκαν σε στατικές φάσεις υψηλής πολικότητας, όπως ύδωρ ή τριαιθυλενογλυκόλη, κατακρατούμενες σε σωματίδια ΔΠ ή αλουμίνας, ενώ ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε ένας σχετικά μη πολικός διαλύτης, όπως εξάνιο, ισοπροπυλαιθέρας και χλωροφόρμιο. Για ιστορικούς λόγους, αυτός ο τύπος χρωματογραφίας αναφέρεται ως *χρωματογραφία κανονικής φάσης (normal-phase chromatography)*. Στη *χρωματογραφία αντίστροφης φάσης (reversed-phase chromatography)*, η στατική φάση είναι μη πολική, συχνά ένας υδρογονάνθρακας και η κινητή είναι ένας σχετικά πολικός διαλύτης, όπως ύδωρ, μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο. [101],[122]



Σχήμα 3.8: Παραδείγματα αντιδράσεων σιλανοποίησης. [113]

Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, τα λιγότερο πολικά συστατικά εκλύονται πρώτα, διότι είναι τα περισσότερο διαλυτά στην κινητή φάση. Αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου έκλυσης. Αντίθετα, στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, τα πολικότερα συστατικά εκλύονται πρώτα και με αύξηση της πολικότητας της κινητής φάσης ο χρόνος έκλυσης αυξάνεται.

Τα υλικά πλήρωσης στην τεχνική συνδεδεμένης φάσης κατατάσσονται ως υλικά αντίστροφης φάσης, όταν η δεσμευμένη επιστρώση (*coating*) είναι μη πολική και ως κανονικής φάσης, όταν η επιστρώση περιέχει πολικές δραστικές ομάδες. Ίσως τα ¾ των εφαρμογών της χρωματογραφίας πραγματοποιούνται με στήλες, οι οποίες περιέχουν υλικά πλήρωσης αντίστροφης φάσης με συνηθέστερες ομάδες R- του σιλοξανίου των επιστρώσεων τις C8 και C18. Στις προκατεργασίες αυτές, οι ομάδες της μακράς αλυσίδας

του υδρογονάνθρακα ευθυγραμμίζονται παράλληλα η μία προς την άλλη και κάθετα προς την επιφάνεια του σωματιδίου, δίνοντας δομή ψήκτρας.

Ο δεσμός του σιλοξανίου ($\text{SiO} - \text{SiR}$) υδρολύεται σε $\text{pH} < 2$, οπότε η HPLC με συνδεδεμένη φάση σε υλικό στήριξης ΔΠ, λαμβάνοντας υπόψη και την ευαισθησία των σωματιδίων της σε $\text{pH} > 8$ (βλ. παραπάνω), περιορίζεται σε εύρος $\text{pH} = 2 - 8$. Εάν ωστόσο στα άτομα του πυριτίου της συνδεδεμένης φάσης (του σιλανίου) υπάρχουν προσδεδεμένες ογκώδεις ισοβουτυλομάδες, η στατική φάση προστατεύεται από την προσβολή ιόντων οξωνίου (H_3O^+) και παραμένει σταθερή για αρκετό χρόνο σε χαμηλό pH , ακόμα και σε αυξημένη θερμοκρασία (π.χ. σε $\text{pH} = 0,9$ στους 90°C). [112],[122]

3.5.3.2 Ανιχνευτές στην HPLC

Εν αντιθέσει με την αέρια χρωματογραφία (GC), στην υγρή χρωματογραφία (LC) δεν υπάρχουν αντίστοιχοι καθολικοί ανιχνευτές (*universal detectors*), όπως ο ανιχνευτής ιοντισμού φλόγας και ο ανιχνευτής θερμικής αγωγιμότητας, που να βασίζονται σε γενικές ιδιότητες της ύλης. Οι ανιχνευτές που συζεύγγονται με αέριους χρωματογράφους αναπτύχθηκαν ειδικά για τη μέτρηση χαμηλών συγκεντρώσεων αναλυτών σε ρέοντα ρεύματα αερίων. Από την άλλη μεριά, οι ανιχνευτές LC ήταν συχνά παραδοσιακά όργανα κατάλληλα προσαρμοσμένα με κυψελίδες ροής για τη μέτρηση χαμηλών συγκεντρώσεων διαλελυμένων ουσιών σε ρέοντα υγρά. Η μεγάλη πρόκληση στην ανάπτυξη της υγρής χρωματογραφίας υπήρξε η προσαρμογή και η βελτίωση τέτοιων ανιχνευτών. [122],[123]

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών υγρής χρωματογραφίας: Οι *γενικοί ανιχνευτές* (*bulk property detectors/non selective detectors*), οι οποίοι ανταποκρίνονται και μετρούν μία βασική ιδιότητα της εξερχόμενης από τη στήλη κινητής φάσης (διαλύτης και εκλούόμενα συστατικά του δείγματος). Εμφανίζουν διακύμανση στην απόκριση, ακόμα και με μικρή αλλαγή στη σύσταση της κινητής φάσης. Τέτοιοι ανιχνευτές είναι οι ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, οι αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές, οι ανιχνευτές σκέδασης του φωτός μετά από εξάτμιση και οι ανιχνευτές δείκτη διάθλασης. Αντίθετα, υπάρχουν οι *εκλεκτικοί ή ειδικοί ανιχνευτές* (*solute property detectors or selective detectors*), αποκρίνονται σε συγκεκριμένες φυσικές ή χημικές ιδιότητες του κάθε εκλούομένου συστατικού (αναλύτη), ιδανικά ανεξάρτητη της υπόλοιπης κινητής φάσης. Πρακτικά μπορεί να μην επιτυγχάνεται απόλυτη ανεξαρτησία, αλλά η διάκριση του σήματος είναι ικανοποιητική σε περιπτώσεις βαθμωτής έκλυσης. Τέτοιοι ανιχνευτές είναι οι ανιχνευτές απορρόφησης (υπερύθρου, ορατού - υπεριώδους και συστοιχίας φωτοδίοδων), οι ανιχνευτές φθορισμού και οι ανιχνευτές φασματομετρίας μάζας. [122],[125]

3.6 Φασματομετρία Μάζας

Η φασματομετρία μάζας είναι η τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για τη μελέτη των μαζών ατόμων, μορίων ή θραυσμάτων μορίων. Ίσως πρόκειται για την τεχνική που μπορεί να βρει τη μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, σε σχέση με όλες τις άλλες αναλυτικές

τεχνικές. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες σχετικά με:

1. τη στοιχειακή σύσταση του εξεταζόμενου δείγματος,
2. τις δομές ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων,
3. την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων,
4. τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών και
5. την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε δείγματα.

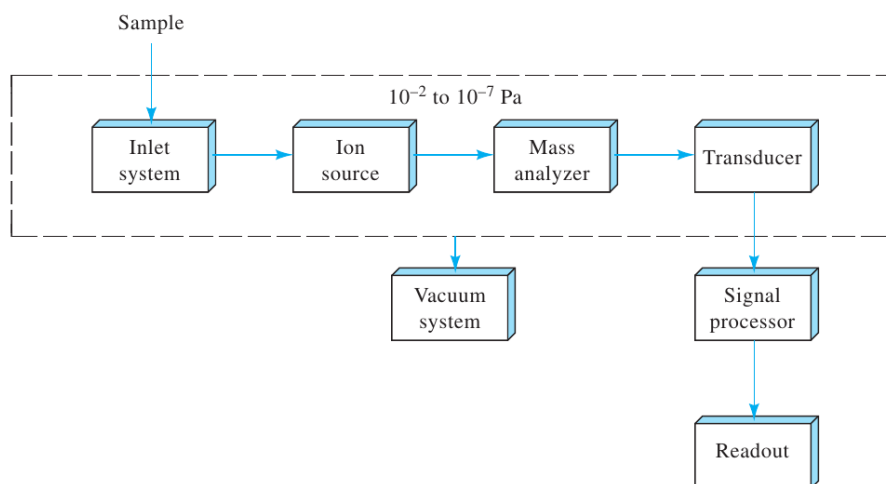
Η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται για να δώσει πληροφορίες που αναφέρονται στα παραπάνω σημεία 2 και 3, συνδυαζόμενη με χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η υγρή χρωματογραφία (βλ. §3.9), βρίσκοντας εφαρμογή στο πεδίο της αναλυτικής τοξικολογίας για πληθώρα τοξικών παραγόντων, στον έλεγχο *anti-doping*, ναρκωτικών ουσιών και τοξικότητας μεταβολισμού φαρμάκων και φαρμακοκινητικής στη φαρμακευτική βιομηχανία, στον έλεγχο υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων στα τρόφιμα, στον προσδιορισμό της σχετικής μοριακής μάζας (M_R) και της αλληλουχίας αμινοξέων σε πεπτιδία και πρωτεΐνες και βάσεων σε ολιγονουκλεοτιδίων, στη χρονολόγηση αρχαιολογικών δειγμάτων, στην ανάλυση σωματιδίων αερολυμάτων κ.ά. Έχει πολύ υψηλή ευαισθησία, ενώ μπορεί θεωρητικά να δράσει σαν καθολικός ανιχνευτής (*universal detector*) και να εφαρμοστεί για την ανάλυση οποιασδήποτε χημικής ένωσης, να προσδιορίσει τη δομή αγνώστων ενώσεων, με μεγάλη πλέον εφαρμογή στις ομικές τεχνολογίες (*omics technologies*) καθώς επιτυγχάνει αποδοτική εύρεση δομής πεπτιδίων, πρωτεϊνών και νουκλεοτιδίων. [101],[122],[125]

Η αρχή της φασματομετρίας μάζας έγκειται στη φυσική αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου με κινούμενα φορτισμένα σωματίδια (μοριακά ιόντα). Η τροχιά των φορτισμένων αυτών σωματιδίων μέσα στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο εξαρτάται από τον λόγο μάζας προς φορτίο (m/z), όπου m είναι η μάζα ενός φορτισμένου σωματιδίου και z το φορτίο του. Η εξάρτηση αυτή επιτρέπει τον διαχωρισμό των ιόντων: Για συγκεκριμένη ένταση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου υπάρχει μόνο μία αναλογία m/z και μόνο τα ιόντα που την ικανοποιούν φθάνουν στον ανιχνευτή και καταγράφονται σαν ηλεκτρικό σήμα. Για να καταγραφούν όλα τα ιόντα μεταβάλλεται σταδιακά η ένταση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου. Η αλλαγή αυτή επιτρέπει την εν σειρά άφιξη όλων των ιόντων στον ανιχνευτή και την καταγραφή τους σαν φάσμα μαζών (σάρωση ιόντων).

Η γραφική παράσταση της έντασης (αφθονίας των ιόντων ως απόκριση του ανιχνευτή) συναρτήσει του λόγου m/z για όλα τα ιόντα που προκύπτουν από τον ιονισμό μιας ένωσης με ένδειξη σχετικής (%) ή απόλυτης αφθονίας τους αποτελεί το φάσμα μοριακών μαζών της. Το φάσμα μαζών σε συγκεκριμένες συνθήκες αποτελεί το δακτυλικό αποτύπωμα μιας χημικής ένωσης και χρησιμεύει για την ταυτοποίησή της. Η ταυτοποίηση σήμερα πραγματοποιείται με σύγκριση του φάσματος που λαμβάνουμε με φάσματα καταχωρισμένα σε βιβλιοθήκες - βάσεις δεδομένων.

Τα κύρια τμήματα ενός φασματομέτρου μάζας αναφέρονται παρακάτω, ενώ στο σχήμα 3.9 απεικονίζονται συνοπτικά τα τμήματα αυτά.

1. Σύστημα εισαγωγής δείγματος → Ο σκοπός του είναι να επιτρέψει την εισαγωγή ενός αντιπροσωπευτικού δείγματος στην πηγή ιόντων με ελάχιστη απώλεια κενού.
2. Πηγή ιόντων → Μετατρέπουν τα συστατικά του δείγματος σε ιόντα. Πολλές φορές σύστημα εισαγωγής και πηγή ιόντων συνδυάζονται σε μία ενιαία μονάδα (βλ. §3.6.1).
3. Αναλυτής μάζας → Η διασπορά/διαχωρισμός βασίζεται στον λόγο m/z των ιόντων της ουσίας (βλ. §3.6.2).
4. Ανιχνευτής → Μεταλλάκτης (για τα ιόντα), που μετατρέπει τη δέσμη των ιόντων σε ηλεκτρικό σήμα. Ο ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής είναι ο προτιμότερος μεταλλάκτης για μετρήσεις ρουτίνας.
5. Σύστημα κενού → Σε αντίθεση με τα οπτικά όργανα, για τα φασματομέτρα μάζας απαιτείται η λειτουργία ενός πολύπλοκου συστήματος κενού για να διατηρεί χαμηλή πίεση, 10^{-4} - 10^{-8} Torr (1atm = 760 Torr) σε όλα τα παραπάνω τμήματα του οργάνου (1-4). το υψηλό κενό είναι απαραίτητο, επειδή τα φορτισμένα σωματίδια, συμπεριλαμβανομένων και των ηλεκτρονίων, αλληλεπιδρούν με τα συστατικά της ατμόσφαιρας και καταστρέφονται.
6. Ηλεκτρονικός υπολογιστής → Το σήμα που εξέρχεται από τον ανιχνευτή μπορεί να υποβληθεί σε επεξεργασία, να αποθηκευθεί στη μνήμη Η/Υ και να καταγραφεί ή να παρουσιαστεί με ποικίλους τρόπους με τη χρήση κατάλληλου λογισμικού.



Σχήμα 3.9: Διαγραμματική απεικόνιση των τμημάτων ενός φασματομέτρου μάζας. [123]

3.6.1 Πηγές ιόντων

Το αρχικό στάδιο σε μία μέτρηση με φασματομέτρο μάζας είναι ο σχηματισμός των ιόντων του αέριου αναλύτη, διαδικασία καθοριστική για τους στόχους της μέτρησης και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Ο ιοντισμός μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, ανάλογα με τη χρησιμοποιούμενη πηγή ιόντων, τα χαρακτηριστικά των υπό προσδιορισμό ενώσεων (σχετική μοριακή μάζα, πτητικότητα, πολικότητα), το στόχο της ανάλυσης (στοχευμένη ή μη), το είδος της συζευγμένης χρωματογραφίας που προηγείται και το είδος του αναλυτή μάζας που έπεται.

Οι πηγές ιόντων χωρίζονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, τις πηγές αέριας φάσης (*gas-phase sources*) και τις πηγές εκρόφησης (*desorption sources*). Στις πρώτες, όπου ανήκουν οι πηγές πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (*Electron impact, EI*), οι πηγές χημικού ιοντισμού (*Chemical ionization, CI*) και οι πηγές ιοντισμού πεδίου (*Field ionization, FI*), το δείγμα πρώτα εξαερώνεται και μετά ιοντίζεται. Η εφαρμογή τους συνήθως περιορίζεται σε θερμικά σταθερές ενώσεις με σημεία ζέσεως μικρότερα από 500°C και σχετικές μοριακές μάζες μικρότερες από περίπου 10³Da. Στις δεύτερες ανήκουν μεταξύ άλλων οι πηγές ιοντισμού με ηλεκτροψεκάσμο (*Electrospray Ionization, ESI*), οι πηγές χημικού ιοντισμού σε ατμοσφαιρική πίεση (*Atmospheric Pressure Chemical Ionization, APCI*), οι πηγές ιοντισμού εκρόφησης με λέιζερ υποβοηθούμενου από υλικό μήτρας (*Matrix Assisted Laser Desorption and Ionization, MALDI*) και οι πηγές εκρόφησης πλάσματος (*Plasma Desorption, PD*). Εδώ το δείγμα, σε στερεή ή υγρή κατάσταση, μετατρέπεται απευθείας σε αερώδη ιόντα. Πλεονέκτημα των πηγών εκρόφησης αποτελεί το γεγονός ότι μπορούν να εφαρμοστούν σε μη πτητικά ή θερμικά ασταθή δείγματα. Δεν απαιτούν εξάτμιση των μορίων του αναλύτη και μπορούν να εφαρμοσθούν σε ενώσεις με σχετικές μοριακές μάζες έως και 10⁵Da. [122],[123]

Οι πηγές ιόντων διακρίνονται επίσης σε μαλακές και σκληρές, ανάλογα με την έκταση της θραυσματοποίησης του αρχικού, πρόδρομου/μητρικού μοριακού ιόντος (*precursor/parent ion*) σε παραγόμενα/θυγατρικά ιόντα (*product/daughter ions*), οφειλόμενη στη διοχετευόμενη ενέργεια. Οι μαλακές πηγές προκαλούν περιορισμένη θραύση, ενώ οι σκληρές εκτενέστερη, με τα αντίστοιχα φάσματα να περιλαμβάνουν λιγότερες και περισσότερες κορυφές. Και τα δύο φάσματα παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες στην ανάλυση. Η μορφή του φάσματος μαζών μιας ουσίας εξαρτάται εν πολλοίς από την τεχνική παραγωγής ιόντων. Όπως και στη τεχνική της χρωματογραφίας, έτσι και στους φασματογράφους μάζας δεν φθάνουν όλα τα ιόντα του ίδιου θραύσματος ταυτόχρονα στον ανιχνευτή. Στα φάσματα μαζών παρουσιάζονται - καταγράφονται μόνο οι κεντρικές γραμμές (*centroids*) των κορυφών που αντιστοιχούν σε κάθε λόγο m/z . Η απλοποίηση γίνεται για την εξοικονόμηση αποθηκευτικού χώρου.

3.6.2 Αναλυτές μάζας

Για τον διαχωρισμό ιόντων με διαφορετικούς λόγους m/z διατίθενται διάφορες διατάξεις. Ο ιδανικός αναλυτής μάζας πρέπει να διαχωρίζει μάζες που διαφέρουν ελάχιστα μεταξύ τους. Επιπλέον, ο αναλυτής πρέπει να επιτρέπει τη διέλευση αρκετών ιόντων, ώστε να

παραχθεί ένα άμεσα μετρήσιμο ρεύμα ιόντων. Οι δύο αυτές ιδιότητες δεν είναι απόλυτα συμβατές και πρέπει πάντα να γίνονται σχεδιαστικοί συμβιβασμοί.

Βασικές ποσοτικές παράμετροι απόδοσης ενός αναλυτή μάζας είναι: η *περιοχή μαζών* (εύρος των λόγων m/z που μπορούν να αναλυθούν από τον συγκεκριμένο αναλυτή), η *δυναμική περιοχή* ή *περιοχή γραμμικότητας* (περιοχή συγκεντρώσεων του αναλύτη, όπου το σήμα του ανιχνευτή είναι γραμμικό προς τη συγκέντρωση, ώστε να είναι εφικτή η ποσοτική ανάλυση), η *διακριτική ικανότητα* (*Resolution*, $R = m/\Delta m$, η δυνατότητα του αναλυτή να ξεχωρίζει ιόντα με παραπλήσιους λόγους m/z ή απλούστερα παραπλήσιες μάζες¹⁷), η *ακρίβεια μάζας* (ακρίβεια προσδιορισμού του λόγου m/z), η *δυνατότητα (πολλαπλής) διαδοχικής φασματομετρίας μάζας MS^n* (πολύ σημαντική για την ταυτοποίηση της δομής περίπλοκων ενώσεων) και η *ταχύτητα σάρωσης* (χρόνος παραλαβής φάσματος, πόσο γρήγορα δηλαδή μπορεί να μεταβάλλεται η ένταση του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, προκειμένου να καταγράφονται όλα τα ιόντα στο δείγμα και να παράγεται το φάσμα μαζών, χωρίς να ζημιώνεται η διακριτική ικανότητα).

Τα φασματομέτρα μάζας διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τον τύπο του αναλυτή μάζας που φέρει το κάθε ένα. Ενδεικτικά αναφέρονται οι ακόλουθοι αναλυτές: ο *αναλυτής μαγνητικού τομέα* (*Magnetic sector mass analyzer*), ο *τετραπολικός αναλυτής μάζας* (*Quadrupole mass analyzer*), ο *αναλυτής παγίδευσης ιόντων - τετραπολική παγίδα ιόντων* (*Quadrupole ion trap, IT*), ο *αναλυτής μάζας χρόνου πτήσης* (*Time of Flight analyzer, TOF*), ο *αναλυτής ιοντικού κυκλοτρονικού συντονισμού με μετασχηματισμό Fourier* (*Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR*), ο *αναλυτής τροχιακής παγίδας ιόντων* (*Orbital trapping, Orbitrap*) και ο *αναλυτής κινητικότητας ιόντων* (*Ion mobility mass spectrometry*).

3.7 Συζευγμένες τεχνικές

Αν και η φασματομετρία μάζας είναι ένα ισχυρό εργαλείο για την ταυτοποίηση καθαρών ενώσεων, η χρησιμότητά της στην ανάλυση πολύπλοκων μειγμάτων, όπως τα βιολογικά υποστρώματα, περιορίζεται λόγω του μεγάλου πλήθους παραγόμενων θραυσμάτων διαφορετικών τιμών του λόγου m/z , ώστε η ερμηνεία του προκύπτοντος πολύπλοκου φάσματος να καθίσταται αδύνατη. Για τον λόγο αυτό έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι στις οποίες φασματογράφοι μάζας συζεύγνυνται με συστήματα διαχωρισμού, όπως η αέρια και η υγρή χρωματογραφία, οπότε προκύπτει μία *συζευγμένη τεχνική* (*hyphenated technique*) GC-MS και LC-MS αντίστοιχα (βλ. §3.8). [122]

Μια άλλη σημαντική συζευγμένη τεχνική προκύπτει με σύζευξη ενός φασματομέτρου μάζας με ένα δεύτερο. Το πρώτο χρησιμοποιείται για την απομόνωση των μοριακών ιόντων των διαφόρων συστατικών ενός μείγματος. Στη συνέχεια τα ιόντα αυτά εισάγονται σε ένα δεύτερο φασματομέτρο μάζας, όπου θραύονται για να δώσουν μία σειρά φασμάτων μαζών, ένα για κάθε μοριακό ιόν που παρήχθη στο πρώτο φασματομέτρο. Η τεχνική αυτή

¹⁷ Η διακριτική ικανότητα ορίζει την ακρίβεια και την εκλεκτικότητα - επιλεκτικότητα της μεθόδου (*selectivity*). Η απαίτηση εξαρτάται άμεσα από το είδος των προς ανάλυση δειγμάτων, π.χ. νερό λίμνης ή ορός αίματος (σημαντικά πιο περίπλοκο δείγμα).

καλείται *συζευγμένη φασματομετρία μάζας* ή *φασματομετρία μάζας σε σειρά* (*tandem mass spectrometry, MS/MS* or MS^2) και μπορεί να συνδυάζει διαφορετικούς αναλυτές μάζας δημιουργώντας υβριδικά συστήματα αναλυτών. Τα συστήματα αυτά συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των ανιχνευτών που τα απαρτίζουν και έτσι δημιουργούνται ανιχνευτές με πολλαπλές δυνατότητες. [122]

Η φασματομετρία μάζας σε σειρά είναι η συχνότερα χρησιμοποιούμενη σε σχέση με τις υπόλοιπες τεχνικές φασματομετρίας μάζας και έχει εφαρμοστεί με διάφορους τρόπους, που μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες: Η πρώτη είναι η *φασματομετρία μάζας σε σειρά στον χώρο* (*tandem mass spectrometry in space*), όπου χρησιμοποιούνται δύο αναλυτές μάζας σε διαφορετικά χωρικά σημεία. Η πιο κοινή διάταξη αυτής της κατηγορίας είναι το *τριπλό τετράπολο* (*Triple Quadrupole Mass Spectrometer, TQMS, QqQ*). Παράδειγμα άλλης υβριδικής διάταξης της κατηγορίας αποτελούν τα όργανα *Q-TOF*. Η δεύτερη κατηγορία είναι η *φασματομετρία μάζας σε σειρά στον χρόνο* (*tandem mass spectrometry in time*). Εδώ τα ιόντα σχηματίζονται σε ένα συγκεκριμένο χώρο (τμήμα του οργάνου) και εν συνεχεία, σε μεταγενέστερο χρόνο, επιλέγονται αυτά για τα οποία θα πραγματοποιηθεί φασματοσκοπική ανάλυση μάζας (εφαρμόζοντας κατάλληλο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο στον ίδιο χώρο). Η διαδικασία αυτή μπορεί να επαναληφθεί πολλές φορές, προσφέροντας όχι μόνο τη δυνατότητα διεξαγωγής πειραμάτων *MS/MS*, αλλά και πειραμάτων *MS/MS/MS* και MS^n (πολλαπλή διαδοχική φασματομετρία μάζας). Όργανα με τέτοια δυνατότητα διαθέτουν αναλυτές μάζας *IT* ή *FT-MS* (*FT-ICR* ή *Orbitrap*), συνήθως σε συνδυασμό με τετραπολικούς αναλυτές ή αναλυτές χρόνου πτήσης, παραγόμενα από διάφορους κατασκευαστικούς οίκους. [101],[122],[123],[126],[127]

3.8 Εφαρμογές της συζευγμένης φασματομετρίας μάζας

Η τεχνική *LC-MS* είναι μία *συζευγμένη τεχνική*, αποτελούμενη από δυο επιμέρους τεχνικές με διαφορετική φυσικοχημική βάση και διαφορετικό στόχο στην αναλυτική διαδικασία. Η μεν χρωματογραφία έχει σαν στόχο τον διαχωρισμό των συστατικών ενός μείγματος (διαχωριστική τεχνική) και η δε φασματομετρία έχει σαν στόχο την ανίχνευση και την ταυτοποίηση των συστατικών του. Η φασματομετρία μάζας είναι ο ιδανικός ανιχνευτής στη χρωματογραφία, καθώς παρέχει τόσο ποιοτικές, όσο και ποσοτικές πληροφορίες, έχει μεγάλη ευαισθησία και μπορεί να διαχωρίσει διαφορετικές ουσίες με τον ίδιο χρόνο κατακράτησης. [112],[125]

Με την κατασκευή των πρώτων οργάνων που συνδυάζαν τα φασματομέτρα μάζας με την αέρια χρωματογραφία και στη συνέχεια με την υγρή, βελτιώθηκαν σημαντικά οι δυνατότητες ανάλυσης πολύπλοκων οργανικών και βιολογικών δειγμάτων, επαναπροσδιορίζοντας τη δυναμική της αναλυτικής χημείας και τις δυναμικές εφαρμογές της σε πολλούς κλάδους της, μεταξύ αυτών και η αναλυτική τοξικολογία. Από την άλλη μεριά, η συζευγμένη φασματομετρία μάζας προσφέρει μερικά από τα πλεονεκτήματα των τεχνικών *GC-MS* και *LC-MS*, αλλά είναι σημαντικά ταχύτερη. Ενώ δηλαδή οι διαχωρισμοί σε μία χρωματογραφική στήλη πραγματοποιούνται σε μερικά λεπτά έως και μερικές ώρες,

εξίσου αποτελεσματικοί διαχωρισμοί επιτυγχάνονται με συζευγμένη φασματομετρία μάζας σε μερικά χιλιοστά του δευτερολέπτου (*ms*). Επιπλέον, οι χρωματογραφικές τεχνικές απαιτούν αραίωση του δείγματος με μεγάλη περίσσεια κινητής φάσης, γεγονός που αυξάνει σημαντικά την πιθανότητα εμφάνισης παρεμποδίσεων. Συνεπώς, η συζευγμένη φασματομετρία μάζας έχει δυνητικά μεγαλύτερη ευαισθησία από όλες τις συζευγμένες χρωματογραφικές τεχνικές, επειδή ο χημικός θόρυβος που σχετίζεται με τη χρήση της είναι γενικά χαμηλότερος. Ένα μειονέκτημα της συζευγμένης φασματομετρίας μάζας έναντι των χρωματογραφικών τεχνικών είναι το μεγαλύτερο κόστος του απαιτούμενου εξοπλισμού. [122],[123]

Για κάποια σύνθετα μείγματα ο συνδυασμός αέρια ή υγρής χρωματογραφίας με φασματομετρία μάζας δεν παρέχει ικανοποιητική διακριτική ικανότητα. Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει εφικτή η διασύνδεση χρωματογραφικών τεχνικών με συζευγμένη φασματομετρία μάζας, ώστε να προκύψουν αντίστοιχα συστήματα *GC-MS/MS*, *LC-MS/MS* και *LC-MSⁿ*. [123]

Μέχρι σήμερα, η συζευγμένη φασματομετρία μάζας έχει εφαρμοστεί σε ποιοτικούς και ποσοτικούς προσδιορισμούς των συστατικών μεγάλης ποικιλίας σύνθετων υλικών, φυσικών και βιομηχανικών. Παραδείγματα αποτελούν η ταυτοποίηση και ο προσδιορισμός μεταβολιτών φαρμακευτικών ουσιών, φερομονών εντόμων, φυτικών αλκαλοειδών, ιχνοποσοτήτων αέριων ρύπων, αλληλουχιών πολυμερών, πετροχημικών, πολυχλωριωμένων διφαινυλίων, προσταγλαδινών, αερίων καύσης πετρελαίου και οσμών στον αέρα. Μία από τις πολλά υποσχόμενες ομικές τεχνολογίες (*omics technologies*). [123]

3.9 Υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας σε σειρά (*LC-MS/MS*)

Η σύγχρονη οργανολογία *LC-MS/MS* έχει εξελιχθεί σε μία τεχνολογία ζωτικής σημασίας στην αναλυτική διαδικασία, μειώνοντας τον χρόνο ανάλυσης, βελτιώνοντας την εκλεκτικότητα και αυξάνοντας την διεκπεραιωτική ικανότητα (*high-throughput*). [77]

Αν και η σύζευξη των δύο τεχνικών (χρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας) φαίνεται να αποτελεί έναν ιδανικό συνδυασμό διαχωρισμού και ανίχνευσης, εντούτοις, δεν ήταν εξαρχής δεδομένη, προφανής και εύκολα υλοποιήσιμη. Όπως και στην αέρια χρωματογραφία, ένα φασματόμετρο μάζας μπορεί να βοηθήσει σημαντικά στην ταυτοποίηση των διαφόρων ειδών που εξέρχονται από τη χρωματογραφική στήλη.¹⁸ Στην περίπτωση της υγρής χρωματογραφίας όμως υπάρχουν σημαντικά ζητήματα που έπρεπε να αντιμετωπιστούν και αφορούν στις *ab initio* αρχές λειτουργίας των δύο τεχνικών. Αφενός λοιπόν η φασματομετρία μάζας απαιτεί ένα δείγμα σε αέρια φάση και υψηλό κενό, προκειμένου να αποφεύγονται μοριακές συγκρούσεις κατά τον ιοντικό διαχωρισμό. Αφετέρου, η χρωματογραφία αποτελεί φύσει τεχνική υψηλής πίεσης και από τη στήλη της

18 Η αέρια χρωματογραφία έχει αναπτυχθεί έτσι, ώστε να χρησιμοποιεί τριχοειδείς στήλες, από τις οποίες εξέρχεται σχετικά μικρή ποσότητα ύλης που δεν ξεπερνά την αντλητική ικανότητα του συστήματος κενού των φασματομέτρων μάζας. Η ίδια η τριχοειδή στήλη συνδέεται απευθείας στην είσοδο του φασματομέτρου μάζας μέσω μιας θερμαινόμενης γραμμής μεταφοράς. [113]

εξέρχεται ένα έκλουσμα διαλελυμένο (και αραιωμένο) σε έναν διαλύτη, που αποτελεί την κινητή φάση. Σαν ένα πρώτο βήμα λοιπόν, ο διαλύτης θα πρέπει να εξατμιστεί. Ωστόσο με την εξάτμισή του, ένας διαλύτης στην υγρή χρωματογραφία δημιουργεί όγκο αερίου που είναι 10 - 1.000 φορές μεγαλύτερος από του φέροντος αερίου στην αέρια χρωματογραφία. Συνεπώς ο διαλύτης θα πρέπει επιπλέον να απομακρυνθεί πριν από την εισαγωγή του δείγματος στο φασματομέτρο μάζας. [113],[123]

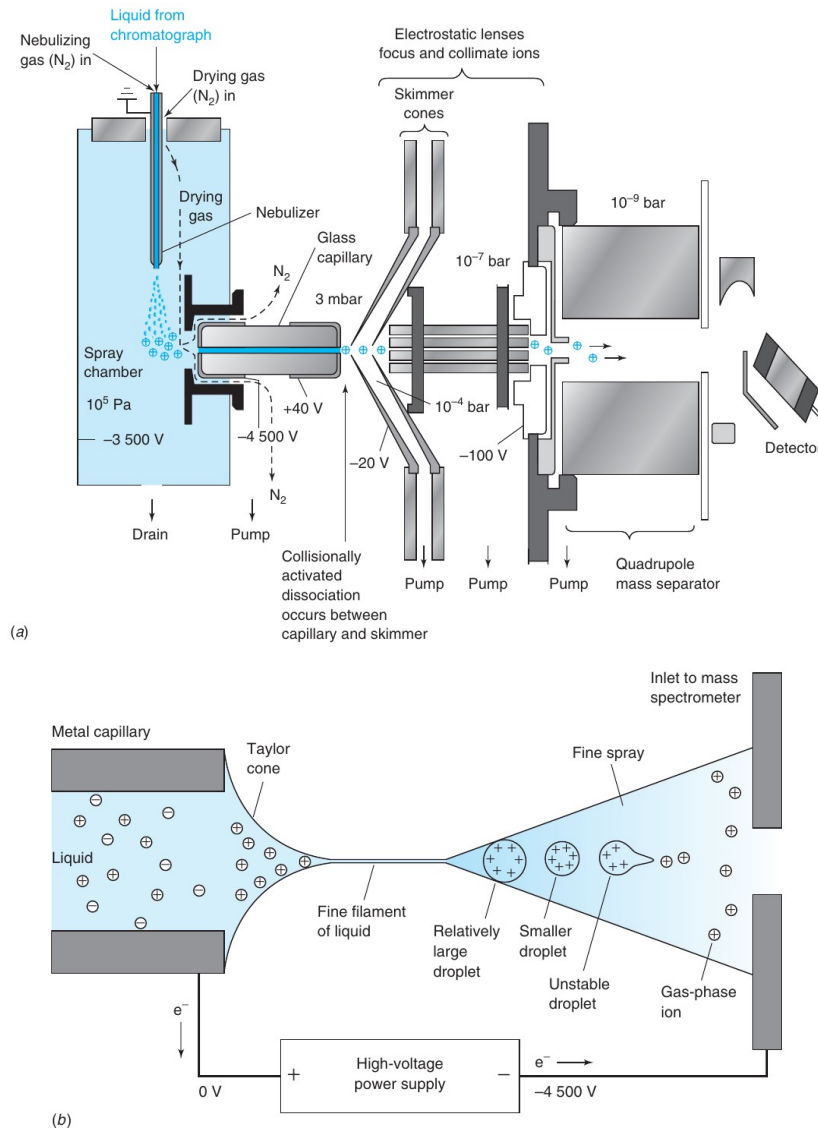
Για την επίλυση των ζητημάτων αυτών και της διασύνδεσης της στήλης έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα. Σήμερα, οι πιο διαδεδομένες προσεγγίσεις για το στάδιο του ιοντισμού των μορίων των συστατικών του δείγματος χρησιμοποιούν διάφορες τεχνικές, οι οποίες εφαρμόζονται υπό ατμοσφαιρική πίεση για την εισαγωγή του εκλούσματος από το χρωματογραφικό σύστημα στον φασματογράφο μάζας. Ο *ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό* (*Electrospray ionization, ESI*), ο *χημικός ιοντισμός ατμοσφαιρικής πίεσης* (*Atmospheric pressure chemical ionization, APCI*) και ο *φωτοϊοντισμός υπό ατμοσφαιρική πίεση* (*Atmospheric pressure photoionization, APPI*) είναι οι τρεις βασικές τεχνικές της κατηγορίας. Η επιλογή της τεχνικής ή των διάφορων μορφών αυτής εξαρτάται από την απόδοση ιοντισμού ανά περίπτωση. [101],[113],[123]

3.9.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Η τεχνική του ηλεκτροψεκασμού περιγράφηκε για πρώτη φορά το 1984. Ήταν αυτή που επέτρεψε τη διασύνδεση LC-MS.¹⁹ Σήμερα αποτελεί μία από τις σημαντικότερες μεθόδους σύζευξης της υγρής χρωματογραφίας με την φασματομετρία μάζας για την ανάλυση βιομορίων, όπως πολυπεπτιδία, πρωτεΐνες και νουκλεοτιδία με $M_R \geq 100.000\text{Da}$. Επιπλέον βρίσκει όλο και περισσότερες εφαρμογές στον χαρακτηρισμό ανόργανων ουσιών, φυτοπροστατευτικών προϊόντων, συνθετικών πολυμερών κ.ά.. [122],[123],[129]

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης και θερμοκρασίας. Το διάλυμα του δείγματος αντλείται από την έξοδο της χρωματογραφικής στήλης μέσω μιας ανοξειδωτής τριχοειδούς βελόνας με ταχύτητα μερικών $\mu\text{L}/\text{min}$ και στην έξοδο της εκνεφώνεται. Η βελόνα βρίσκεται σε δυναμικό αρκετών kV ως προς ένα κυλινδρικό ηλεκτρόδιο που την περιβάλλει, οπότε τα αντίθετα φορτισμένα ιόντα διαχωρίζονται. Εάν η βελόνα είναι θετικά φορτισμένη, τότε τα αρνητικά ιόντα του διαλύματος προσκολλώνται στα τοιχώματά της, εμπλουτίζοντας το διάλυμα με θετικά φορτισμένα ιόντα. Ως αποτέλεσμα του γεγονότος αυτού, όταν γίνεται εκνέφωση τα σταγονίδια είναι φορτισμένα θετικά και ακολουθεί *θετικός ιοντισμός* (*positive ionization mode*). Αντίθετα, εάν στη βελόνα εφαρμόζεται αρνητικό δυναμικό ως προς το κυλινδρικό ηλεκτρόδιο, τα σταγονίδια είναι φορτισμένα αρνητικά και ακολουθεί *αρνητικός ιοντισμός* (*negative ionization mode*). [113],[123]

19 Οι John Bennett Fenn & Koichi Tanaka τιμήθηκαν το 2002 με το 1/2 του βραβείου Νόμπελ Χημείας (1/4 ο καθ' ένας) για την ανάπτυξη μεθόδων ιοντισμού μαλακής εκρόφησης για φασματομετρικές αναλύσεις μάζας βιολογικών μακρομορίων. Το άλλο 1/2 του βραβείου απονεμήθηκε στον Kurt Wüthrich για την ανάπτυξη της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού για τον προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής βιολογικών μακρομορίων σε διαλύματα. [128]



Σχήμα 3.10: (a) Η τεχνική ESI και (b) Η μετάβαση των ιόντων από την υγρή στην αέρια φάση πριν από την είσοδό τους στον αναλυτή μάζας. [113]

Το σχηματιζόμενο αερόλυμα (σπρέι) φορτισμένων σταγονιδίων διέρχεται εν συνεχεία μέσω ενός τριχοειδούς, όπου τα σταγονίδια προοδευτικά αποδιαλυτοποιούνται και το φορτίο τους προσαρτάται στα μόρια του αναλύτη.²⁰ Κατά τη διάρκεια αυτής της διαδικασίας, τα σταγονίδια συρρικνώνονται λόγω της εξαέρωσης του διαλύτη, οι απωστικές δυνάμεις *Coulomb* μεταξύ των θετικά φορτισμένων μορίων του δείγματος ισχυροποιούνται και η πυκνότητα φορτίου αυξάνεται, μέχρι που η επιφανειακή τάση τους να μη μπορεί να τις εξισορροπήσει. Ακολουθεί σχάση *Coulomb*, κατά την οποία τα σταγονίδια διασπώνται σε άλλα μικρότερα. Τα μικρότερα αυτά σταγονίδια αποδιαλυτοποιούνται ευκολότερα, ακολουθούν νέες σχάσεις *Coulomb*, μέχρι τελικά να

²⁰ Η είσοδος στον αναλυτή μάζας γίνεται κάθετα προς τη ροή εκνέφωσης, προκειμένου να αποφευχθεί η είσοδος μορίων διαλύτη σε αυτόν (βλ. σχήμα 3.10).

προκύβουν καθαρά ιόντα, τα οποία προέρχονται από το δείγμα και είναι έτοιμα να εισαχθούν στον αναλυτή μάζας. [113],[123]

Ένα ενδιαφέρον και χρήσιμο χαρακτηριστικό της διαδικασίας ηλεκτροψεκασμού είναι ότι επιτυγχάνει μαλακό ιοντισμό μη πτητικών και θερμικά ευπαθών ενώσεων μικρού και μεγάλου M_r , όπως πρωτεΐνες, πεπτιδία, νουκλεοτίδια και άλλες πολικές ή ιοντισμένες στο διάλυμα ενώσεις, επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό του. Η απαίτηση εδώ είναι οι αναλύτες στόχοι να είναι ήδη ιοντισμένοι. Επιπλέον, τα παραγόμενα ιόντα είναι πολυσθενή, οπότε οι τιμές των λόγων m/z είναι αρκετά μικρές καθιστώντας τα εύκολα ανιχνεύσιμα με τετραπολικούς αναλυτές που καλύπτουν περιοχή με εύρος λόγου $m/z \leq 1500$. [123],[130]

Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε μη πολικές ή ουδέτερες ενώσεις. Επίσης, το γεγονός ότι πρόκειται για μαλακό ιοντισμό, καθιστά τον προσδιορισμό της δομής άγνωστων ενώσεων δύσκολο. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιούνται τεχνικές συζευγμένης φασματομετρίας μάζας (βλ. §3.10). [123]

3.9.2 Το τριπλό τετράπολο (QqQ)

Στη συζευγμένη φασματομετρία μάζας το τριπλό τετράπολο αποτελεί την πιο κλασική πλέον διάταξη συνδεδεμένων αναλυτών μάζας. Πρόκειται για τρεις τετραπολικούς αναλυτές μάζας (τετράπολα) τοποθετημένους σε σειρά, ο ένας μετά τον άλλον.

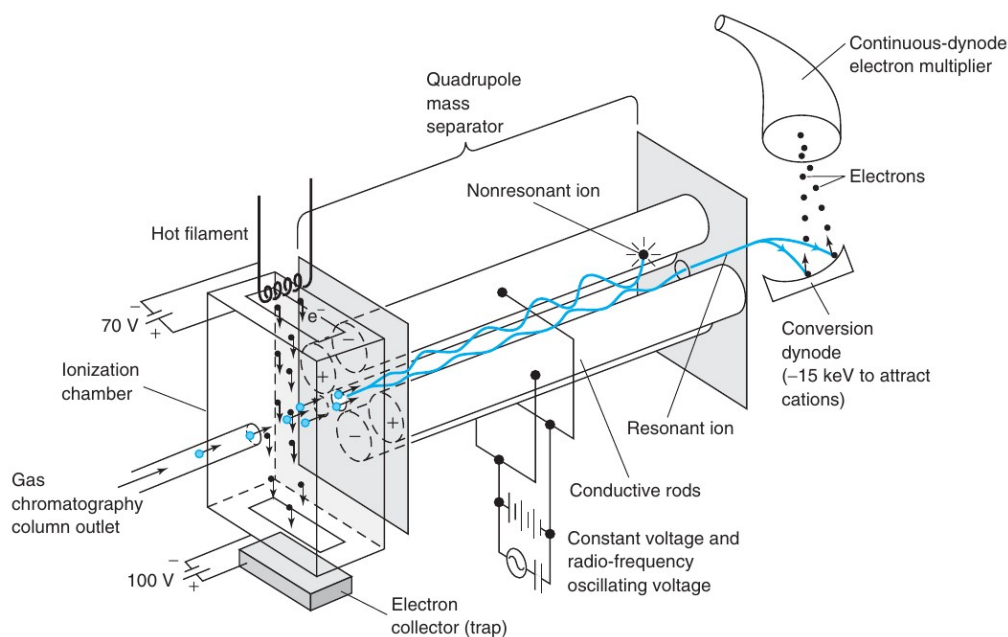
Ένας τετραπολικός αναλυτής μάζας αποτελείται από τέσσερα κυλινδρικά ή ιδανικά υπερβολικά ηλεκτρόδια τοποθετημένα ανά ζεύγη απέναντι σχηματίζοντας σταυρό.²¹ Σε κάθε ζεύγος εφαρμόζεται δυναμικό συνεχούς ρεύματος (DC) που ανά ζεύγος διαθέτει αντίθετη πολικότητα. Σε αυτά τα δυναμικά επίσης υπερτίθεται ένα ταλαντούμενο δυναμικό ραδιοσυχνότητας (*Radio frequency voltage*) με διαφορά φάσης 180° ανά ζεύγος. Υπό την επίδραση του σύνθετου αυτού ηλεκτρικού πεδίου, τα ιόντα υπόκεινται σε επάλληλη έλξη μεταξύ των τεσσάρων ράβδων που αποτελούν το τετράπολο. Αναλυτικότερα, μόλις ένα ιόν εισέλθει στον αναλυτή μάζας έλκεται από τη μία ράβδο και μόλις την προσεγγίσει η πολικότητα του δυναμικού αλλάζει και το ιόν απωθείται. Ταυτόχρονα το ιόν αρχίζει να έλκεται από το δυναμικό της επόμενης ράβδου και μόλις την προσεγγίσει το δυναμικό της αλλάζει και απωθείται προς την επόμενη και με αυτόν τον τρόπο διασφαλίζεται η σπειροειδής τροχιά του ιόντος. Μόνο τα ιόντα με συγκεκριμένο λόγο m/z θα επιτύχουν την απαραίτητη σπειροειδή τροχιά, προκειμένου να εξέλθουν από τον αναλυτή. Τα υπόλοιπα ιόντα θα προσκρούσουν στις ράβδους και τα τοιχώματα και δεν θα καταφέρουν να εξέλθουν. Μεταβάλλοντας τη συχνότητα του

21 Τον τετραπολικό αναλυτή μάζας εφηύραν το 1953 ο *Wolfgang Paul* και ο *Helmut Steinwedel*, την οποία κατοχύρωσαν με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας τον Ιούνιο του 1960. [AT20,AT21]. Η ανάπτυξη αυτή έθεσε τα θεμέλια για την εφεύρεση της τετραπολικής παγίδας ιόντων με εφαρμογή ταλαντούμενου ηλεκτρικού πεδίου και πάλι από τον *W. Paul*, σε συνεργασία με τον *Hans G. Dehmelt*. Για την ανάπτυξη της τεχνικής παγίδευσης ιόντων οι δύο επιστήμονες τιμήθηκαν με το $\frac{1}{2}$ ($\frac{1}{4}$ έκαστος) του βραβείου *Νόμπελ Φυσικής* το 1989. Το άλλο $\frac{1}{2}$ απονεμήθηκε στον *Norman Foster Ramsey* για την εφεύρεση της μεθόδου διαχωριζόμενων ταλαντωτικών πεδίων και τη χρήση της στο μείζερ υδρογόνου και σε άλλα ατομικά ρολόγια. [131]

εφαρμοζόμενου ηλεκτρομαγνητικού πεδίου μπορούν να περάσουν εν σειρά όλα τα ιόντα από τον αναλυτή. [126],[130]

Ο τετραπολικός αναλυτής μάζας έχει μικρή διακριτική ικανότητα και μικρή ακρίβεια μάζας, Καλύπτει μέτρια περιοχή μαζών και έχει αποδεκτή περιοχή γραμμικότητας. Το μεγάλο του πλεονέκτημα είναι το χαμηλό κόστος σε σχέση με άλλους αναλυτές μάζας και ο μικρός όγκος που καταλαμβάνει, επιτρέποντας στα αντίστοιχα όργανα να τοποθετούνται πάνω στον πάγκο. Πρόσφατα, το τριπλό τετράπολο σμικρύνθηκε σε ένα συνολικό μήκος περίπου 25cm (9,5in), ικανό να χρησιμοποιηθεί ακόμα και σε εφαρμογές πεδίου. Επίσης προσφέρουν μικρό χρόνο σάρωσης (<100ms), χαρακτηριστικό ιδιαίτερα χρήσιμο για σαρώσεις χρωματογραφικών κορυφών σε πραγματικό χρόνο. [123],[130]

Στη διάταξη του τριπλού τετραπόλου ωστόσο, ο τετραπολικός αναλυτής μάζας προσφέρει μεγάλη εκλεκτικότητα, επιτρέποντας έτσι τον προσδιορισμό ενός αναλύτη παρουσία πολλών άλλων ουσιών σε σύνθετα υποστρώματα, πολύ μεγάλη ευαισθησία και μεγάλη ακρίβεια ποσοτικού προσδιορισμού, μειωμένα όρια ανίχνευσης και αυξημένη πληροφορία για τη δομή του. Επιπλέον παρέχει τη δυνατότητα πολλαπλών σταδίων ανάλυσης μάζας και διαφορετικούς τρόπους λειτουργίας, ανάλογα με τον τελικό αναλυτικό στόχο. [130] Οι δύο βασικές λειτουργίες του τριπλού τετραπόλου, η σάρωση θυγατρικών ιόντων και η παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης θραυσματοποίησης, περιγράφονται παρακάτω (βλ. §3.10).

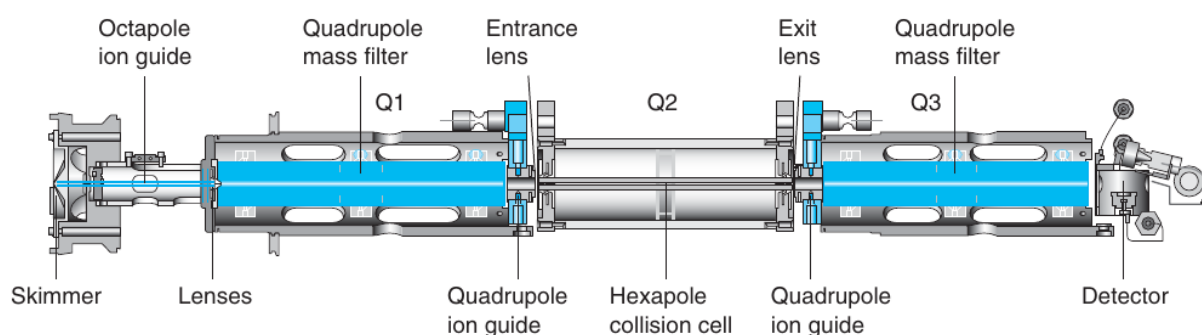


Σχήμα 3.11: Απεικόνιση ενός τετραπολικού αναλυτή μάζας. [113]

Η αρχή λειτουργίας του τριπλού τετραπόλου έχει ως εξής:

Το δείγμα εισάγεται σε μία πηγή ιοντισμού μικρής έντασης. Στη συνέχεια τα ιόντα επιταχύνονται και οδηγούνται στο πρώτο στάδιο ανάλυσης, στο τετράπολο 1 (Q_1) ή

διαχωριστή πρόδρομου ιόντος, που συνήθως είναι ένα κοινό τετραπολικό φίλτρο. Τα διαχωρισμένα ιόντα, με μεγάλες πλέον ταχύτητες οδηγούνται στο τετράπολο 2 (q_2), το οποίο είναι ένας θάλαμος ή κυψελίδα συγκρούσεων (*collision cell*), όπου συμβαίνει περαιτέρω ιοντισμός των πρόδρομων ιόντων που παράγονται στο Q_1 . Το τετράπολο q_2^{22} λειτουργεί μόνο με ραδιοσυχνότητες, δηλαδή δεν εφαρμόζεται συνεχές δυναμικό μεταξύ των ράβδων (όπως στα Q_1 και Q_3). Ο τρόπος αυτός παρέχει αποτελεσματική εστίαση των σκεδαζόμενων ιόντων, αλλά δεν λειτουργεί ως φίλτρο μάζας. Στον θάλαμο αυτόν εισάγεται αδρανές αέριο, όπως Ar, He ή N_2 σε πίεση 10^{-3} - 10^{-4} Torr, με αποτέλεσμα να πραγματοποιούνται συγκρούσεις των πρόδρομων ιόντων μεγάλων ταχυτήτων με τα άτομα του αδρανούς αερίου και ο ιοντισμός να συνεχίζεται. Τα παραγόμενα θυγατρικά ιόντα εισέρχονται στο τετράπολο 3 (Q_3), το οποίο επιτρέπει την φασματοσκοπική ανάλυσή τους. [122]



Σχήμα 3.12: Διαμήκης τομή ενός τριπλού τετραπόλου. [113]

3.10 Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μάζας

Η δυναμική της φασματομετρίας μάζας ως χρωματογραφικός ανιχνευτής είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για επιλεκτική παρακολούθηση ενός ή μερικών αναλυτών σε ένα πολύπλοκο μείγμα, ακόμη και αν ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των συστατικών δεν είναι τέλειος. Στην προσπάθεια λοιπόν να επιτευχθούν καλοί διαχωρισμοί, με στόχο την διάκριση των συστατικών ενός μείγματος, η φασματομετρία μάζας μπορεί να μειώσει το βάρος της χρωματογραφίας, διαχωρίζοντας τα συστατικά με διάφορες λειτουργικές εφαρμογές. [113]

Οι κύριες εφαρμογές της φασματομετρίας μάζας που χρησιμοποιούνται στην ανάλυση είναι η *τεχνική πλήρους σάρωσης*, η *τεχνική επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων*, και οι τέσσερις τεχνικές που προσφέρει η συζευγμένη φασματομετρία μάζας *MS/MS*, όπως παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω. [101]

- ✗ *Πλήρης σάρωση (Full scan)*, στην οποία λαμβάνεται το ολικό φάσμα μεταξύ δύο τιμών του λόγου m/z για καθορισμένο χρόνο. Η πλήρης σάρωση βοηθάει στον

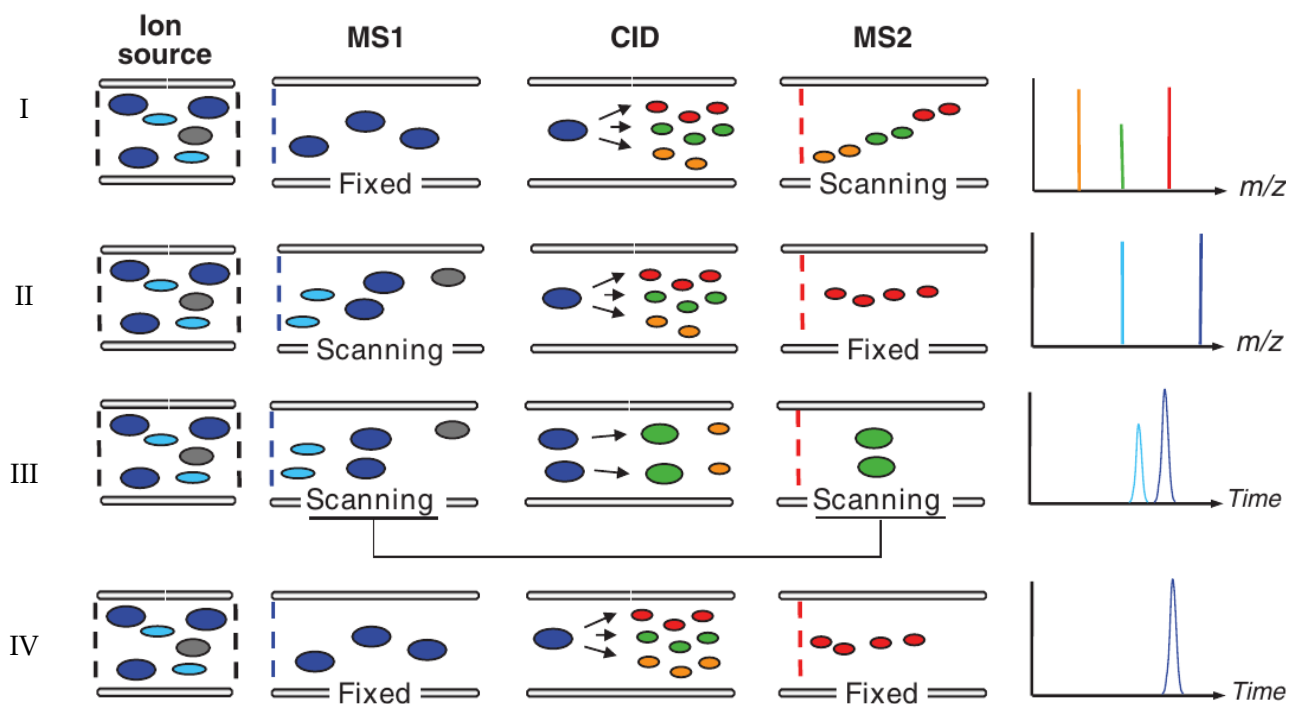
22 Στην πραγματικότητα πρόκειται για εξάπολο ή οκτάπολο στην πλειονότητα των οργάνων με τριπλό τετράπολο, αλλά συνήθως συμβολίζεται ως τετράπολο για ιστορικούς λόγους. [132]

προσδιορισμό της δομής/ταυτότητας μιας άγνωστης ένωσης με προσδιορισμό του μοριακού της βάρους ή σύγκριση με πρότυπα φάσματα. Αυξάνοντας το χρόνο σάρωσης, αυξάνεται η ευαισθησία της μέτρησης, καθώς αυξάνεται ο συνολικός αριθμός των ιόντων τα οποία φθάνουν στον ανιχνευτή. Η αύξηση της ευαισθησίας επιτυγχάνεται με μείωση του εύρους σάρωσης ή με αύξηση του χρόνου σάρωσης. Στην πρώτη περίπτωση ωστόσο, είναι πιθανό να χαθούν πληροφορίες.

- × *Επιλεκτική παρακολούθηση ιόντων (Selected ion monitoring, SIM)*, η οποία χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό ενώσεων με γνωστά φάσματα.²³ Για μία συγκεκριμένη ένωση - αναλύτη λοιπόν επιλέγονται κάποια χαρακτηριστικά ιόντα του φάσματός της και ο αναλυτής μεταβαίνει τάχιστα από τον ένα λόγο m/z στον άλλον, μετρώντας μόνο αυτούς.
- × *Σάρωση παραγόμενων - θυγατρικών ιόντων (Product ion scan)*.²⁴ Σε αυτήν την τεχνική, ο πρώτος αναλυτής μάζας (π.χ. ένα τετράπολο, Q_1) χρησιμοποιείται για την επιλογή ενός πρόδρομου ιόντος, το οποίο εν συνεχεία οδηγείται στην κυψελίδα συγκρούσεων, όπου παρουσία αδρανούς αερίου και υπό καθορισμένες ενεργειακές συνθήκες λαμβάνουν χώρα συγκρούσεις που οδηγούν σε διάσπαση - θραυματοποίηση του πρόδρομου ιόντος και την παραγωγή θυγατρικών ιόντων, χαρακτηριστικών του πρόδρομου και συνήθως γνωστών από προηγούμενες μελέτες. Τα προκύπτοντα θυγατρικά ιόντα εισέρχονται εν συνεχεία στον επόμενο αναλυτή μάζας (Q_3), ο οποίος λειτουργεί σε πλήρη σάρωση και καταγράφει το φάσμα MS^2 (βλ. σχήμα 3.13I). Το φάσμα MS^2 είναι πολύ πιο χαρακτηριστικό από το αρχικό φάσμα μαζών και χρησιμοποιείται για ταυτοποίηση ενώσεων. Σήμερα υπάρχουν αντίστοιχες βιβλιοθήκες φασμάτων.
- × *Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor ion scan)*, όπου τα ιόντα εισέρχονται στον πρώτο αναλυτή μάζας, ο οποίος λειτουργεί σε πλήρη σάρωση (βλ. σχήμα 3.13II). Στη συνέχεια, τα ιόντα εισέρχονται στην κυψελίδα συγκρούσεων, όπου υπόκεινται σε διάσπαση, σχηματίζοντας θυγατρικά ιόντα. Ο επόμενος αναλυτής μάζας επιτρέπει μόνο σε θυγατρικά με συγκεκριμένο λόγο m/z να εξέλθουν προς τον ανιχνευτή. Το φάσμα μαζών που προκύπτει, δείχνει τα πρόδρομα ιόντα που διασπάστηκαν για την παραγωγή του επιλεγμένου θυγατρικού ιόντος. Ο τύπος αυτός σάρωσης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτες σχετικές με τη δομή και τη θραυματοποίηση μιας ένωσης.

23 Η τεχνική αυτή αυξάνει την επιλεκτικότητα της φασματομετρίας μάζας για μεμονωμένους αναλύτες και μειώνει την απόκριση σε άλλους, μειώνοντας τον θόρυβο του υποβάθρου (*background noise*). Ωστόσο, υπάρχει ο κίνδυνος για ψευδώς θετικά αποτελέσματα, καθώς οποιαδήποτε ένωση δίνει το συγκεκριμένο ιόν μπορεί να συμπεριριστεί. [101],[113]

24 Τα πειράματα αυτά παρέχουν πληροφορίες για τη δομή μιας ένωσης και χρησιμοποιούνται για την εξέταση πολύπλοκων μειγμάτων (π.χ. βιολογικά δείγματα). Ωστόσο υστερούν, λόγω της αργής σάρωσης, με αποτέλεσμα να μην ευνοείται η εφαρμογή τους σε ποσοτικές αναλύσεις. Χρησιμοποιούνται για την ποσοτική αποτίμηση ενώσεων σε περίπλοκα δείγματα συνήθως σε συνδυασμό με άλλες τεχνικές MS/MS . [101]



Σχήμα 3.13: Σχηματική αναπαράσταση διαφόρων τύπων πειραμάτων διαδοχικής φασματομετρίας μάζας. Συγκεκριμένα: I. Σάρωση παραγόμενων - θυγατρικών ιόντων (Product ion scan), II. Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor ion scan), III. Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (Constant neutral loss scan, CNL) και IV. Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης θραυσματοποίησης (Selected reaction monitoring, SRM). [133]

- ✗ Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (Constant neutral loss scan, CNL). Οι δύο αναλυτές (τετράπολα Q1 και Q3) σαρώνουν με καθορισμένη διαφορά λόγω m/z ($m/z(Q1) > m/z(Q3)$). Ανιχνεύονται μόνο τα ιόντα τα οποία χάνουν αυτήν τη συγκεκριμένη μάζα στο θάλαμο θραύσης (βλ. σχήμα 3.13III). Η τεχνική παρέχει τη δυνατότητα να ανιχνευθούν παραγόμενα ιόντα, τα οποία προέρχονται από μια κατηγορία ενώσεων, με παρόμοια δομικά χαρακτηριστικά. Χρησιμοποιείται για αναλύσεις συγγενών ενώσεων οι οποίες μοιράζονται ίδια δομικά στοιχεία, όπως για παράδειγμα διάφορες κατηγορίες λιπιδίων.
- ✗ Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης θραυσματοποίησης (Selected reaction monitoring, SRM). Τα δύο πρώτα στάδια της διαδικασίας είναι ίδια με αυτά της τεχνικής σάρωσης θυγατρικών ιόντων. Εν συνεχεία παρακολουθείται μια συγκεκριμένη αντίδραση θραυσματοποίησης ενός ιόντος ή μια ομάδα αντιδράσεων θραυσματοποίησης (βλ. σχήμα 3.13IV). Όταν επιλέγεται μία μόνο αντίδραση θραυσματοποίησης (ένα πρόδρομο ιόν προς ένα παραγόμενο ιόν), η μέθοδος ονομάζεται επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων (Single Reaction Monitoring, SRM) και παρέχει υψηλή εκλεκτικότητα και ευαισθησία, εξαιτίας της μείωσης του υποβάθρου του σήματος (χημικού θορύβου). Όταν επιλέγονται δύο ή περισσότερα χαρακτηριστικά θραύσματα, η τεχνική ονομάζεται

παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*)²⁵.

Τέλος, οι δυνατότητες που προσφέρει η τεχνική της πολλαπλής διαδοχικής φασματομετρίας μάζας (MS^n) είναι πολύ σημαντικές και χρήσιμες για την αποκατάσταση της δομής μιας άγνωστης και περίπλοκης ένωσης. Πραγματοποιώντας διαδοχικές απομονώσεις, διασπάσεις ιόντων και λήψεις φασμάτων μαζών μελετάται η δομή της και εν τέλει προσδιορίζεται. Τέτοια δυνατότητα έχουν όργανα με αναλυτές μάζας *IT* και *FT-MS*. [130]

3.11 Οι πολυδύναμες μέθοδοι στον προσδιορισμό γεωργικών φαρμάκων

Από τα μέσα του 20ού αιώνα, οπότε και συνέβη η πράσινη επανάσταση, τα γεωργικά φάρμακα χρησιμοποιούνται ευρέως σε παγκόσμια κλίμακα, προκειμένου να προστατευτούν οι καλλιέργειες από διάφορες απειλές (έντομα, μικροοργανισμούς, ζιζάνια), να αυξηθεί ο ρυθμός παραγωγής και να βελτιωθεί η ποιότητα των γεωργικών προϊόντων. [135],[136]

Συνεπεία και σε απόλυτη αντιδιαστολή με τα οφέλη της επανάστασης αυτής, οι χρόνιες ασθένειες αποτελούν την κύρια αιτία θανάτου στους ανθρώπους τα τελευταία χρόνια, ενώ ο επιπολασμός αναμένεται να αυξηθεί. Παρόλο που υπάρχουν πολλοί παράγοντες κινδύνου, η συσχέτιση μεταξύ έκθεσης σε γεωργικά φάρμακα και κινδύνου εμφάνισης χρόνιων ασθενειών έχει αυξηθεί την ανησυχία για τη δημόσια υγεία. Οι περιβαλλοντικές εκθέσεις των ανθρώπων σε γεωργικά φάρμακα έχουν συσχετιστεί με καρδιακές παθήσεις, παχυσαρκία, αρθρίτιδα, καρκίνο, αναπνευστικές ασθένειες, διαβήτη και νευροεκφυλιστικές διαταραχές. [137],[138],[139],[140],[141],[142],[143] Επιπλέον, στοιχεία που προκύπτουν από νέες έρευνες δείχνουν ότι όταν οι εκθέσεις συμβαίνουν σε συνδυασμό, αυξάνονται οι συνολικές, ακούσιες συνέπειες της τοξικότητας των φυτοπροστατευτικών προϊόντων, ενώ οι επιπτώσεις δεν μπορούν να εξηγηθούν απλά συνοψίζοντας τις μεμονωμένες επιδράσεις. Ως εκ τούτου υπάρχει ανάγκη να μελετηθούν τέτοιου είδους μείγματα. Οι μελέτες που διερευνούν τις επιδράσεις σύνθετων τοξικών μειγμάτων διαρκώς εξελίσσονται, αλλά ενέχουν προκλήσεις, δεδομένου ότι οι δόσεις έκθεσης των περιεχόμενων στα μείγματα γεωργικών φαρμάκων ενδέχεται να ποικίλουν

25 Με αυτή τη διαδικασία επιτυγχάνεται γρήγορη σάρωση και υψηλή εκλεκτικότητα. Ο συνδυασμός ενός πρόδρομου ιόντος (με συγκεκριμένο λόγο m/z) και συγκεκριμένων μεταπτώσεων του (θυγατρικά δηλαδή ιόντα) σε συγκεκριμένη αναλογία αποτελούν συνήθως ταυτότητα για μία ένωση. Για να παρεμποδίζει λοιπόν μια ένωση τη μέτρηση, θα πρέπει συγχρόνως να σχηματίσει α. πρόδρομο ιόν του ίδιου ή παραπλήσιου λόγου m/z με τον αναλύτη στόχο, ανάλογα με τη διαχωριστική ικανότητα του αναλυτή και β. τα ίδια θυγατρικά ιόντα κατά τη διάσπασή της, για το οποίο η πιθανότητα είναι μικρή. Έτσι, αυξάνεται σημαντικά η επιλεκτικότητα, βελτιώνοντας ταυτόχρονα την ακρίβεια του ποσοτικού προσδιορισμού και την ευαισθησία της ανάλυσης, αφού οι παρεμποδιστές από το υπόστρωμα έχουν μειωθεί ή αρθεί και ο θόρυβος του υποβάθρου (*background noise*) στο χρωματογράφημα είναι χαμηλός, άρα το συγκεκριμένο σήμα αντιστοιχεί σε πολύ υψηλότερο λόγο σήματος προς θόρυβο (S/N). [101],[113],[130],[134]

σημαντικά και οι αθροιστικές εκθέσεις σε κρίσιμα αναπτυξιακά στάδια είναι σε μεγάλο βαθμό άγνωστες. [144]

Εξαιτίας της εγγενούς αυτής τοξικότητάς τους, της ενδεχόμενης υπέρβασης των ενδεικνυόμενων ποσοστών και συγκεντρώσεών τους και της πιθανής μη προβλεπόμενης ορθής εφαρμογής τους, υπάρχει ανάγκη ανάπτυξης μεθόδων για τον ταυτόχρονο ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό πολλών γεωργικών φαρμάκων, καθώς αυτά μπορούν να παραμείνουν στα προϊόντα μετά την εφαρμογή τους στον αγρό και δυνητικά να καταλήξουν στους οργανισμούς που θα τα καταναλώσουν.

Ωστόσο, οι χημικές και οι φυσικές ιδιότητες των ουσιών αυτών μπορούν να διαφέρουν σημαντικά. Έτσι, υπάρχουν μόρια με όξινο, ουδέτερο ή βασικό χαρακτήρα, ενώ ορισμένα από αυτά περιέχουν ετεροάτομα, όπως άτομα αλογόνων, φωσφόρου, θείου ή αζώτου, η παρουσία των οποίων μπορεί να είναι χρήσιμη για την ανίχνευσή τους. Κάποιες ενώσεις δε, μπορεί να είναι ιδιαίτερα πτητικές, ενώ άλλες να μην εξατμίζονται. Αυτή η διακύμανση στα χαρακτηριστικά τους προκαλεί δυσκολίες στην ταυτόχρονη χημική ανάλυση. [136]

Η ανάπτυξη, η επικύρωση και εφαρμογή πολυδύναμων μεθόδων (*multi-residue methods*) για τον έλεγχο της παρουσίας υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων σε τρόφιμα γεωργικής προέλευσης, στο νερό και στο έδαφος, αναπτύσσεται εδώ και είκοσι περίπου χρόνια από διάφορα εργαστήρια ανά τον κόσμο, ενώ τα τελευταία χρόνια εφαρμόζεται και για βιολογικά υποστρώματα. Η ανάγκη αυτή προέκυψε από την απαίτηση για ανίχνευση και ποσοτικοποίηση πληθώρας αναλυτών σε σύντομο χρόνο. Η προκατεργασία των δειγμάτων στο πλαίσιο της απομόνωσης των αναλυτών στόχων από το υπόστρωμα ακολουθείται από βασικές τεχνικές ενόργανης ανάλυσης *GC-MS/MS* και *LC-MS/MS*, οι οποίες είναι σε θέση να ικανοποιήσουν τις σύγχρονες απαιτήσεις ευαισθησίας, που συνήθως καθορίζονται από αρμόδιες ρυθμιστικές αρχές, ταχύτητας και αυξημένου αριθμού δειγμάτων. Συνεπώς, η εφαρμογή μίας πολυδύναμης μεθόδου στοχεύει στον προσδιορισμό της ποσότητας κάθε υπολειμματικής ουσίας που περιλαμβάνεται στο πεδίο εφαρμογής της και η οποία ανακτήθηκε από όλα τα στάδια προκατεργασίας του δείγματος. [19],[25],[115],[116],[117],[135],[136],[144],[145],[146],[147],[148],[149]

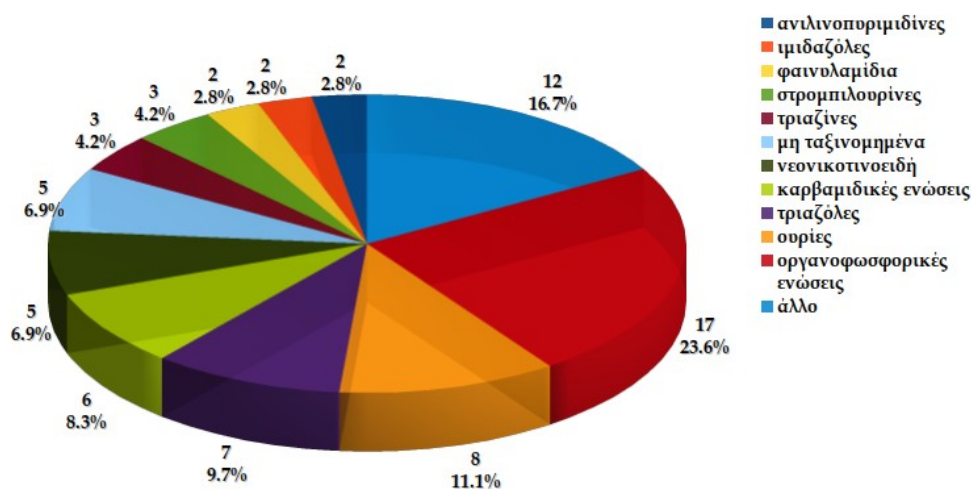
Τμήμα Β

Πειραματικό Μέρος

Κεφάλαιο 4 Προκατεργασία δειγμάτων & ενόργανη ανάλυση

4.1 Εισαγωγή

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η ανάπτυξη, η βελτιστοποίηση και η επικύρωση μιας πολυδύναμης μεθόδου, κατάλληλης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό εβδομήντα δύο (72) φυτοπροστατευτικών προϊόντων και μεταβολιτών τους (στο εξής αναλύτες στόχοι, α.σ.) σε βιολογικά υποστρώματα ορού αίματος και ούρων. Η διαδικασία αυτή περιελάμβανε την εκτέλεση πειραματικών δοκιμών, τόσο για την προκατεργασία των δειγμάτων και την αποδέσμευση των αναλυτών στόχων από τα βιολογικά υποστρώματα, όσο και για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό τους με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (σύστημα LC-ESI-MS/MS). Εξετάστηκαν τρία (3) πρωτόκολλα προκατεργασίας δειγμάτων και δύο (2) πρωτόκολλα ενόργανης ανάλυσης προς αναζήτηση του βέλτιστου δυνατού αποτελέσματος. Ενδεικτικά, μεταξύ των 72 α.σ. περιλαμβάνονται 27 εντομοκτόνα, 13 ζιζανιοκτόνα, 24 μυκητοκτόνα και 12 μόρια - μεταβολίτες μητρικών φυτοπροστατευτικών προϊόντων (φ.π.), ορισμένα εκ των οποίων είναι και τα ίδια δραστικές ουσίες φ.π.. όσον αφορά τις ομάδες - χημικές οικογένειες, στους 72 α.σ. περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων 17 οργανοφωσφορικές ενώσεις, 8 ουρίες, 7 τριαζόλες, 6 καρβαμιδικές ενώσεις, 5 νεονικοτινοειδή, 3 τριαζίνες, 3 στρομπιλουρίνες, 2 φαινυλαμίδια, 2 ιμιδαζόλες και 2 ανιλνοποριμιδίνες. Βάσει του ΕΚ 1107/2009 (βλ. §1.6.4), από τους 72 α.σ., 24 είναι εγκεκριμένοι προς χρήση και 43 μη εγκεκριμένοι, με τελευταία σχετική ενημέρωση τον Οκτώβριο του 2021. Οι υπόλοιποι 5 είναι μεταβολίτες μητρικών μορίων, οπότε δεν εμπίπτουν και δεν εξετάζονται από αυτή τη νομοθεσία. Στο διάγραμμα 4.1 απεικονίζονται οι απόλυτοι αριθμοί και τα ποσοστά επί του συνόλου των 72 α.σ. των διαφόρων ομάδων - χημικών οικογενειών. Αναλυτικά όλοι οι α.σ. παρουσιάζονται με αλφαβητική σειρά στον πίνακα 1 του Παραρτήματος.



Σχήμα 4.1: Οι απόλυτοι αριθμοί και τα ποσοστά των διαφόρων ομάδων - χημικών οικογενειών που περιλαμβάνονται στο σύνολο των 72 αναλυτών στόχων.

4.2 Υλικά και εργαστηριακός εξοπλισμός

Κατά την εκτέλεση των πειραμάτων και τον προσδιορισμό των αναλυτών στόχων χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα:

Εργαστηριακά σκεύη & αναλώσιμα:

- × πλαστικά σωληνάρια φυγοκέντρισης (PP, τύπου *Falcon*) των 15mL με βιδωτό πώμα
- × γυάλινες πιπέτες *Pasteur* των 150mm
- × ρύγχη για αυτόματες πιπέτες *Gilson* με εσωτερικό έμβολο για την λήψη οργανικών διαλυτών σε όγκους 1-10μL (*CP10*), 10-100μL (*CP100*) και 100-1000μL (*CP1000*)
- × μικροστήλες (φυσίγγια) για εκχύλιση στερεάς φάσης *HybridSPE[®]-Phospholipid*, *Supelco*, bed wt. 30mg, volume 1mL
- × μικροστήλες (φυσίγγια) για εκχύλιση στερεάς φάσης *Supel[™]-Select HLB SPE Tube*, *Supelco*, bed wt. 60mg, volume 3mL
- × σπάτουλες και σκαφίδια ζύγισης
- × πλαστικά και γυάλινα ποτήρια ζέσεως των 25mL, 50mL και 100mL
- × γυάλινα φιαλίδια διαφόρων όγκων (4mL, 8mL και 12mL) με βιδωτό πώμα
- × φιάλες από βοριοπυριτικό γυαλί των 250mL, 500mL και 1000mL με βιδωτό πώμα
- × πλαστικοί και γυάλινοι ογκομετρικοί κύλινδροι των 25mL, 50mL και 100mL
- × γυάλινες ογκομετρικές φιάλες Class A των 2mL, 5mL, 10mL και 20mL
- × γυάλινα σωληνάρια συλλογής εκχυλισμάτων (για το σύστημα συστοιχίας κενού για εκχύλιση στερεάς φάσης)
- × γυάλινα σκουρόχρωμα φιαλίδια χρωματογραφίας (*vials*) με βιδωτό πώμα, όγκου 1,5mL και κατάλληλοι υποδοχείς (*inserts*) των 200μL
- × μέσα ατομικής προστασίας (εργαστηριακή ποδιά, γάντια νιτριλίου, προστατευτικά γυαλιά και μάσκες)

Εργαστηριακές συσκευές:

- × αναλυτικός ζυγός πέντε (5) δεκαδικών ψηφίων *AB 135-S/FACT*, *Mettler Toledo*
- × αυτόματες πιπέτες *Gilson* μεταβλητού όγκου 1-10μL (*M10*), 10-100μL (*M100*) και 100-1000μL (*M1000*)
- × αυτόματος αναδευτήρας περιδίνησης *Vortex MS1 Minishaker IKA[®]*
- × ψυχόμενη φυγόκεντρος *Thermo Scientific[™] Heraeus Labofuge[™] 400R*

- × ψηφιακό εργαστηριακό pH-μετρο πάγκου CG 842, Schott Geräte GmbH
- × εργαστηριακή αντλία κενού Thomas Industries Inc. model 905CD18 524 ITFE, Gilford Instruments Lab. USA model 3022A
- × σύστημα συστοιχίας κενού για εκχύλιση στερεάς φάσης 10 θέσεων IST Vac Master 10
- × σύστημα παραγωγής υπερκάθαρου νερού Ultra Clear® TWF UV with 30 liter permeate tank, SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation GmbH
- × σύστημα συμπίκνωσης διαλυμάτων με ρεύμα αζώτου Techne®, Bibby Scientific
- × σύστημα υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας, Agilent Technologies 6410 Series Triple Quad LC/MS, Model: G6410B και λογισμικό πακέτο MassHunter Workstation Software του ίδιου οίκου.

4.3 Χημικά αντιδραστήρια και πρότυπα διαλύματα

Για την παρασκευή των προτύπων διαλυμάτων και για την εκτέλεση των πειραματικών πρωτοκόλλων εν συνόλω χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα είδη. Επισημαίνεται, ότι οι χειρισμοί όλων των διαλυτών, αντιδραστηρίων και προτύπων διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγούς εστίες, τηρώντας τους εργαστηριακούς κανόνες ασφάλειας και υγιεινής, με χρήση όλων των απαιτούμενων μέσων ατομικής προστασίας.

Διαλύτες:

- × υπερκάθαρο νερό (ddH₂O) από το σύστημα παραγωγής (βλ. §4.2)
- × μεθανόλη (MeOH), Methanol LC-MS Grade (≥ 99.9%), Fisher Chemical
- × ακετονιτρίλιο (ACN), Acetonitrile LC-MS Reagent, J.T. Baker®
- × ακετόνη (CH₃COCH₃), Acetone Pestipur - For pesticide analysis, Carlo Erba Reagents
- × n-εξάνιο, (C₆H₁₄), n-Hexane Plus - For residual pesticide analysis, Carlo Erba Reagents

Αντιδραστήρια:

- × φορμικό αμμώνιο (NH₄HCO₂), Ammonium Formate Optima LC/MS, Fisher Chemical
- × οξικό νάτριο άνυδρο (CH₃COONa), Sodium acetate anhydrous (USP) PRS-CODEX, Panreac
- × φορμικό οξύ (CH₂O₂), Formic acid for mass spectrometry, Honeywell Fluka™
- × οξικό οξύ (CH₃COOH), Acetic acid glacial RS - For LC/MS, Carlo Erba Reagents

Πρότυπα & ενδιάμεσα διαλύματα παρακαταθήκης²⁶:

- × πρότυπο διάλυμα (ενδιάμεσο διάλυμα παρακαταθήκης) μείγματος εβδομήντα δύο (72) αναλυτών στόχων (α.σ.), συγκέντρωσης 3ppm σε μεθανόλη. Το διάλυμα παρασκευάστηκε με ανάμειξη προτύπων διαλυμάτων των επιμέρους ουσιών, τα οποία με τη σειρά τους παρασκευάστηκαν από πρότυπες στερεές ουσίες. Αναλυτικά η ποιοτική σύσταση του μείγματος φαίνεται στον πίνακα 1 του Παραρτήματος
- × πρότυπο διάλυμα (διάλυμα παρακαταθήκης) ισοτοπικά επισημασμένου εσωτερικού προτύπου *Carbendazim D3* συγκέντρωσης 760,1ppm σε μεθανόλη
- × πρότυπο διάλυμα (διάλυμα παρακαταθήκης) ισοτοπικά επισημασμένου εσωτερικού προτύπου *Imidacloprid D4* συγκέντρωσης 541ppm σε μεθανόλη
- × πρότυπο διάλυμα (διάλυμα παρακαταθήκης) ισοτοπικά επισημασμένου εσωτερικού προτύπου *Chlorpyrifos D10* συγκέντρωσης 822ppm σε μεθανόλη
- × πρότυπο διάλυμα (διάλυμα παρακαταθήκης) ισοτοπικά επισημασμένου εσωτερικού προτύπου *Dimethoate D6* συγκέντρωσης 720ppm σε μεθανόλη

Ανθρώπινα δείγματα ορού αίματος και ούρων:

Τα εργαστηριακά λευκά δείγματα (control) που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα για την εκπόνηση των πειραμάτων και την επικύρωση των μεθόδων, ήταν δείγματα που διέθετε ήδη το *Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του ΜΦΙ*. Για τα δείγματα αυτά υπήρχε δήλωση συγκατάθεσης και σχετική έγκριση από την *Επιτροπή Ηθικής και Δεοντολογίας Ερευνών (Ε.Η.Δ.Ε.) του ΜΦΙ*.

4.4 Παρασκευή διαλυμάτων και εμβολιασμός δειγμάτων

Όλες οι παρασκευές διαλυμάτων πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγούς εστίες, τηρώντας τους εργαστηριακούς κανόνες ασφάλειας και υγιεινής, με χρήση όλων των απαιτούμενων μέσων ατομικής προστασίας.

Πρότυπα διαλύματα²⁶:

- × *πρότυπα διαλύματα των 72 α.σ.:* για τον εμβολιασμό των δειγμάτων και την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων εργασίας του μείγματος των 72 α.σ. παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 300ppb και 30ppb σε μεθανόλη με κατάλληλες αραιώσεις του πρότυπου διαλύματος 3ppm. Για τα υψηλότερα επίπεδα συγκέντρωσης των 500ppb, 375ppb και 100ppb χρησιμοποιήθηκε απευθείας το τελευταίο.
- × *ενδιάμεσα διαλύματα ισοτοπικά επισημασμένων εσωτερικών προτύπων:* κατ' αντιστοιχία παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 1ppm για το *Carbendazim D3*

²⁶ Όλα τα διαλύματα της κατηγορίας φυλάσσονται υπό κατάψυξη στους -20°C.

και 2ppm για τα *Imidacloprid D4*, *Chlorpyrifos D10* και *Dimethoate D6* σε μεθανόλη με κατάλληλες αραιώσεις.

Διάφορα διαλύματα

- × διάλυμα μεθανόλης με 1% φορμικό αμμώνιο (*w/v*) *MeOH* - 1% *NH₄HCO₂*: παρασκευάστηκε με ζύγιση κατάλληλης ποσότητας φορμικού αμμωνίου και προσθήκη σε καθορισμένο όγκο μεθανόλης.
- × υδατικό διάλυμα οξικού νατρίου 0,2M: παρασκευάστηκε με ζύγιση κατάλληλης ποσότητας οξικού νατρίου και προσθήκη σε καθορισμένο όγκο υπερκάθαρου νερού.
- × μείγματα διαλυτών μεθανόλη:νερό (*MeOH:H₂O* 75:25, *v/v*), ακετονιτριλίο:νερό (*ACN:H₂O* 1:1, *v/v*) & οξικό οξύ:μεθανόλη:νερό (*CH₃COOH:MeOH:H₂O* 1:5:94, *v/v/v*): παρασκευάστηκαν με ανάμειξη κατάλληλων όγκων των επιμέρους διαλυτών.

Κινητές φάσεις υγρής χρωματογραφίας:

- × υδατική φάση 5mM *NH₄HCO₂* σε *ddH₂O*, pH 3. Σε 1L υπερκάθαρου νερού προστίθενται περίπου 314mg (5mM) φορμικού αμμωνίου, 1mL φορμικού οξέος και 200μL ακετονιτριλίου.
- × οργανική φάση 5mM *NH₄HCO₂* σε *MeOH*, pH 3. Σε 1L μεθανόλης προστίθενται περίπου 314mg (5mM) φορμικού αμμωνίου, 1mL φορμικού οξέος.

4.5 Ανάπτυξη μεθόδου

Εξετάστηκαν τρία (3) πρωτόκολλα προκατεργασίας δειγμάτων συνδυαστικά με δύο (2) πρωτόκολλα ενόργανης ανάλυσης, εξετάζοντας τη δυνατότητα ανάπτυξης και επικύρωσης μιας πολυδύναμης μεθόδου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης των 72 α.σ.. Τα πρωτόκολλα αυτά παρουσιάζονται παρακάτω. Η εφαρμογή τους έγινε σε δύο (2) επίπεδα συγκεντρώσεων, 5ppb και 50ppb, προκειμένου να εξαχθούν βασικά ενδείξεις για το ποιο παρέχει τα βέλτιστα αποτελέσματα, ώστε να χρησιμοποιηθεί για τη διαδικασία της επικύρωσης.

4.5.1 Πειραματική διαδικασία - Προκατεργασία δειγμάτων

Η πειραματική διαδικασία ουσιαστικά αφορά στην προκατεργασία των δειγμάτων και στο στάδιο της ανάπτυξης της μεθόδου χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα ούρων και ορού αίματος σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων και σε διάφορους διαλύτες, ανάλογα με το εξεταζόμενο πρωτόκολλο. Όλες οι πειραματικές διαδικασίες

πραγματοποιήθηκαν σε απαγωγούς εστίες, τηρώντας τους εργαστηριακούς κανόνες ασφάλειας και υγιεινής, με χρήση όλων των απαιτούμενων μέσων ατομικής προστασίας.

Οι αναλυτικοί γύροι (*batches*) που έλαβαν χώρα περιελάμβαναν τα είδη που περιγράφονται ακολούθως, ενώ τα σχετικά πρωτόκολλα προκατεργασίας που εφαρμόστηκαν αναλύονται στην παράγραφο 4.5.2.

- × *Πρότυπα διαλύματα (Standards) των 72 α.σ. στα 5ppb και στα 50ppb και σε διάφορους διαλύτες, MeOH, MeOH:H₂O (75:25) και ACN:H₂O (1:1), ανάλογα με το εφαρμοζόμενο πρωτόκολλο προκατεργασίας κατά τη φάση ανάπτυξης της μεθόδου και σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων από 1,25ppb έως 500ppb κατά την επικύρωσή της.*
- × *Λευκά δείγματα ορού αίματος και ούρων (blank blood serum & urine samples) από λευκό εργαστηριακό δείγμα ορού αίματος και ούρων, ακολουθώντας τα διάφορα πρωτόκολλα προκατεργασίας, χωρίς την προσθήκη προτύπων διαλυμάτων των 72 α.σ. και των εσωτερικών προτύπων. Μετά την επεξεργασία τους, τα λευκά δείγματα αναμείχθηκαν (για το κάθε πρωτόκολλο χωριστά), δημιουργώντας κοινά διαλύματα (pooled blank samples).*
- × *Matrix-matched samples. Τα κοινά διαλύματα των λευκών δειγμάτων (pooled blank samples) αποτέλεσαν τη βάση για την παρασκευή διαλυμάτων των 72 α.σ. σε διάφορα επίπεδα συγκεντρώσεων. Τα Matrix-matched samples ουσιαστικά περιέχουν την επιθυμητή συγκέντρωση των αναλυτών στόχων με εμβολιασμό του υποστρώματος με κατάλληλη ποσότητα των προτύπων διαλυμάτων των 72 α.σ., μετά την προκατεργασία του.*
- × *Εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος και ούρων – διαλύματα βαθμονόμησης και δείγματα ελέγχου ποιότητας (Spiked blood serum and urine Calibration Standards and QCs): παρασκευάστηκαν από το ίδιο εργαστηριακό δείγμα ούρων και ορού αίματος με εμβολιασμό του με τα πρότυπα διαλύματα των 72 α.σ. με κατάλληλες αραιώσεις, επώαστηκαν για 90min σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ακολούθως επεξεργάστηκαν κατά περίπτωση με τα εξεταζόμενα πρωτόκολλα προκατεργασίας δειγμάτων.*
- × *Εσωτερικά πρότυπα ισοτοπικά επισημασμένα (ISs): Carbendazim D3, Imidacloprid D4, Chlorpyrifos D10 & Dimethoate D6. Στα δύο διαλύματα που παρασκευάστηκαν (Standards, Matrix-matched samples & Spiked urine samples) προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες από τα διαλύματα εργασία 1ppm, 2ppm, 2ppm & 2ppm, ώστε να προκύψουν τελικές συγκεντρώσεις 40ppb, 50ppb, 100ppb και 100ppb αντίστοιχα.²⁷*

²⁷ Για όλα τα πειράματα που διεξήχθησαν και για όλα τα διαλύματα στα οποία έγινε προσθήκη εσωτερικών προτύπων ή/και εμβολιασμός (*Standards, Matrix - Matched Samples & Spiked Blood Serum and Urine Samples*) οι ενέργειες αυτές πραγματοποιήθηκαν σε αρχικό στάδιο, προκειμένου ο συνολικός όγκος των αντίστοιχων διαλυμάτων να εξατμιστεί σε ρεύμα αζώτου και να μην συνυπολογιστεί στις αραιώσεις.

4.5.2 Βελτιστοποίηση διαδικασίας προκατεργασίας δειγμάτων

Τα εργαστηριακά δείγματα ούρων και ορού αίματος αποθηκεύονται σε θερμοκρασία -20°C. Πριν την ανάλυση αποψύχονται και αφότου έρθουν σε θερμοκρασία δωματίου ξεκινά η διαδικασία της προκατεργασίας τους, προκειμένου να καταστούν κατάλληλα για την ενόργανη ανάλυση στο σύστημα LC-ESI-MS/MS.

4.5.2.1 Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων I

Το πρωτόκολλο βασίστηκε σε σχετικές ερευνητικές εργασίες, οι οποίες παρατίθενται στη βιβλιογραφία ([115],[117]).

- × Λαμβάνονται με αυτόματη πιπέτα 250μL δείγματος και μεταφέρονται σε ένα πλαστικό σωληνάριο (PP) τύπου *Falcon* των 15mL.
- × Προστίθενται 750μL του διαλύματος MeOH - 1% NH₄HCO₂.
- × Το φιαλίδιο πωματίζεται και ανακινείται έντονα με τη χρήση Vortex για 30sec.
- × Ακολουθεί φυγοκέντρωση σε 4500 rpm στους 10°C για 5 λεπτά.
- × Η διαδικασία αποσκοπεί στην κατακρήμνιση των πρωτεϊνών και άλλων ενδογενών συστατικών του υποστρώματος.
- × Μετά τη φυγοκέντρωση, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε μικροστήλη εκχύλισης στερεάς φάσης (*Hybrid-SPE cartridge*) και διηθείται υπό κενό στο σύστημα συστοιχίας κενού.
- × Η διαδικασία της εκχύλισης αποσκοπεί στην κατακράτηση από το υλικό της στήλης των φωσφολιπιδίων και άλλων συστατικών του υποστρώματος.
- × Αμέσως πριν τη διήθηση του δείγματος, η μικροστήλη έχει τοποθετηθεί στο σύστημα συστοιχίας κενού για εκχύλιση στερεάς φάσης και έχει ενεργοποιηθεί (*conditioning*) με 1mL του διαλύματος MeOH - 1% NH₄HCO₂, που χρησιμοποιήθηκε και στο αρχικό στάδιο της πειραματικής διαδικασίας, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν επιμολύνσεις από τα υλικά της στήλης.
- × Το εκχύλισμα συλλέγεται και τοποθετείται σε φιαλίδιο χρωματογραφίας, προκειμένου να ακολουθήσει η ανάλυση στο σύστημα LC-ESI-MS/MS.

4.5.2.2 Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων II

Η εφαρμογή του πρωτοκόλλου βασίστηκε σε σχετική ερευνητική εργασία, η οποία παρατίθεται στη βιβλιογραφία ([19]).

- × Λαμβάνονται με πιπέτα ακριβείας 250μL δείγματος και μεταφέρονται σε ένα πλαστικό σωληνάριο (PP) τύπου *Falcon* των 15 mL.
- × Προστίθενται 400μL διαλύματος CH₃COONa 0,2M.

- x Το φιαλίδιο πωματίζεται και ανακινείται έντονα με τη χρήση Vortex για 30sec.
- x Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 4500 rpm στους 10°C για 5 λεπτά.
- x Μετά τη φυγοκέντριση, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε μικροστήλη εκχύλισης στερεάς φάσης (HLB) και διηθείται υπό κενό στο σύστημα συστοιχίας κενού.
- x Αμέσως πριν τη διήθηση του δείγματος, η μικροστήλη έχει τοποθετηθεί στο σύστημα συστοιχίας κενού για εκχύλιση στερεάς φάσης και έχει ενεργοποιηθεί (*conditioning*) διαδοχικά με 2mL CH₃COCH₃ και 2mL CH₃COOH, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν επιμολύνσεις από τα υλικά της στήλης.
- x Ακολουθεί έκπλυση της μικροστήλης με 2mL διαλύματος CH₃COOH:MeOH:H₂O (1:5:94) και διατήρηση του κενού για 5min, ώστε να στεγνώσει η μικροστήλη.
- x Το εκχύλισμα απορρίπτεται.
- x Ακολουθεί έκπλυση της μικροστήλης με 3mL CH₃COCH₃ και έπειτα 3mL C₆H₁₄.
- x Τα εκχυλίσματα αυτά συλλέγονται, αναμειγνύονται και εξατμίζονται σχεδόν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου.
- x Πραγματοποιείται ανασύσταση με 250μL ACN:H₂O (1:1, v/v) ή MeOH:H₂O (75:25) και εν συνεχεία ανακίνηση με χρήση Vortex.
- x Το διάλυμα μεταφέρεται σε υποδοχέα (*insert*) και τοποθετείται μέσα φιαλίδιο χρωματογραφίας, προκειμένου να ακολουθήσει η ανάλυση στο σύστημα LC-ESI-MS/MS.

4.5.2.3 Πρωτόκολλο προκατεργασίας δειγμάτων III

Το πρωτόκολλο αυτό αποτελεί παραλλαγή του προηγούμενου (βλ. §4.5.2.2) [19].

- x Λαμβάνονται με πιπέτα ακριβείας 250μL δείγματος και μεταφέρονται σε ένα πλαστικό σωληνάριο (PP) τύπου *Falcon* των 15 mL.
- x Προστίθενται 200μL διαλύματος CH₃COONa, 0,2M.
- x Το φιαλίδιο πωματίζεται και ανακινείται έντονα με τη χρήση Vortex για 30sec.
- x Ακολουθεί φυγοκέντριση σε 4500 rpm στους 10°C για 5 λεπτά.
- x Μετά τη φυγοκέντριση, το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρεται ποσοτικά σε μικροστήλη εκχύλισης στερεάς φάσης (HLB) και διηθείται υπό κενό στο σύστημα συστοιχίας κενού.
- x Αμέσως πριν τη διήθηση του δείγματος, η μικροστήλη έχει τοποθετηθεί στο σύστημα συστοιχίας κενού για εκχύλιση στερεάς φάσης και έχει ενεργοποιηθεί (*conditioning*) διαδοχικά με 2mL CH₃COCH₃ και 2mL CH₃COOH, προκειμένου να απομακρυνθούν τυχόν επιμολύνσεις από τα υλικά της στήλης.

- × Ακολουθεί έκπλυση της μικροστήλης με 2mL διαλύματος CH₃COOH:MeOH:H₂O (1:5:94) και διατήρηση του κενού για 5min, προκειμένου να στεγνώσει η μικροστήλη.
- × Το εκχύλισμα απορρίπτεται.
- × Ακολουθεί διαδοχική έκπλυση της μικροστήλης με 3mL CH₃COCH₃, 3mL C₆H₁₄ και τέλος πάλι 3mL CH₃COCH₃.
- × Τα εκχυλίσματα συλλέγονται, αναμειγνύονται και εξατμίζονται σχεδόν μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου.
- × Πραγματοποιείται ανασύσταση με 250μL MeOH:H₂O (75:25) και εν συνεχεία ανακίνηση με χρήση Vortex.
- × Το διάλυμα μεταφέρεται σε υποδοχέα (*insert*) και τοποθετείται μέσα φιαλίδιο χρωματογραφίας, προκειμένου να ακολουθήσει η ανάλυση στο σύστημα LC-ESI-MS/MS.

4.5.3 Ενόργανη Ανάλυση - Βελτιστοποίησης συνθηκών λειτουργίας LC-ESI-MS/MS

Για τον αναλυτικό - χρωματογραφικό διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των αναλυτών στόχων στον αναλυτή μάζας εξετάστηκαν δύο πρωτόκολλα, τα οποία εφαρμόζε το Εργαστήριο Τοξικολογικού Ελέγχου Γεωργικών Φαρμάκων του ΜΦΙ σε άλλα υποστρώματα και έχουν εξεταστεί και σε βιολογικά υγρά και περιγράφονται παρακάτω. Οι αναλύσεις πραγματοποιήθηκαν στο σύστημα LC-ESI-MS/MS του εργαστηρίου (βλ. §4.2). Η παραμετροποίηση όλων των παραπάνω συνθηκών και για τα δύο ακόλουθα πρωτόκολλα, καθώς και ο προγραμματισμός όλων των αναλυτικών γύρων έγινε μέσω του λογισμικού *MassHunter Workstation Software*.

4.5.3.1 Πρωτόκολλο ενόργανης ανάλυσης δειγμάτων I

Συνθήκες λειτουργίας LC: Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός των 72 μελετούμενων αναλυτών στόχων (α.σ.) πραγματοποιήθηκε με αναλυτική στήλη ανάστροφης φάσης *Eclipse XDB-C18 (ZORBAX®, Agilent)* μήκους 150mm, διαμέτρου 2.1mm και διαμέτρου σωματιδίων πλήρωσης 3.5μm. Ο όγκος έγχυσης δείγματος ήταν 10μL και η ροή της κινητής φάσης 0,3mL/min. Οι κινητές φάσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υδατική φάση 5mM NH₄HCO₂ σε ddH₂O (φάση A) και οργανική φάση 5mM NH₄HCO₂ σε MeOH (φάση B) (βλ. §4.4), ενώ εφαρμόστηκε βαθμιδωτή έκλυση (*gradient elution*), όπως περιγράφεται αναλυτικά στον πίνακα 4.1. Η μετάβαση μεταξύ διαδοχικών ποσοστών αναλογίας γίνεται γραμμικά. Ο συνολικός χρόνος του χρωματογραφήματος ορίστηκε στα 35,1min, οπότε και το σύστημα επανέρχεται στις αρχικές συνθήκες. Η θερμοκρασία της στήλης παρέμεινε σταθερή, στους 30°C καθ' όλη τη διάρκεια εκτέλεσης του χρωματογραφήματος.

Συνθήκες λειτουργίας ESI-MS/MS: Στο σύστημα ηλεκτροψεκασμού (ESI) εφαρμόστηκε θετικός ιοντισμός, με εφαρμογή δυναμικού +3000V στο γυάλινο τριχοειδές (*capillary*). Ως αέριο εκνέφωσης στην πηγή ιόντων και ως αέριο ξήρασης ή αποδιαλυτοποίησης χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο (N₂) σε πίεση 30psi (1 atm = 14.696 psi) και σε θερμοκρασία 300°C και με ροή 9L/min αντίστοιχα. Επιπλέον το άζωτο χρησιμοποιήθηκε και ως αέριο σύγκρουσης στο τετράπολο q₂ (εν προκειμένω εξαπόλο, βλ. υποσημείωση 22). [150] Ο αναλυτής μάζας τριπλού τετραπόλου ρυθμίστηκε σε λειτουργία MRM. Στον πίνακα 4.2 παρουσιάζονται τα μελετούμενα μόρια κατά την προβλεπόμενη σειρά έκλουσής τους από τη χρωματογραφική στήλη, καθώς και βασικές οργανολογικές και φασματομετρικές παράμετροι της μεθόδου στο κομμάτι της ανάλυσης στο LC-ESI-MS/MS.

Πίνακας 4.1: Το χρονικό προφίλ της βαθμιδωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	Αναλογία φάσεων σε ποσοστό %	
	Φάση A (%)	Φάση B (%)
0	80	20
2	80	20
12	40	60
30	0	100
35	0	100
35,1	80	20

Πίνακας 4.2: Χρωματογραφικές, οργανολογικές και φασματομετρικές παράμετροι στην LC-ESI(+)-MS/MS μέθοδο.

Όνομασία αναλύτη	RT ²⁸ (min)	Πρόδρομο ión (m/z)	Θυγατρικό ión ²⁹ (m/z)	Διάρκεια μέτρησης (ms)	Τάση θραυστήρα (V)	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)	% Αναλογία μεταπτώσεων
<i>Demeton-S-methyl sulfoxide</i>	5.75	247	169	50	21	25	58,5
			109	50	45	25	
<i>Carbendazim</i>	6,30	192	160	20	40	14	25,6
			132	20	40	28	
<i>Thiamethoxam</i>	7,00	292	211	50	51	17	42,7
			181	50	56	31	

28 RT or t_R: ο χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης.

29 Για κάθε μόριο το άνω θυγατρικό ιόν είναι το ιόν ποσοτικοποίησης και το κάτω το ιόν επιβεβαίωσης.

Όνομασία αναλύτη	RT (min)	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Θυγατρικό ιόν (m/z)	Διάρκεια μέτρησης (ms)	Τάση θραυστήρα (V)	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)	% Αναλογία μεταπτώσεων
<i>Monocrotophos</i>	9,50	224	127	50	40	20	9,3
			98	50	46	17	
<i>Imidacloprid</i>	10,54	256	209	50	45	20	53,7
			175	50	45	25	
<i>Clothianidin</i>	10,77	250	169	50	90	5	96,3
			132	50	90	15	
<i>Dimethoate</i>	11,70	230	125	50	11	29	21,1
			199	50	11	13	
<i>Acetamiprid</i>	12,03	223	126	50	36	27	14,2
			90	50	36	45	
<i>Pirimicarb</i>	12,45	239,1	72,1	50	16	31	38
			181,9	50	81	29	
<i>Thiacloprid</i>	13,60	253	126	50	81	29	1
			186	50	76	19	
<i>Tricyclazole</i>	14,23	190	136	50	135	25	56
			163	50	135	25	
<i>Paraoxon-methyl</i>	15,26	248	109	50	130	30	7,1
			202	50	130	30	
<i>Desmetryn</i>	15,67	214	172	50	135	15	3,2
			82	50	135	15	
<i>Phosphamidone</i>	15,70	300	174	50	135	25	-
			-	-	-	-	
<i>Thifensulfuron-methyl</i>	16,50	388	167	50	36	21	10
			204,9	50	36	30	
<i>Carbofuran</i>	16,69	222	123	50	25	40	9,3
			165	50	25	25	
<i>Fenthion Sulfoxide</i>	17,36	295	109	50	135	25	17,7
			280	50	135	25	

Όνομασία αναλύτη	RT (min)	Πρόδρομο ιών (m/z)	Θυγατρικό ιών (m/z)	Διάρκεια μέτρησης (ms)	Τάση θραυστήρα (V)	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)	% Αναλογία μεταπτώσεων
<i>Fenamiphos Sulfone</i>	17,47	336	188 266	50 50	135 135	25 25	22,1
<i>Fenthion Sulfone</i>	17,94	311,0	109 125	50 50	135 135	25 25	75,4
<i>Imazalil</i>	18,35	297	159 109	50 50	135 135	30 30	13,2
<i>Metalaxyl-M</i>	19,24	280,1	159,9 220	50 50	46 46	31 19	16,5
<i>Ametryn</i>	19,30	228,1	186,2 96,1	50 50	36 36	25 35	52,4
<i>Pyrimethanil</i>	20,10	200	107 82	50 50	30 30	30 30	48,3
<i>Azoxystrobin</i>	21,00	404,1	371,9 343,9	50 50	36 36	19 29	35,7
<i>Linuron</i>	21,08	249	159,9 181,9	50 50	66 66	23 21	77,8
<i>Fenamidone</i>	21,34	312	92 236	50 50	41 41	33 19	81,5
<i>Prometryn</i>	21,60	242,1	158,1 200,2	76 76	31 31	31 25	13,8
<i>Boscalid</i>	21,90	343	140 307	76 71	27 27	44 44	14,5
<i>Dimethomorph</i>	21,98	388	165 301	50 50	130 130	30 30	92,5
<i>Cyproconazole</i>	22,37	292,1	70,2 125,1	50 76	16 16	35 35	51,3
<i>Triazophos</i>	22,84	314	162,1 119,1	50 50	36 36	25 47	32,2

Όνομασία αναλύτη	RT (min)	Πρόδρομο ιών (m/z)	Θυγατρικό ιών (m/z)	Διάρκεια μέτρησης (ms)	Τάση θραυστήρα (V)	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)	% Αναλογία μεταπτώσεων
<i>Mepronipirim</i>	22,98	224	77 106	50 50	40 40	49 20	77,7
<i>Ethoprofos</i>	23,41	243	97 131 / 173	50 50	65 65	35 31 (131)	10,6
<i>Alachlor</i>	23,60	270	162 238	50 50	31 31	25 25	2,3
<i>Tetraconazole</i>	23,60	372	159 70	50 50	40 36	40 45	27,9
<i>Fenbuconazole</i>	23,97	337	70 125	50 50	41 41	33 37	52,5
<i>Flusilazole</i>	24,15	316,1	165 247,1	50 50	95 85	45 25	19,7
<i>Coumaphos</i>	24,26	363	227 307	50 50	95 95	20 20	21,8
<i>Fenamiphos</i>	24,26	304,1	217,1 202	50 50	135 135	25 25	49,9
<i>Tebufenozide</i>	24,30	353	133 297	50 50	40 40	20 16	0,3
<i>Penconazole</i>	24,74	284	158,9 70,1	50 50	41 41	39 29	88,9
<i>Tebuconazole</i>	25,06	308	70 125	50 50	30 30	20 35	8,9
<i>Fenthion</i>	25,16	279	247 169	50 50	41 21	10 23	71,5
<i>Benalaxyl</i>	25,21	326,2	148,2 208,2	50 50	130 30	27 21	8
<i>Diazinon</i>	25,31	305,1	169,1 96,6	50 50	21 21	29 29	69,6

Όνομασία αναλύτη	RT (min)	Πρόδρομο ιόν (m/z)	Θυγατρικό ιόν (m/z)	Διάρκεια μέτρησης (ms)	Τάση θραυστήρα (V)	Ενέργεια σύγκρουσης (eV)	% Αναλογία μεταπτώσεων
<i>Pyraclostrobin</i>	25,8	388	163	50	11	29	10,5
			194	50	6	19	
<i>Clofentezine</i>	26,06	303	138	50	56	15	39,2
			102	50	56	47	
<i>Pencycuron</i>	26,30	329	125	50	135	25	0,5
			218	50	135	25	
<i>Caduzafos</i>	25,64	271,1	97	50	66	47	43,4
			159	50	66	19	
<i>Difenoconazole</i>	26,54	406,1	250,9	50	41	37	1,9
			337	50	41	23	
EPN	26,77	324	157	50	135	25	0,8
			296	50	135	25	
<i>Trifloxystrobin</i>	26,80	409	186	50	11	23	12,3
			206	50	6	21	
<i>Clethodim</i>	27,42	360	164	50	135	15	8,7
			268	50	135	15	
<i>Benfuracarb</i>	27,66	411	195	50	35	25	0,6
			252	50	135	25	
<i>Buprofezin</i>	27,76	306	201	50	40	17	82,6
			116	50	40	21	
<i>Ethion</i>	28,69	385	171	50	135	15	13,1
			199	50	135	15	
<i>Chlorpyrifos-ethyl</i>	29,09	350	198	50	21	20	14
			125	50	21	20	

4.5.3.2 Πρωτόκολλο ενόργανης ανάλυσης δειγμάτων II

Συνθήκες λειτουργίας LC: Η αναλυτική στήλη, καθώς και η παραμετροποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών παρέμειναν ίδιες με αυτές του πρωτοκόλλου I (βλ. §4.5.3.1),

εκτός από τη ροή της κινητής φάσης, η οποία ορίστηκε στα 0,28 mL/min. Το πρωτόκολλο περιελάμβανε και το εσωτερικό πρότυπο *Dimethoate D6*.

Συνθήκες λειτουργίας ESI-MS/MS: Στο σύστημα ηλεκτροψεκασμού (ESI) εφαρμόστηκε θετικός ιοντισμός, με εφαρμογή δυναμικού +3000V στο γυάλινο τριχοειδές (capillary). Ως αέριο εκνέφωσης στην πηγή ιόντων και ως αέριο ξήρανσης ή αποδιαλυτοποίησης χρησιμοποιήθηκε αέριο άζωτο (N₂) σε πίεση 40psi και σε θερμοκρασία 300°C και με ροή 11L/min αντίστοιχα. Επιπλέον το άζωτο χρησιμοποιήθηκε και ως αέριο σύγκρουσης στο τετράπολο q₂ (εν προκειμένω εξάπολο, βλ. υποσημείωση 22). [150] Ο αναλυτής μάζας τριπλού τετραπόλου ρυθμίστηκε σε λειτουργία MRM. Αναφορικά με τα αναλυόμενα μόρια, τους 72 α.σ. και τα 4 εσωτερικά πρότυπα, στοιχεία της παραμετροποίησης, όπως ενέργειες θραυσματοποίησης (collision energy) και θυγατρικά ιόντα τροποποιήθηκαν κατά περίπτωση σε σχέση με το πρωτόκολλο ενόργανης ανάλυσης δειγμάτων I (βλ. §4.5.3.1). Αναφορικά με το *Dimethoate D6*, οι μεταπτώσεις του ήταν οι εξής δύο: 236 → 205 & 236 → 177.

4.5.4 Αποτελέσματα διαδικασίας βελτιστοποίησης

Για την επιλογή του βέλτιστου πρωτοκόλλου έγινε εφαρμογή σε δύο (2) επίπεδα συγκεντρώσεων 5ppb και 50ppb και υπολογίστηκαν οι απόλυτες ανακτήσεις (βλ. §2.8.9.3) και οι επί τοις εκατό σχετικές τυπικές τους αποκλίσεις (%RSD) για όλους τους αναλυτές στόχους ανά επίπεδο συγκέντρωσης.

Στο επίπεδο των 5ppb ο συνδυασμός του πρωτοκόλλου προκατεργασίας I (ΠΠΑΙ, βλ. §4.5.2.1) με το πρωτόκολλο ενόργανης ανάλυσης I (ΠΕΑΙ, βλ. §4.5.3.1) έδωσε ανακτήσεις από 64% έως 119% και σχετικές τυπικές αποκλίσεις (%RSD) 1,88% - 19,04%, με εξαίρεση τα *Metalaxyl-M* και *Oxadixyl* με ανακτήσεις 136% ± 7% και 156% ± 30% αντίστοιχα. Οι δύο αυτές υψηλές τιμές αντιστοιχούν στο 3% του συνόλου των 72 αναλυτών στόχων. Ο συνδυασμός ΠΠΑΙ - MeOH/ΠΕΑΙ (βλ. 4.5.2.2) έδωσε ανακτήσεις με εύρος 36% - 172% και %RSD 0% - 32%, ενώ συνολικά εκτός του εύρους 60% - 120% βρισκόταν το 33% των αναλυτών στόχων. Αντίστοιχα, για τον συνδυασμό πρωτοκόλλων ΠΠΑΙ - ACN/ΠΕΑΙ το εύρος ανακτήσεων ήταν από 32% - 174% με %RSD 0% - 31% και συνολικό ποσοστό αναλυτών εκτός του εύρους ανακτήσεων 60% - 120% ίσο με 43%. Για τον τελευταίο συνδυασμό πρωτοκόλλων που εφαρμόστηκε, ΠΠΑΙ - MeOH/ΠΕΑΙ (βλ. §4.5.2.3 & 4.5.3.2), κυμάνθηκαν από 24% έως 165% και τα %RSD από 1% έως 36%. Συνολικά εκτός του εύρους 60% - 120% βρέθηκε το 36% των αναλυτών.

Στο επίπεδο των 50ppb η εικόνα για τον συνδυασμό ΠΠΑΙ/ΠΕΑΙ ήταν παρόμοια, με τα δύο ίδια μόρια να βρίσκονται εκτός επιθυμητού εύρους. Ακολουθώντας τη σειρά πρωτοκόλλων της παραπάνω παραγράφου οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ των τιμών 20% - 167%, 16% - 183% και 27% - 184%, τα %RSD 1% - 45%, 0% - 57% και 1% - 34%. Τα ποσοστά των αναλυτών στόχων εκτός εύρους 60% - 120% ήταν 43%, 32% και 29%.

Ενδεικτικά, για ορισμένες χημικές ομάδες (βλ. §4.1) παρατηρήθηκαν τα εξής:

Στις οργανοφωσφορικές ενώσεις παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των εφαρμοζόμενων πρωτοκόλλων. Το ΠΠΔΙ/ΠΕΑΙ με τη χρήση των μικροστηλών εκχύλισης στερεάς φάσης για δέσμευση των φωσφολιπιδίων και απομάκρυνσή τους από το υποστρώμα (βλ. §4.2) έδωσαν ανακτήσεις για όλα τα μόρια της κατηγορίας μεταξύ 80% (*Ethoprophos*) και 111% (*Omethoate*) στο επίπεδο των 5ppb και μεταξύ 85% (*Fenamiphos*) και 102% (*Omethoate*), ενώ τα %RSD δεν ξεπέρασαν το 11% (*EPN*). Σε κανένα άλλο από τα πρωτόκολλα που εφαρμόστηκαν στο στάδιο της ανάπτυξης - βελτιστοποίησης δεν χρησιμοποιήθηκε ο συγκεκριμένος τύπος μικροστήλης. Με το πρωτόκολλο ΠΠΔΙΙ - *MeOH/ΠΕΑΙ* 2 από τα 17 μόρια της κατηγορίας είχαν ανάκτηση 44% και 6 μόρια ανακτήσεις >120%, ορισμένα δε από αυτά είχαν %RSD>20%. Με το πρωτόκολλο ΠΠΔΙΙ - *ACN/ΠΕΑΙ* 3 μόρια είχαν ανακτήσεις <60% και 9 μόρια >120%, ενώ υπήρχαν και %RSD>20%. Τέλος, στο πρωτόκολλο ΠΠΔΙΙΙ - *MeOH/ΠΕΑΙΙ* 4 μόρια είχαν ανακτήσεις <60% και άλλα 4 ανακτήσεις >120%, ενώ και εδώ παρουσιάστηκαν %RSD>20%. Στο επίπεδο των 50ppb η εικόνα παρουσιάστηκε επίσης σημαντικές αποκλίσεις για αρκετά μόρια.

Οι καρβαμιδικές ενώσεις παρουσίασαν ικανοποιητικές ανακτήσεις με το ΠΠΔΙ/ΠΕΑΙ, ενώ τα άλλα τρία εμφάνισαν αποκλίσεις κυρίως στο *Benfuracarb* και το *Pirimicarb* και λιγότερο στα *Aldicarb sulfone* και *Carbofuran*.

Τα νεονικοτινοειδή είχαν τις βέλτιστες ανακτήσεις με το πρωτόκολλο ΠΠΔΙ/ΠΕΑΙ, ενώ τα ΠΠΔΙΙ - *ACN/ΠΕΑΙ* και ΠΠΔΙΙΙ - *MeOH/ΠΕΑΙΙ* εμφάνισαν κάποιες αποκλίσεις στο *Thiacloprid* και στο *Thiamethoxam*.

Οι 8 ουρίες στο επίπεδο των 5ppb με το πρωτόκολλο ΠΠΔΙ/ΠΕΑΙ είχαν ικανοποιητικές ανακτήσεις από 68% (*Thifensulfuron methyl*) έως 97% (*Linuron*), ενώ τα άλλα τρία πρωτόκολλα ανέκτησαν το *Thifensulfuron methyl* σε ποσοστά υψηλότερα του 120%. Στο επίπεδο των 50ppb το πρωτόκολλο ΠΠΔΙ/ΠΕΑΙ είχε και πάλι ικανοποιητικές ανακτήσεις, ενώ τα άλλα τρία πρωτόκολλα εμφάνισαν ανακτήσεις <60% και >120%.συνολικά σε 6 μόρια της ομάδας.

Όλες οι τριαζόλες είχαν ικανοποιητικές ανακτήσεις (84% - 104%) με το πρωτόκολλο ΠΠΔΙ/ΠΕΑΙ. Με τα υπόλοιπα τρία πρωτόκολλα παρουσιάστηκαν αποκλίσεις (Rec>120%).

Τα σχετικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 5.2. Με βάση την εικόνα των χρωματογραφημάτων, τις απόλυτες ανακτήσεις και τα %RSD τους, εκτιμήθηκε ότι οι βέλτιστες αποδόσεις για το μεγαλύτερο μέρος των 72 αναλυτών στόχων εμφανίζονται κατά την εφαρμογή του ΠΠΔΙ σε συνδυασμό με το ΠΕΑΙ.

4.6 Επικύρωση μεθόδου

Η μέθοδος επικυρώθηκε για όλα τα μόρια σε δύο ανθρώπινα βιολογικά υποστρώματα, ορό αίματος και ούρα. Υπό φυσιολογικές συνθήκες τα μητρικά αυτά μόρια μεταβολίζονται εντός του ανθρώπινου οργανισμού, προκειμένου να απεκκριθούν κυρίως μέσω των ούρων (και των κοπράνων). Βάσει αυτού, έχουν προσδιοριστεί και καθιερωθεί,

κυρίως ως βιοδείκτες έκθεσης, ανάλογα με τη χημική οικογένεια του μελετούμενου μορίου συγκεκριμένοι μεταβολίτες, οι οποίοι προσδιορίζονται στα ούρα. Τέτοιοι είναι για παράδειγμα οι διακυκλο - φωσφορικοί μεταβολίτες (*dialkyl phosphate metabolites, DAPs*) των οργανοφωσφορικών εντομοκτόνων (βλ. §1.6.5.1), το 6-CN (*6-Chloronicotinic acid*) ως μεταβολίτης αρκετών νεονικοτινοειδών [116] και τα DCCA (*3-(2,2-dichloroethenyl)-2,2-dimethyl-cyclopropanecarboxylic acid*) και 3-PBA (*3-Phenoxybenzoic acid*) ως μεταβολίτες πυρεθροειδών [19].

Εξάλλου, ορισμένα από τα μελετούμενα μόρια αποτελούν ήδη αρχικούς μεταβολίτες άλλων μορίων, όπως τα *Aldicarb sulfoxide, Fenamiphos sulfone, Fenthion sulfone* και *Paraoxon-methyl* και θεωρούνται μη ταξινομημένα, ενώ κάποια άλλα είναι και τα ίδια φυτοπροστατευτικά προϊόντα, όπως κάποια καρβαμιδικά (*Aldicarb, Aldicarb sulfone, Carbenfuzim* και *Carbofuran*), κάποια οργανοφωσφορικά εντομοκτόνα (*Dimethoate* και *Omethoate*). Αναλυτικότερα και οι 72 α.σ. παρουσιάζονται στον πίνακα 1 του Παραρτήματος. Για πολλά από αυτά τα μόρια και κάποια άλλα, όπως το *Clothianidin*, έχουν υπάρξει μελέτες στις οποίες φαίνεται πώς σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν προσδιοριστεί στα ούρα. [34],[151],[152],[153],[154],[155],[156],[157],[158],[159],[160],[161],[162]

Στην παρούσα εργασία, δεδομένης της έλλειψης ειδικότερων μεταβολιτών για τα ούρα και έχοντας επίγνωση ότι η παρουσία των 72 μελετούμενων δραστικών ουσιών είναι πιο πιθανή στο αίμα παρά στα ούρα, η επικύρωση έγινε και στα δύο υποστρώματα για το σύνολο των μορίων. Ωστόσο, προκειμένου να περιοριστεί η έκταση των δεδομένων και να εντοπιστεί το ενδιαφέρον στον ορό του αίματος, παρατίθεται ένας ενδεικτικός αριθμός αποτελεσμάτων για την περίπτωση των ούρων.

Η επικύρωση της μεθόδου οργανώθηκε και υλοποιήθηκε λαμβάνοντας υπόψη τις οδηγίες που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2. Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν τα διαλύματα - είδη, όπως περιγράφονται στην παράγραφο 4.5.1 σε υποστρώματα ορού αίματος και ούρων και εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο προκατεργασίας I (βλ. §4.5.2.1) σε συνδυασμό με το πρωτόκολλο ενόργανης ανάλυσης I (βλ. §4.5.3.1).

Εκτιμήθηκαν οι παράμετροι της γραμμικότητας (*linearity*), της ορθότητας και της πιστότητας υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (*accuracy & precision under repeatability & reproducibility conditions*), της εκλεκτικότητας (*selectivity*), το φαινόμενο επιμόλυνσης/μόλυνσης εκ μεταφοράς (*carry-over*), της ευαισθησίας (*sensitivity*), τα όρια ποσοτικοποίησης (κατώτερο & ανώτερο, *LLOQ & ULOQ*) και ανίχνευσης (*LOD*) και το φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος - μήτρας (*Matrix Effect, ME*). Οι παράμετροι προσδιορίστηκαν για τους 72 α.σ. και στα δύο υποστρώματα.

4.6.1 Γραμμικότητα καμπυλών βαθμονόμησης

Για τον έλεγχο γραμμικότητας της μεθόδου προσδιορίστηκαν οι εξισώσεις γραμμικής παλινδρόμησης, ως συναρτήσεις της μορφής $y = bx + a$. Η εξίσωση περιγράφει τη σχέση

μεταξύ της συγκέντρωσης του αναλύτη στόχου (x) στο εκάστοτε διάλυμα και του λόγου των εμβαδών των κορυφών του αναλύτη στόχου προς του χρησιμοποιούμενου εσωτερικού προτύπου. Τα εμβαδά αυτά αντιστοιχούν στην απόκριση του ανιχνευτή και τελικά στο σήμα που καταγράφεται στο χρωματογράφημα.

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα με μείγμα των 72 α.σ. σε διάφορες συγκεντρώσεις και πραγματοποιήθηκαν πέντε (5) μετρήσεις. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε ένα λευκό δείγμα, ένα μηδενικό δείγμα (λευκό δείγμα με εσωτερικά πρότυπα) και διαλύματα βαθμονόμησης (εμβολιασμένα - φορτισμένα λευκά δείγματα) σε έξι (6) επίπεδα συγκεντρώσεων: 1,25ppb, 5ppb, 50ppb, 100ppb, 375ppb και 500ppb. Επιπλέον υπολογίστηκαν οι τυπικές αποκλίσεις της τομής a με τον άξονα των τετμημένων και της κλίσης b της ευθείας, S_a και S_b αντίστοιχα, καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης r^2 . Για κάθε αναλύτη στόχο κατασκευάστηκαν δύο (2) καμπύλες βαθμονόμησης, μία για κάθε ένα από τα δύο υποστρώματα (ορό αίματος και ούρα).

4.6.2 Ορθότητα και πιστότητα μεθόδου

Η ορθότητα και η πιστότητα της μεθόδου προσδιορίστηκαν και για τα 72 μελετούμενα μόρια αναλύοντας εμβολιασμένα δείγματα ορού αίματος και ούρων σε τέσσερα (4) επίπεδα συγκεντρώσεων, 1,25ppb (LLOQ), 5ppb ($\sim 3 \times \text{LLOQ}$), 50ppb ($\sim 30 \times \text{LLOQ}$) και 375ppb (75% ULOQ), τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας, όσο και υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

Σε ό,τι αφορά την ορθότητα, δεδομένου ότι για τα υποστρώματα εργασίας (ορός αίματος και ούρα) δεν υπήρχαν διαθέσιμα πιστοποιημένα υλικά αναφοράς, αυτή εκτιμήθηκε με τον υπολογισμό της απόλυτη ανάκτηση (βλ. εξίσωση 6), συμπεριλαμβανομένης και της επί τοις εκατό σχετικής τυπική της απόκλιση, %RSD (βλ. εξίσωση 3). Ωστόσο υπολογίστηκαν και τα αντίστοιχα συστηματικά σφάλματα βάσει της εξίσωσης 2.

Ως εκτιμήτριες της πιστότητας χρησιμοποιήθηκαν η τυπική απόκλιση (*Standard Deviation*, *SD*) με μονάδες ίδιες με αυτές του μεγέθους του οποίου προσδιορίζεται η διασπορά, ήτοι *ppb* και η εκατοστιαία σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) που είναι αδιάστατο μέγεθος (βλ. εξίσωση 3).

Η επαναληψιμότητα υπολογίστηκε από πέντε (5) μετρήσεις συγκεντρώσεων από δείγματα που υπέστησαν προκατεργασία την ίδια εργαστηριακή ημέρα και αναλύθηκαν στον ίδιο αναλυτικό γύρο, ενώ η αναπαραγωγιμότητα από έξι (6) μετρήσεις τριών διαφορετικών ημερών.

Οι εκτιμήτριες της ορθότητας και τη πιστότητας υπολογίστηκαν για τα τέσσερα μελετούμενα επίπεδα και παρουσιάζονται στους πίνακες 5.3 και 5.4.

4.6.3 Εκλεκτικότητα μεθόδου

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου εξετάστηκε σύμφωνα με τα αναγραφόμενα στο σχέδιο της οδηγίας του ICH [58], τόσο για τους 72 αναλύτες στόχους, όσο και για τα εσωτερικά

πρότυπα (βλ. §2.8.10). Χρησιμοποιήθηκαν έξι (6) λευκά δείγματα ορού αίματος και ούρων. Εκτιμήθηκε στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*), 1,25ppb, εξετάζοντας τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα (απόκριση του ανιχνευτή) στους χρόνους έκλουσης των μορίων.

4.6.4 Φαινόμενο επιμόλυνσης - μόλυνσης εκ μεταφοράς

Το φαινόμενο εκτιμήθηκε με ανάλυση τεσσάρων (4) διαφορετικών λευκών δειγμάτων (για κάθε υπόστρωμα), τα οποία εγχύθηκαν στο αναλυτικό όργανο μετά την έγχυση διαλύματος βαθμονόμησης στο υψηλότερο όριο ποσοτικοποίησης (*ULOQ*), ήτοι στα 500ppb. Η εκτίμηση έγινε σε τρεις (3) αναλυτικούς γύρους διαφορετικών ημερών. Για την αξιολόγηση των ευρημάτων χρησιμοποιήθηκε το σχέδιο της οδηγίας του *ICH*. [58]

4.6.5 Ευαισθησία μεθόδου

Η ευαισθησία της μεθόδου αποτυπώθηκε ως επί το πλείστον από το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης της μεθόδου (*LLOQ*) για κάθε αναλύτη που μελετήθηκε. Ένας από τους πιο ακριβείς τρόπους προσδιορισμού του *LLOQ*, είναι η φόρτιση της εκάστοτε μήτρας με την ελάχιστη εκείνη ποσότητα, η οποία ανακτάται ποσοτικά, επιδεικνύοντας αποδεκτή ορθότητα και πιστότητα (βλ. §4.6.6.1).

4.6.6 Όρια

4.6.6.1 Κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο εκτιμήθηκε με βάση την ορθότητα και την πιστότητα του χαμηλότερου διαλύματος βαθμονόμησης. Επιπλέον εκτιμήθηκε η απαίτηση (*EMA & FDA*) το σήμα (η απόκριση) του ανιχνευτή να είναι τουλάχιστον πέντε (5) φορές μεγαλύτερο από το σήμα του λευκού δείγματος στους ίδιους χρόνους έκλουσης (βλ. §2.8.14.1).

4.6.6.2 Ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης

Το όριο εκτιμήθηκε βάσει της ορθότητας και τη πιστότητας του ανώτερου διαλύματος βαθμονόμησης (βλ. §2.8.14.2).

4.6.6.3 Όριο ανίχνευσης

Για την εκτίμηση του ορίου ανίχνευσης (*LOD*) ακολουθήθηκε το πρότυπο του *ANSI/ASB* [63] και χρησιμοποιήθηκε η επιλογή του λόγου σήματος προς θόρυβο. Πραγματοποιήθηκε φόρτιση τεσσάρων (4) διακριτών λευκών δειγμάτων ορού αίματος και ούρων με διάλυμα των 72 αναλυτών στόχων σε συγκεντρώσεις 0,5ppb, 0,3ppb, 0,2ppb και 0,1ppb. Η ανάλυση

πραγματοποιήθηκε εις διπλούν σε τρεις αναλυτικούς γύρους διαφορετικών ημερών και η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε βάσει της ανίσωσης 7.

4.6.7 Καταστολή/ενίσχυση ιοντισμού

Το φαινόμενο καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού ή φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος - μήτρας (*Matrix Effect, ME*) προσδιορίστηκε κατά την ανάλυση αποτελεσμάτων για τα επίπεδα συγκεντρώσεων 1,25ppb, 5ppb και 500ppb (*LLOQ, 3xLLOQ, ULOQ*). Για την εκτίμηση του φαινομένου χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις και τα κριτήρια που περιγράφονται στο πρότυπο του *ANSI/ASB* ([63]) (βλ. §2.8.15.2). Ο προσδιορισμός έγινε με τη χρήση 6 (έξι) δειγμάτων/πηγών ανά εφαρμοζόμενο υπόστρωμα, ήτοι ορό αίματος και ούρα. Η ένταση του φαινομένου εκφράστηκε με εφαρμογή των εξισώσεων 9 και 10 σε ποσοστό επί τοις εκατό ($\overline{ME}\%$) και τα σχετικά αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 5.5 και 5.6.

Κεφάλαιο 5 Αποτελέσματα & συζήτηση

Η αξιολόγηση των μετρήσεων έγινε εν συνόλω βάσει των οδηγιών που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2 και ειδικότερα κατά περίπτωση.

5.1 Αξιολόγηση της γραμμικότητας των καμπυλών βαθμονόμησης

Η αξιολόγηση έγινε βάσει των κριτηρίων του σχεδίου της οδηγίας του ICH [58]. Συγκεκριμένα, οι αναδρομικά υπολογισμένες συγκεντρώσεις ικανοποιούσαν τα κριτήρια απόκλισης από την εκάστοτε ονομαστική τιμή $\pm 20\%$ για το LLOQ και $\pm 15\%$ για τα άλλα επίπεδα (βλ. §2.8.2.3). Επομένως γραμμικό εύρος της μεθόδου για όλους τους αναλύτες ορίζεται το διάστημα 1,25ppb έως 500ppb, με τα άκρα αυτά να αποτελούν το κατώτερο και ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (LLOQ και ULOQ) αντίστοιχα (βλ. §5.6). Για κάθε αναλύτη στόχο κατασκευάστηκαν δύο (2) καμπύλες βαθμονόμησης, μία για κάθε ένα από τα δύο υποστρώματα (ορό αίματος και ούρα). Παρόλα αυτά τα πειραματικά δεδομένα έδειξαν ομοειδή συμπεριφορά και δύναται να χρησιμοποιηθεί μόνο η μία (ανεξαρτήτου υποστρώματος). Στον πίνακα 5.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα τις γραμμικής παλινδρόμησης για κάθε αναλύτη στόχο σε υπόστρωμα ορού αίματος.

5.2 Αξιολόγηση της ορθότητας και της ποιότητας της μεθόδου

Στον πίνακα 5.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της επίδοσης των παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν στην επικύρωση της μεθόδου. Για την αξιολόγησή τους χρησιμοποιήθηκαν οι οδηγίες που περιγράφονται στο Κεφάλαιο 2, καθώς και η Οδηγία SANTE/12682/2019 ([163]).

Η ορθότητα εκφρασμένη σαν συστηματικό σφάλμα (*bias*) είναι αποδεκτή εφόσον κυμαίνεται σε εύρος $\pm 15\%$ ή $\pm 20\%$ της αντίστοιχης ονομαστικής συγκέντρωσης, ανάλογα με την Οδηγία και το επίπεδο συγκέντρωσης του αναλύτη (βλ. §2.8.8).

Στα αποτελέσματα που έχουν εξαχθεί παρουσιάζονται τιμές που βρίσκονται εκτός του αναφερόμενου εύρους. Ωστόσο, η Οδηγία SANTE/12682/2019 ([163]), σε περιπτώσεις δραστικών ουσιών, των οποίων η ανάκτηση κυμαίνεται συστηματικά από 60% - 80% επιτρέπει την ασφαλή εξαγωγή αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων. Αν και η εν λόγω οδηγία αφορά στην ανάλυση υπολειμμάτων γεωργικών φαρμάκων κατά τις διαδικασίες επικύρωσης και ποιοτικού ελέγχου τροφίμων και ζωοτροφών, ειδικά στην περίπτωση της παρούσας διατριβής η παρεκβολή κρίθηκε αναγκαία, προκειμένου να αξιοποιηθεί η επιπλέον αυτή ανοχή, λαμβάνοντας υπόψη ότι πληθώρα δραστικών ουσιών ετερόκλιτων χημικών οικογενειών ενσωματώθηκαν και επικυρώθηκαν στην αναλυτική μέθοδο.

Η ορθότητα προσδιορίστηκε σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων 1,25ppb, 5ppb, 50ppb και 375ppb. Υπό συνθήκες εργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (1,25ppb), στον ορό αίματος οι τιμές κυμάνθηκαν από 63,29% (*Fenthion*)

έως 109,14% (*Fenamiphos*), όπου για 48 μόρια η τιμή της βρισκόταν εντός εύρους $\pm 20\%$ της ονομαστικής τιμής και για τα υπόλοιπα 24 στο 60-80% αυτής. Αναλυτικότερα, οι οργανοφωσφορικές ενώσεις παρουσίασαν απόλυτες ανακτήσεις στο εύρος τιμών 63,29% (*Fenthion*) έως 109,14% (*Fenamiphos*), που αποτελούν και τις ακραίες τιμές του συνόλου των 72 α.σ.. 6 από τα 17 μόρια είχαν ανακτήσεις από 63,29% (*Fenthion*) έως 77,92% (*Ethion*), ενώ τα υπόλοιπα 11 από 81,04% (*Omethoate*) έως 109,14% (*Fenamiphos*). Οι μεταβολίτες του *Fenthion*, *Fenthion sulfone* και *Fenthion sulfoxide* εμφάνισαν μικρές διαφορές στις τιμές απόλυτης ανάκτησης μόνο στο επίπεδο αυτό. Αντίστοιχα, ο μεταβολίτης του *Fenamiphos*, *Fenamiphos sulfone* και του *Dimethoate*, *Omethoate*, είχαν χαμηλότερη απόλυτη ανάκτηση 84,15% και 81,04%, σε σχέση με τα μητρικά τους μόρια. Από τις 6 καρβαμιδικές ενώσεις το *Aldicarb* και το *Aldicarb sulfone* είχαν απόλυτες ανακτήσεις 65,42% και 66,20% αντίστοιχα, ενώ ο μη ταξινομημένος μεταβολίτης του *Aldicarb*, *Aldicarb sulfoxide* είχε παραπλήσια τιμή 68,24%. Οι υπόλοιπες 4 από 86,50% (*Carbofuran*) έως 101,41% (*Pirimicarb*). Για τα 5 νεονικοτινοειδή, το εύρος ανακτήσεων ήταν μεταξύ 64,73% (*Clothianidin*) έως 98,41% (*Acetamiprid*). Το μητρικό μόριο του *Clothianidin*, *Thiamethoxam* εμφάνισε σε όλα τα επίπεδα παρόμοιες ανακτήσεις με τον μεταβολίτη του. Οι απόλυτες ανακτήσεις για τις 8 ουρίες κυμάνθηκαν από 70,38% (*Chlorobromuron*) έως 101,16% (*Linuron*). Στα άλλα τρία επίπεδα οι ανακτήσεις ήταν υψηλότερες.

Στα ούρα, το εύρος ανακτήσεων κυμάνθηκε από 61,91% (*Aldicarb sulfone*) έως 97,88% (*Demeton-S-methyl sulfoxide*) στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης, ενώ για τα άλλα τρία επίπεδα το εύρος μετατοπίστηκε στην περιοχή 88,12% - 103,62%.

Η πιστότητα για τις περισσότερες οδηγίες εκφρασμένη ως *RSD%* ή *CV%* δεν πρέπει να υπερβαίνει το 20% στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης και το 15% - 20% σε όλα τα υπόλοιπα, ανάλογα με την οδηγία (βλ. 2.8.8). Στον ορό αίματος, η επαναληψιμότητας (πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας) στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης κυμάνθηκε από 0,80% (*Linuron*) έως 18,37% (*Thifensulfuron-methyl*) και στα υπόλοιπα επίπεδα από 1,34% (*Omethoate*) έως 14,33% (*Fluometuron*), ενώ στα ούρα από 3,04% (*Carbendazim*) έως 17,46% (*Fenthion sulfoxide*) και από 2,06% (*Aldicarb sulfone*) έως 9,04% (*Aldicarb sulfoxide*).

Η αναπαραγωγιμότητα (πιστότητα υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας) κυμάνθηκε σε ελαφρώς υψηλότερα επίπεδα, όπως αναμενόταν: Στον ορό αίματος από 2,04% (*Clethodim*) έως 18,90% (*Dicrotophos*) για το κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης και για τα υπόλοιπα επίπεδα από 2,12% (*Carbendazim*) έως 15,18% (*EPN*). Στα ούρα οι αντίστοιχες τιμές ήταν 4,97% (*Demeton-S-methyl sulfoxide*) - 19,16% (*Fenthion sulfoxide*) και 3,14% (*Carbendazim*) - 11,10% (*Aldicarb sulfoxide*).

Συμπερασματικά, δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις, τόσο στην πιστότητα, όσο και στην ακρίβεια μεταξύ των διαφορετικών ομάδων που αναλύθηκαν παραπάνω.

5.3 Αξιολόγηση της εκλεκτικότητας

Από την εικόνα των χρωματογραφημάτων των λευκών δειγμάτων, προέκυψε ότι η απόκριση σε σχέση με εκείνη των φορτισμένων δειγμάτων στο *LLOQ*, τόσο για τον ορό αίματος, όσο και για τα ούρα ήταν κατά το μέγιστο 6% του *LLOQ* για τους αναλύτες στόχους και 1% του *LLOQ* για τα εσωτερικά πρότυπα, σημαντικά χαμηλότερη των ορίων αποδοχής (20% για όλους τους αναλύτες στόχους και 5% για τα εσωτερικά πρότυπα).

5.4 Αξιολόγηση του φαινομένου μόλυνσης εκ μεταφοράς

Από την εικόνα των χρωματογραφημάτων των λευκών δειγμάτων, τα οποία εγχύθηκαν αμέσως μετά από διαλύματα βαθμονόμησης στο *ULOQ*, διαπιστώθηκε ότι η απόκριση του οργάνου, τόσο για τον ορό αίματος, όσο και για τα ούρα δεν ξεπέρασε το 4% του *LLOQ* για τους αναλύτες στόχους και το 1% του *LLOQ* για τα εσωτερικά πρότυπα, σημαντικά χαμηλότερη των ορίων αποδοχής (20% για όλους τους αναλύτες στόχους και 5% για τα εσωτερικά πρότυπα) βάσει του σχεδίου της οδηγίας του *ICH* ([58]).

5.5 Αξιολόγηση της ευαισθησίας

Στη συγκεκριμένη μελέτη ως όριο ποσοτικοποίησης των 72 αναλυτών στόχων προσδιορίστηκε το 1,25ppb (βλ. και §5.2). Το συγκεκριμένο όριο κρίνεται ικανοποιητικό λαμβάνοντας υπόψη την καθεαυτό συγκέντρωση αλλά και την πολυπλοκότητα των βιολογικών υποστρωμάτων-υγρών.

5.6 Αξιολόγηση - προσδιορισμός ορίων

5.6.1 Αξιολόγηση του κατώτερου ορίου ποσοτικοποίησης

Ως κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης ορίστηκε το 1,25ppb για τους 72 αναλύτες και στα δύο εξεταζόμενα υποστρώματα. Ο ορισμός του βασίστηκε στην αξιολόγηση της ορθότητας και της πιστότητας του χαμηλότερου διαλύματος βαθμονόμησης. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 5.3 και 5.4. Η απαίτηση των οδηγιών της *EMA* και του *FDA*, αναφορικά με το πενταπλάσιο σήμα στα φορτισμένα διαλύματα σε *LLOQ* έναντι λευκών δειγμάτων (βλ. §2.8.14.1) ικανοποιείται για όλους τους αναλύτες και στα δύο υποστρώματα.

5.6.2 Αξιολόγηση του ανώτερου ορίου ποσοτικοποίησης

Ως ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης ορίστηκαν τα 500ppb για τους 72 αναλύτες και στα δύο εξεταζόμενα υποστρώματα. Ο ορισμός του βασίστηκε στην αξιολόγηση της ορθότητας και

της ποιότητας του υψηλότερου διαλύματος βαθμονόμησης. Τα αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες 5.3 και 5.4.

5.6.3 Αξιολόγηση του ορίου ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης εκτιμήθηκε για όλους τους αναλύτες στόχους και στα δύο υποστρώματα βάσει της ανίσωσης 7, προσδιορίζοντας την ένταση της χρωματογραφικής κορυφής του κάθε αναλύτη και του θορύβου γύρω από αυτή από τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα. Το εύρος τιμών *LOD* κυμάνθηκε από 0,2ppb έως 0,5ppb.

5.7 Αξιολόγηση της καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού

Το φαινόμενο εκτιμήθηκε σε τρία επίπεδα, στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*) 1,25ppb, στα 5ppb ($3xLLOQ$) και στο ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*ULOQ*) 500ppb. Στη συντριπτική πλειονότητα των μορίων παρατηρήθηκε καταστολή και μόνο σε λίγες περιπτώσεις ενίσχυση ιοντισμού για μέρος ή το σύνολο των επιπέδων συγκέντρωσης. Στον ορό αίματος ενίσχυση ιοντισμού εμφάνισαν τα μόρια *Ametryn*, *Buprofezin*, *Clothianidin* και *Fenamiphos* και στα ούρα τα *Fenamiphos sulfone* και *Fenthion sulfone*.

Στο *LLOQ* (1,25ppb) στον ορό αίματος το φαινόμενο εκτάθηκε από -24,29% (*Chloridazon*) έως 8,91% (*Oxadixyl*) και στα ούρα από -19,43% (*Fenthion sulfoxide*) έως 10,29% (*Clothianidin*). Στο επίπεδο 5ppb το φαινόμενο ήταν παρόμοιο, ενώ στο *ULOQ* (500ppb) το φαινόμενο αμβλύθηκε αισθητά. Συνολικά, οι σχετικές τοπικές αποκλίσεις δεν ξεπέρασαν το 18,03% (*Imazalil*) στον ορό αίματος και το 14,23% (*Paraoxon-methyl*) στα ούρα. Τα μόρια στα δύο υποστρώματα εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά, ενώ τα μόρια *Carbendazim*, *Chlorpyrifos-ethyl* και *Imidacloprid* είχαν παρόμοια συμπεριφορά με τα ισοτοπικά επισημασμένα ανάλογά τους *Carbendazim D3*, *Chlorpyrifos D10* και *Imidacloprid D4*.

5.8 Πίνακες και διαγράμματα αποτελεσμάτων

Στην παράγραφο αυτή παρατίθεται ο πίνακας αποτελεσμάτων (πίνακας 5.2), με τις απόλυτες ανακτήσεις όλων των ουσιών για όλα τα υπό δοκιμή πρωτόκολλα, όπως προέκυψαν κατά το στάδιο ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου, καθώς και πίνακες αποτελεσμάτων γραμμικής παλινδρόμησης (πίνακας 5.1), εκτίμησης της ορθότητας και της ποιότητας (πίνακες 5.3 & 5.4) και του φαινομένου επίδρασης μήτρας (πίνακες 5.5 & 5.6), όπως παρήχθησαν κατά το στάδιο της επικύρωσης και για τα δύο εξεταζόμενα υποστρώματα. Επιπλέον παρατίθενται αντίστοιχα διαγράμματα (ραβδογράμματα).

Πίνακας 5.1 Αποτελέσματα γραμμικής παλινδρόμησης (συντελεστής συσχέτισης r^2 , κλίση καμπύλης βαθμονόμησης – τοπική απόκλιση $b \pm S_b$, τομή με τον άξονα των τετμημένων $a \pm S_a$) για τους 72 α.σ. σε υπόστρωμα ορού αίματος.

Α/Α	Όνομασία μορίου	$y = bx + a$		
		Συντελεστής συσχέτισης r^2	Κλίση καμπύλης βαθμονόμησης $b \pm S_b$	Τομή με τον άξονα των τετμημένων $a \pm S_a$
1	Acetamiprid	0,9987	26317 ± 304	-28028 ± 52051
2	Alachlor	0,9952	20319 ± 962	-44095 ± 45685
3	Aldicarb	0,9910	626 ± 24	2659 ± 1417
4	Aldicarb sulfone	0,9920	14420 ± 614	-347740 ± 177895
5	Aldicarb sulfoxide	0,9941	3379 ± 118	-3368 ± 6862
6	Ametryn	0,9978	14879 ± 172	-59490 ± 31271
7	Azoxystrobin	0,9992	64476 ± 374	-60893 ± 93908
8	Benalaxyl	0,9996	107342 ± 472	-262985 ± 118544
9	Benfuracarb	0,9963	10161 ± 130	16826 ± 15682
10	Boscalid	0,9957	328 ± 9	6895 ± 2847
11	Buprofezin	0,9951	3455 ± 134	75453 ± 38931
12	Caduzafos	0,9997	49406 ± 160	-34514 ± 40273
13	Carbendazim	0,9946	8492 ± 310	185962 ± 89737
14	Carbofuran	0,9981	8025 ± 141	66004 ± 40973
15	Chloridazon	0,9970	11211 ± 270	-157709 ± 78293
16	Chlorobromuron	0,9966	65521 ± 1716	-1002237 ± 460303
17	Chlorpyrifos-ethyl	0,9985	2723 ± 67	6691 ± 3494
18	Clethodim	0,9960	8140 ± 287	7828 ± 14923
19	Clofentezine	0,9986	17768 ± 342	122687 ± 91782
20	Clothianidin	0,9905	69603 ± 1010	-470678 ± 271117
21	Coumaphos	0,9994	64730 ± 1210	624534 ± 490335
22	Cyproconazole	0,9984	4190 ± 25	3924 ± 1301
23	Demeton-S-methyl sulfoxide	0,9973	4347 ± 112	7306 ± 5830
24	Desmetryn	0,9990	194463 ± 2064	-73612 ± 90750
25	Diazinon	0,9995	45031 ± 180	-60714 ± 45329

Α/Α	Ονομασία μορίου	$y = bx + a$		
		Συντελεστής συσχέτισης r^2	Κλίση καμπύλης βαθμονόμησης $b \pm S_b$	Τομή με τον άξονα των τετμημένων $a \pm S_a$
26	<i>Dicrotophos</i>	0,9967	15468 ± 558	-386396 ± 177345
27	<i>Difenoconazole</i>	0,9971	21774 ± 236	-127758 ± 59315
28	<i>Dimethoate</i>	0,9989	20954 ± 211	-117899 ± 62310
29	<i>Dimethomorph</i>	0,9951	15120 ± 756	31592 ± 39334
30	<i>Diuron</i>	0,9936	18802 ± 1110	-68122 ± 64488
31	<i>EPN</i>	0,9955	4361 ± 157	-10387 ± 8208
32	<i>Ethion</i>	0,9996	16740 ± 63	-55495 ± 18487
33	<i>Ethoprophos</i>	0,9983	49185 ± 639	-47047 ± 30364
34	<i>Fenamidone</i>	0,9952	13736 ± 599	-24178 ± 31155
35	<i>Fenamiphos</i>	0,9988	11855 ± 163	95772 ± 47345
36	<i>Fenamiphos sulfone</i>	0,9982	31679 ± 764	-426294 ± 221599
37	<i>Fenbuconazole</i>	0,9926	28144 ± 1139	-593522 ± 305528
38	<i>Fenthion</i>	0,9980	3040 ± 38	-12218 ± 12128
39	<i>Fenthion sulfone</i>	0,9986	5176 ± 122	8565 ± 7089
40	<i>Fenthion sulfoxide</i>	0,9993	3876 ± 31	-6160 ± 9148
41	<i>Fluometuron</i>	0,9975	18524 ± 559	-16876 ± 29066
42	<i>Flusilazole</i>	0,9954	114488 ± 302	114099 ± 75947
43	<i>Flutolanil</i>	0,9938	47936 ± 908	-517362 ± 243552
44	<i>Imazalil</i>	0,9994	691 ± 5	5430 ± 1743
45	<i>Imidacloprid</i>	0,9984	6566 ± 150	-3284 ± 7811
46	<i>Linuron</i>	0,9955	6318 ± 256	1761 ± 13441
47	<i>Mepanipyrim</i>	0,9914	18435 ± 995	542104 ± 288295
48	<i>Methabenzthiazuron</i>	0,9973	14231 ± 333	-18079 ± 17339
49	<i>Metalaxyl-M</i>	0,9930	30765 ± 1323	-64074 ± 62813
50	<i>Metobromuron</i>	0,9946	4032 ± 192	25226 ± 11186
51	<i>Monocrotophos</i>	0,9982	7464 ± 97	-30255 ± 30826
52	<i>Omethoate</i>	0,9921	16334 ± 952	-50400 ± 49519

Α/Α	Ονομασία μορίου	$y = bx + a$		
		Συντελεστής συσχέτισης r^2	Κλίση καμπύλης βαθμονόμησης $b \pm S_b$	Τομή με τον άξονα των τετμημένων $a \pm S_a$
53	<i>Oxadixyl</i>	0,9965	12436 ± 215	113979 ± 62352
54	<i>Paraoxon-methyl</i>	0,9971	6453 ± 130	50112 ± 37946
55	<i>Penconazole</i>	0,9925	7575 ± 300	184886 ± 80618
56	<i>Pencycuron</i>	0,9998	85613 ± 190	-17267 ± 51073
57	<i>Phosphamidon</i>	0,9907	2388 ± 168	7,5 ± 9765
58	<i>Pirimicarb</i>	0,9953	38661 ± 954	352052 ± 256080
59	<i>Prometryn</i>	0,9941	27403 ± 1009	466833 ± 270758
60	<i>Pyraclostrobin</i>	0,9978	29672 ± 526	-304728 ± 144404
61	<i>Pyrifenox</i>	0,9975	18524 ± 559	-16876 ± 29066
62	<i>Pyrimethanil</i>	0,9983	4167 ± 104	8467 ± 5431
63	<i>Tebuconazole</i>	0,9992	14476 ± 71	-37676 ± 20724
64	<i>Tebufenozide</i>	0,9987	123022 ± 578	-413471 ± 155138
65	<i>Terbufos sulfoxide</i>	0,9983	14295 ± 426	-286996 ± 135166
66	<i>Tetraconazole</i>	0,9935	4568 ± 195	104850 ± 62001
67	<i>Thiacloprid</i>	0,9990	37033 ± 408	46337 ± 102386
68	<i>Thiamethoxam</i>	0,9951	12271 ± 578	34297 ± 30095
69	<i>Thifensulfuron-methyl</i>	0,9994	12802 ± 94	33392 ± 27268
70	<i>Triazophos</i>	0,9997	444322 ± 287	-62317 ± 72199
71	<i>Tricyclazole</i>	0,9949	16189 ± 613	8278 ± 31894
72	<i>Trifloxystrobin</i>	0,9983	102776 ± 4019	-2082392 ± 1077992

Πίνακας 5.2: Οι ανακτήσεις των 72 α.σ. σε δύο (2) επίπεδα συγκεντρώσεων μετά την εφαρμογή των πρωτοκόλλων προκατεργασίας και ενόργανης ανάλυσης σε υπόστρωμα ορού αίματος.

Α/Α	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Μέση ανάκτηση, Rec (%) ± (RSD ³⁰ %, n = 5)							
			ΠΠΔ ³¹ I - MeOH / ΠΕΑ ³² I		ΠΠΔ II - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - ACN / ΠΕΑ I		ΠΠΔ III - MeOH / ΠΕΑ II	
			5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb
1	<i>Acetamiprid</i>	νεονικοτινοειδές	98 ± 4	100 ± 3	78 ± 1	82 ± 4	77 ± 9	68 ± 3	110 ± 6	105 ± 1
2	<i>Alachlor</i>	οργανοχλωρίνη / χλωροακετανιλίδιο	101 ± 4	102 ± 4	110 ± 8	91 ± 2	126 ± 4	66 ± 3	75 ± 10	91 ± 3
3	<i>Aldicarb</i>	καρβαμιδικό	85 ± 14	85 ± 7	74 ± 13	89 ± 7	104 ± 12	65 ± 2	96 ± 4	79 ± 5
4	<i>Aldicarb sulfone</i>	καρβαμιδικό	96 ± 2	98 ± 2	77 ± 8	53 ± 4	77 ± 10	38 ± 4	87 ± 5	91 ± 1
5	<i>Aldicarb sulfoxide</i>	μη ταξινομημένο	95 ± 9	95 ± 5	36 ± 2	20 ± 4	32 ± 9	16 ± 5	34 ± 8	27 ± 6
6	<i>Ametryn</i>	τριαζίνη (μεθυλθιο-1,3,5-τριαζίνη)	113 ± 2	99 ± 5	85 ± 9	76 ± 5	108 ± 7	62 ± 4	55 ± 10	91 ± 5
7	<i>Azoxystrobin</i>	στρομπιλουρίνη	110 ± 4	97 ± 3	86 ± 4	86 ± 7	106 ± 3	69 ± 2	137 ± 4	100 ± 12
8	<i>Benalaxyl</i>	ακυλαμινοξύ (φαινυλαμίδιο - ακυλαλανίνη)	108 ± 4	100 ± 1	132 ± 1	135 ± 4	146 ± 1	101 ± 3	139 ± 3	109 ± 17
9	<i>Benfuracarb</i>	καρβαμιδικό	80 ± 5	91 ± 6	145 ± 4	158 ± 7	162 ± 8	121 ± 11	151 ± 5	167 ± 9
10	<i>Boscalid</i>	πυριδινό-καρβοξαμίδιο	64 ± 7	72 ± 7	105 ± 30	95 ± 10	118 ± 4	70 ± 9	99 ± 5	66 ± 12
11	<i>Buprofezin</i>	μη ταξινομημένο	74 ± 14	96 ± 4	38 ± 13	44 ± 8	41 ± 4	25 ± 3	88 ± 2	44 ± 20
12	<i>Caduzafos</i>	οργανοφωσφορικό	86 ± 11	92 ± 2	111 ± 10	124 ± 16	137 ± 3	146 ± 9	136 ± 16	49 ± 44
13	<i>Carbendazim</i>	καρβαμιδικό με βενζιμιδαζολική ομάδα	97 ± 2	97 ± 2	105 ± 2	100 ± 2	116 ± 1	80 ± 2	107 ± 3	96 ± 3
14	<i>Carbofuran</i>	καρβαμιδικό	89 ± 5	91 ± 6	106 ± 6	120 ± 2	106 ± 2	70 ± 6	135 ± 3	110 ± 6

30 RSD%: Relative Standard Deviation (Σχετική Τοπική Απόκλιση)

31 ΠΠΔ: Πρωτόκολλο Προκατεργασίας Δειγμάτων

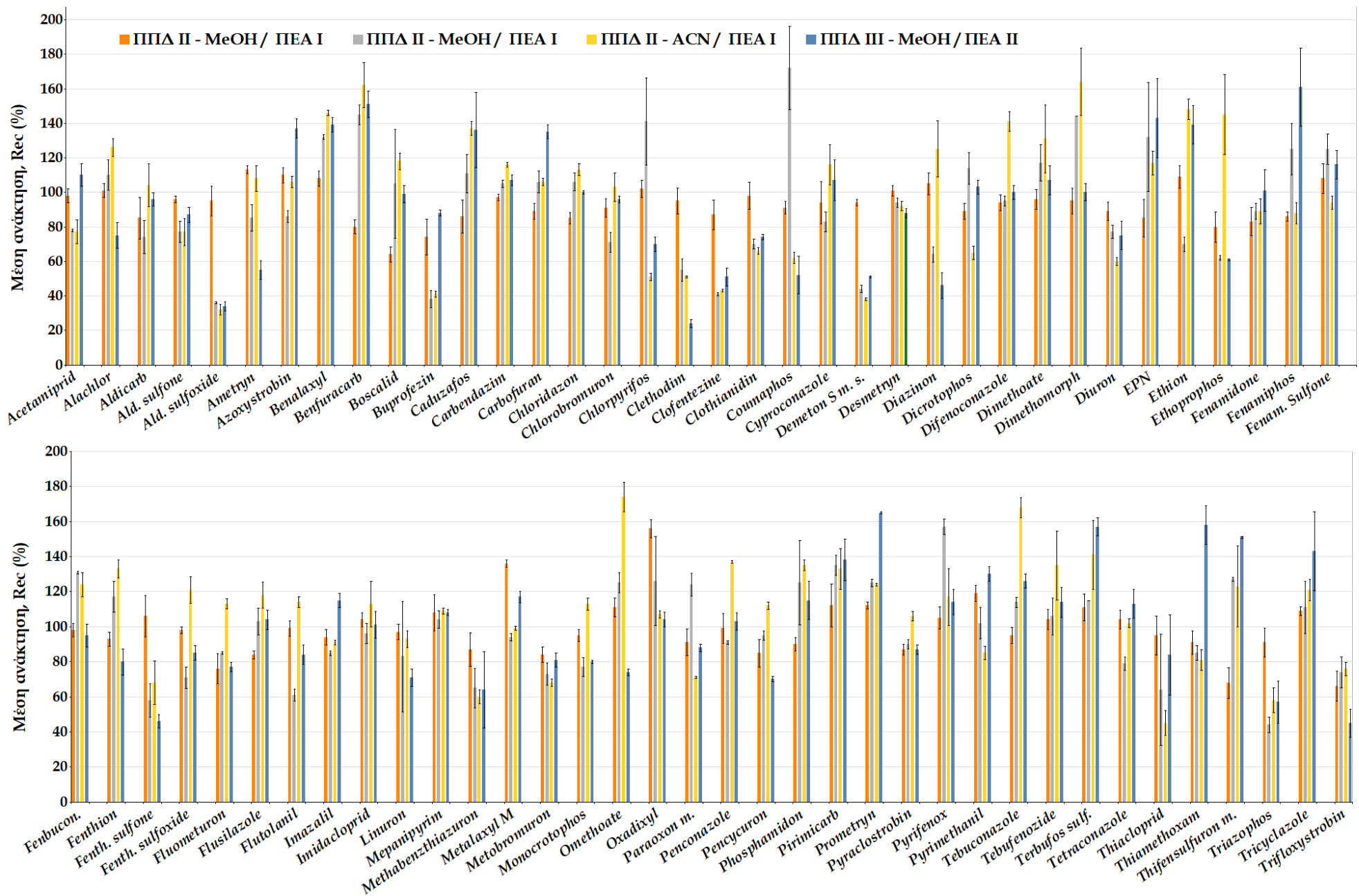
32 ΠΕΑ: Πρωτόκολλο Ενόργανης Ανάλυσης

A/A	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Μέση ανάκτηση, Rec (%) \pm (RSD %, $n = 5$)							
			ΠΠΔ I - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - ACN / ΠΕΑ I		ΠΠΔ III - MeOH / ΠΕΑ II	
			5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb
15	<i>Chloridazon</i>	πυραδοζινόνη	85 \pm 4	90 \pm 3	106 \pm 5	108 \pm 2	113 \pm 3	82 \pm 2	100 \pm 1	100 \pm 6
16	<i>Chlorobromuron</i>	ουρία	91 \pm 6	90 \pm 7	71 \pm 8	81 \pm 5	103 \pm 8	62 \pm 7	96 \pm 2	97 \pm 16
17	<i>Chlorpyrifos-ethyl</i>	οργανοφωσφορικό	102 \pm 5	100 \pm 2	141 \pm 18	104 \pm 7	51 \pm 4	69 \pm 8	70 \pm 6	81 \pm 16
18	<i>Clethodim</i>	κυκλοεξανοδιόνη	95 \pm 8	96 \pm 4	55 \pm 12	58 \pm 10	51 \pm 1	24 \pm 3	24 \pm 9	28 \pm 8
19	<i>Clofentezine</i>	τετραζίνη	87 \pm 10	89 \pm 5	41 \pm 2	47 \pm 3	43 \pm 2	33 \pm 0	51 \pm 10	82 \pm 24
20	<i>Clothianidin</i>	νεονικοτινοειδές	98 \pm 8	98 \pm 4	70 \pm 4	65 \pm 2	66 \pm 3	63 \pm 5	74 \pm 2	54 \pm 1
21	<i>Coumaphos</i>	οργανοφωσφορικό	91 \pm 4	97 \pm 3	172 \pm 14	167 \pm 27	62 \pm 5	87 \pm 7	52 \pm 21	181 \pm 19
22	<i>Cyproconazole</i>	τριαζόλη	94 \pm 13	93 \pm 4	83 \pm 7	85 \pm 5	116 \pm 10	82 \pm 3	107 \pm 11	93 \pm 15
23	<i>Demeton-S-methyl sulfoxide</i>	οργανοφωσφορικό	94 \pm 2	96 \pm 2	44 \pm 5	50 \pm 4	38 \pm 2	37 \pm 4	51 \pm 1	64 \pm 12
24	<i>Desmetryn</i>	τριαζίνη (μεθυλθιο-1,3,5-τριαζίνη)	101 \pm 3	96 \pm 6	94 \pm 3	98 \pm 1	92 \pm 3	64 \pm 3	88 \pm 3	84 \pm 6
25	<i>Diazinon</i>	οργανοφωσφορικό	105 \pm 6	95 \pm 4	64 \pm 7	68 \pm 3	125 \pm 13	105 \pm 4	46 \pm 16	49 \pm 12
26	<i>Dicrotophos</i>	οργανοφωσφορικό	89 \pm 5	92 \pm 11	114 \pm 8	128 \pm 13	65 \pm 6	89 \pm 5	103 \pm 4	120 \pm 13
27	<i>Difenoconazole</i>	τριαζόλη / διοξολάνη	94 \pm 5	87 \pm 8	95 \pm 3	116 \pm 2	141 \pm 4	104 \pm 5	100 \pm 4	103 \pm 12
28	<i>Dimethoate</i>	οργανοφωσφορικό	96 \pm 6	92 \pm 5	117 \pm 9	122 \pm 21	131 \pm 15	135 \pm 8	107 \pm 8	128 \pm 13
29	<i>Dimethomorph</i>	μορφολίνη	95 \pm 8	93 \pm 4	144 \pm 0	143 \pm 7	164 \pm 12	112 \pm 3	100 \pm 5	86 \pm 5
30	<i>Diuron</i>	φανυλουρία	89 \pm 6	91 \pm 7	77 \pm 5	80 \pm 4	60 \pm 4	46 \pm 3	75 \pm 11	65 \pm 17
31	<i>EPN</i>	οργανοφωσφορικό	85 \pm 13	96 \pm 2	132 \pm 24	128 \pm 25	117 \pm 6	107 \pm 4	143 \pm 16	112 \pm 14
32	<i>Ethion</i>	οργανοφωσφορικό	109 \pm 6	98 \pm 3	70 \pm 6	58 \pm 4	148 \pm 4	88 \pm 14	139 \pm 8	148 \pm 8

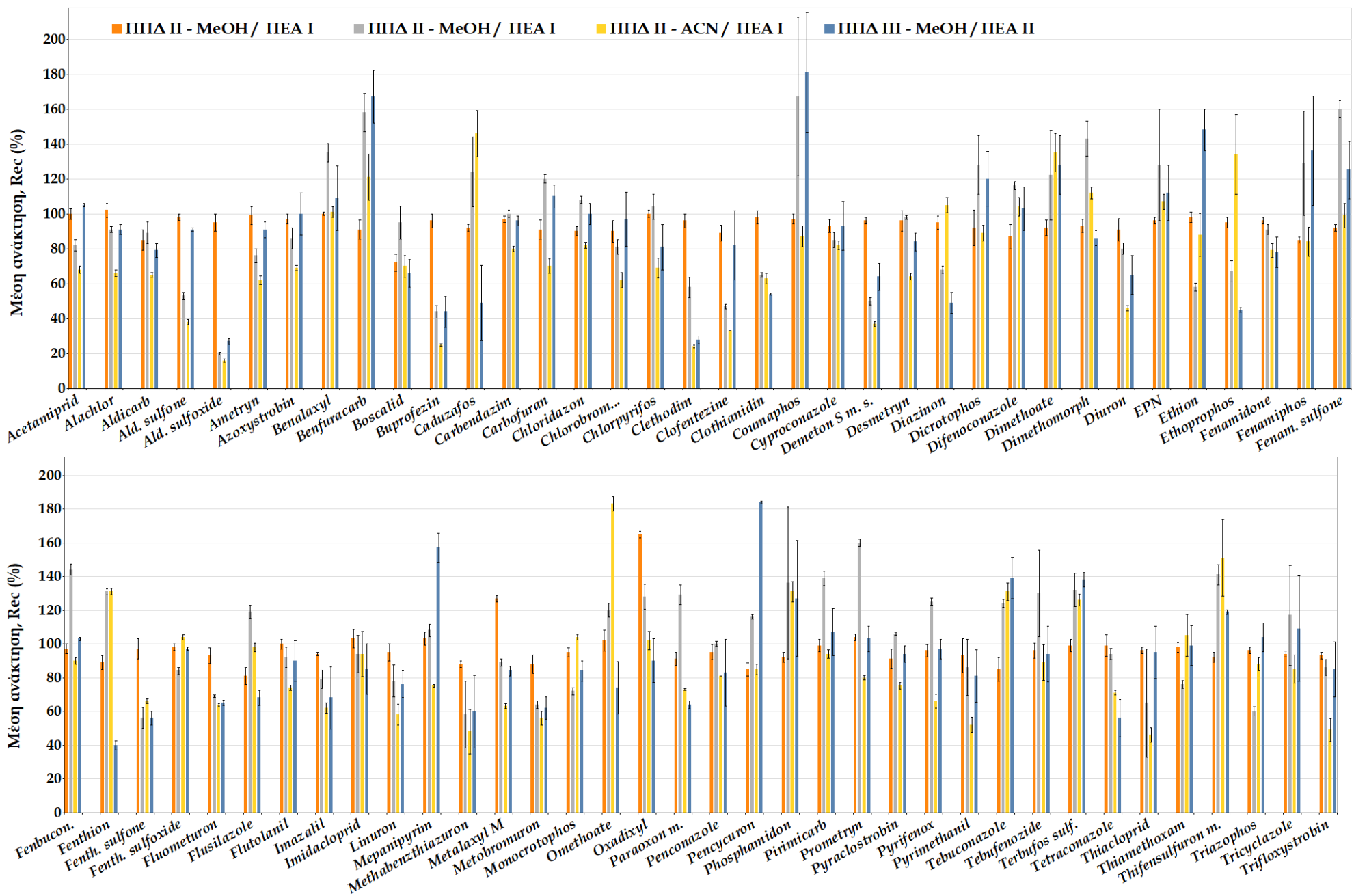
A/A	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Μέση ανάκτηση, Rec (%) \pm (RSD %, $n = 5$)							
			ΠΠΔ I - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - ACN / ΠΕΑ I		ΠΠΔ III - MeOH / ΠΕΑ II	
			5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb
33	<i>Ethoprophos</i>	οργανοφωσφορικό	80 \pm 11	95 \pm 3	62 \pm 2	67 \pm 9	145 \pm 16	134 \pm 17	61 \pm 1	45 \pm 3
34	<i>Fenamidone</i>	ιμιδαζόλη	83 \pm 10	96 \pm 2	89 \pm 5	91 \pm 3	89 \pm 8	79 \pm 5	101 \pm 12	78 \pm 11
35	<i>Fenamiphos</i>	οργανοφωσφορικό	86 \pm 3	85 \pm 2	125 \pm 12	129 \pm 23	88 \pm 7	84 \pm 10	161 \pm 14	136 \pm 23
36	<i>Fenamiphos sulfone</i>	μη ταξινομημένο	108 \pm 8	92 \pm 2	125 \pm 7	160 \pm 3	94 \pm 4	99 \pm 7	116 \pm 7	125 \pm 13
37	<i>Fenbuconazole</i>	τριαζόλη	98 \pm 8	97 \pm 3	131 \pm 11	144 \pm 4	124 \pm 2	90 \pm 4	95 \pm 4	103 \pm 12
38	<i>Fenthion</i>	οργανοφωσφορικό	93 \pm 11	89 \pm 5	117 \pm 15	131 \pm 17	133 \pm 6	131 \pm 11	80 \pm 9	40 \pm 37
39	<i>Fenthion sulfone</i>	μη ταξινομημένο	106 \pm 6	97 \pm 7	58 \pm 4	56 \pm 7	68 \pm 3	66 \pm 8	46 \pm 11	56 \pm 26
40	<i>Fenthion sulfoxide</i>	οργανοφωσφορικό	98 \pm 4	98 \pm 4	71 \pm 2	84 \pm 3	121 \pm 6	104 \pm 5	85 \pm 7	97 \pm 12
41	<i>Fluometuron</i>	φανιλουρία	76 \pm 14	93 \pm 2	85 \pm 19	69 \pm 5	113 \pm 14	64 \pm 7	77 \pm 5	65 \pm 11
42	<i>Flusilazole</i>	τριαζόλη	84 \pm 15	81 \pm 12	103 \pm 7	119 \pm 3	118 \pm 9	98 \pm 4	104 \pm 8	68 \pm 8
43	<i>Flutolanil</i>	βενζαμιδίο	99 \pm 5	100 \pm 2	61 \pm 7	92 \pm 3	114 \pm 1	74 \pm 15	84 \pm 7	90 \pm 4
44	<i>Imazalil</i>	ιμιδαζόλη / διχλωροβενζόλιο	94 \pm 2	94 \pm 3	85 \pm 5	79 \pm 3	91 \pm 1	62 \pm 6	115 \pm 9	68 \pm 8
45	<i>Imidacloprid</i>	νεονικοτινοειδές	104 \pm 8	103 \pm 6	96 \pm 5	94 \pm 2	113 \pm 4	94 \pm 3	101 \pm 7	85 \pm 3
46	<i>Linuron</i>	φανιλουρία	97 \pm 9	95 \pm 2	83 \pm 4	78 \pm 5	93 \pm 11	58 \pm 5	71 \pm 8	76 \pm 7
47	<i>Mepanipyrim</i>	αντλιοπουριμιδίνη	108 \pm 5	103 \pm 8	104 \pm 8	108 \pm 3	109 \pm 1	75 \pm 3	108 \pm 3	157 \pm 14
48	<i>Methabenzthiazuron</i>	βενζοθειαζόλη / ουρία	87 \pm 8	88 \pm 7	65 \pm 7	58 \pm 4	60 \pm 1	48 \pm 4	64 \pm 2	60 \pm 8
49	<i>Metalaxyl-M</i>	φανυλαμιδίο	136 \pm 5	127 \pm 10	94 \pm 6	89 \pm 3	99 \pm 9	63 \pm 5	117 \pm 4	84 \pm 11
50	<i>Metobromuron</i>	φανιλουρία	84 \pm 9	88 \pm 6	73 \pm 10	64 \pm 3	68 \pm 12	56 \pm 5	81 \pm 4	62 \pm 3

A/A	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Μέση ανάκτηση, Rec (%) \pm (RSD %, $n = 5$)							
			ΠΠΔ I - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - ACN / ΠΕΑ I		ΠΠΔ III - MeOH / ΠΕΑ II	
			5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb
51	<i>Monocrotophos</i>	οργανοφωσφορικό	95 \pm 5	95 \pm 2	77 \pm 5	72 \pm 4	113 \pm 11	104 \pm 12	80 \pm 5	84 \pm 10
52	<i>Omethoate</i>	οργανοφωσφορικό	111 \pm 5	102 \pm 1	125 \pm 6	120 \pm 1	174 \pm 18	183 \pm 31	74 \pm 10	74 \pm 10
53	<i>Oxadixyl</i>	Φαινυλαμιδίο / οξαζολιδινόνη	156 \pm 19	165 \pm 6	126 \pm 12	128 \pm 3	107 \pm 3	102 \pm 3	104 \pm 8	90 \pm 5
54	<i>Paraoxon-methyl</i>	οξόνιο (του <i>Parathion-methyl</i>)	91 \pm 3	91 \pm 3	124 \pm 2	129 \pm 7	71 \pm 3	73 \pm 6	88 \pm 4	64 \pm 12
55	<i>Penconazole</i>	τριαζόλη	99 \pm 10	95 \pm 5	91 \pm 3	100 \pm 2	137 \pm 10	81 \pm 3	103 \pm 11	83 \pm 19
56	<i>Pencycuron</i>	φαινλουρία	85 \pm 5	85 \pm 3	95 \pm 1	116 \pm 2	112 \pm 4	85 \pm 4	70 \pm 6	184 \pm 12
57	<i>Phosphamidon</i>	οργανοφωσφορικό	90 \pm 3	92 \pm 2	125 \pm 17	136 \pm 21	135 \pm 14	131 \pm 18	115 \pm 9	127 \pm 15
58	<i>Pirimicarb</i>	καρβαμιδικό	112 \pm 5	99 \pm 4	135 \pm 0	139 \pm 2	133 \pm 7	94 \pm 2	138 \pm 3	107 \pm 3
59	<i>Prometryn</i>	τριαζίνη (μεθυλθειο-1,3,5-τριαζίνη)	112 \pm 3	104 \pm 3	125 \pm 7	160 \pm 3	124 \pm 4	80 \pm 7	165 \pm 4	103 \pm 10
60	<i>Pyraclostrobin</i>	στρομπλουρίνη	87 \pm 5	91 \pm 7	90 \pm 3	106 \pm 3	106 \pm 11	75 \pm 12	87 \pm 8	94 \pm 25
61	<i>PyrifenoX</i>	πυριδίνη	105 \pm 9	96 \pm 4	157 \pm 3	125 \pm 1	117 \pm 5	66 \pm 1	114 \pm 5	97 \pm 4
62	<i>Pyrimethanil</i>	ανιλινοπυριμιδίνη	119 \pm 16	93 \pm 4	102 \pm 5	86 \pm 3	85 \pm 0	52 \pm 4	130 \pm 3	81 \pm 8
63	<i>Tebuconazole</i>	τριαζόλη / δ-ταγής αλκοόλη	95 \pm 9	85 \pm 7	114 \pm 5	124 \pm 2	168 \pm 3	131 \pm 4	126 \pm 4	139 \pm 16
64	<i>Tebufenozide</i>	διακυλυδραζίνη	104 \pm 7	96 \pm 3	106 \pm 7	130 \pm 3	135 \pm 0	89 \pm 4	114 \pm 4	94 \pm 7
65	<i>Terbufos sulfoxide</i>	μη ταξινομημένο	111 \pm 3	99 \pm 5	115 \pm 17	132 \pm 13	141 \pm 11	126 \pm 9	157 \pm 16	138 \pm 14
66	<i>Tetraconazole</i>	τριαζόλη	104 \pm 7	99 \pm 5	79 \pm 8	94 \pm 2	102 \pm 0	71 \pm 3	113 \pm 5	56 \pm 39
67	<i>Thiacloprid</i>	νεονικοτινοειδές	95 \pm 4	96 \pm 2	64 \pm 3	65 \pm 4	45 \pm 6	46 \pm 2	84 \pm 5	95 \pm 3
68	<i>Thiamethoxam</i>	νεονικοτινοειδές	91 \pm 5	98 \pm 3	85 \pm 3	76 \pm 8	81 \pm 3	105 \pm 3	158 \pm 9	99 \pm 1

Α/Α	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Μέση ανάκτηση, Rec (%) ± (RSD %, n = 5)							
			ΠΠΔ I - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - MeOH / ΠΕΑ I		ΠΠΔ II - ACN / ΠΕΑ I		ΠΠΔ III - MeOH / ΠΕΑ II	
			5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb	5ppb	50ppb
69	<i>Thifensulfuron-methyl</i>	σουλφονουρία	68 ± 8	92 ± 6	127 ± 5	141 ± 5	123 ± 6	151 ± 1	151 ± 24	119 ± 12
70	<i>Triazophos</i>	οργανοφωσφορικό	91 ± 5	96 ± 4	44 ± 5	60 ± 7	58 ± 4	88 ± 6	57 ± 4	104 ± 26
71	<i>Tricyclazole</i>	τριαζολοβενζοθειαζόλη	109 ± 8	94 ± 4	111 ± 4	117 ± 4	121 ± 1	85 ± 2	143 ± 2	109 ± 4
72	<i>Trifloxystrobin</i>	στρομπλουρίνη	66 ± 4	93 ± 3	74 ± 4	86 ± 5	76 ± 10	49 ± 1	45 ± 6	85 ± 31



Σχήμα 5.1: Μέσες (απόλυτες) ανακτήσεις σε συγκέντρωση 5ppb (για κάθε αναλύτη) για τους 72 α.σ., μετά από εφαρμογή των υπό δοκιμή πρωτοκόλλων (βλ. 4.5) σε υπόστρωμα ορού αίματος.



Σχήμα 5.2: Μέσες (απόλυτες) ανακτήσεις σε συγκέντρωση 50ppb (για κάθε αναλύτη) για τους 72 α.σ., μετά από εφαρμογή των υπό δοκιμή πρωτοκόλλων (βλ. 4.5) σε υπόστρωμα ορού αίματος.

Πίνακας 5.3: Στατιστικά δεδομένα ορθότητας και πιστότητας για τους 72 α.σ. σε τέσσερα (4) επίπεδα συγκεντρώσεων υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας σε υπόστρωμα ορού αίματος.

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%) ³³	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ ³⁴ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
1	<i>Acetamiprid</i>	1,25	1,30	0,04	3,02	104,22 ± 2,92	4,00	1,23	0,09	7,04	98,41 ± 4,14	-1,59
		5	4,89	0,19	3,85	97,89 ± 3,48	-2,11	4,84	0,35	7,33	96,70 ± 5,21	-3,30
		50	49,97	1,55	3,11	99,94 ± 3,26	-0,06	49,20	4,23	8,59	98,40 ± 5,58	-1,60
		375	365,66	11,04	3,02	97,51 ± 2,34	-2,49	355,39	34,19	9,62	94,77 ± 6,26	-5,23
2	<i>Alachlor</i>	1,25	1,34	0,08	5,80	107,56 ± 4,85	7,56	1,27	0,09	7,32	101,30 ± 5,32	1,30
		5	5,07	0,21	4,14	101,43 ± 3,94	1,43	4,93	0,24	4,97	98,56 ± 4,17	-1,44
		50	50,92	2,15	4,23	101,84 ± 4,52	1,84	47,43	3,13	6,59	94,85 ± 5,74	-5,15
		375	371,78	5,13	1,38	99,14 ± 0,78	-0,86	368,74	15,45	4,19	98,33 ± 3,28	-1,67
3	<i>Aldicarb</i>	1,25	0,79	0,09	10,88	63,58 ± 7,41	-36,42	0,82	0,09	11,57	65,42 ± 8,59	-34,58
		5	4,27	0,59	13,84	85,33 ± 9,25	-14,67	4,46	0,64	14,40	89,10 ± 9,97	-10,90
		50	42,55	3,01	7,08	85,10 ± 8,03	-14,90	46,28	5,22	11,27	92,55 ± 9,66	-7,45
		375	345,08	6,80	1,97	92,02 ± 2,34	-7,98	356,66	20,72	5,81	95,11 ± 5,39	-4,89
4	<i>Aldicarb sulfone</i>	1,25	0,86	0,08	9,56	68,54 ± 8,54	-31,46	0,89	0,09	11,08	66,20 ± 9,46	-33,80
		5	4,81	0,10	2,17	96,21 ± 3,27	-3,79	4,89	0,25	5,04	97,80 ± 5,42	-2,20
		50	48,91	1,01	2,06	97,81 ± 2,46	-2,19	48,13	2,39	4,97	96,26 ± 6,03	-3,74
		375	368,89	10,62	2,88	98,37 ± 3,36	-1,63	364,80	19,30	5,29	97,28 ± 5,53	-2,72
5	<i>Aldicarb sulfoxide</i>	1,25	0,84	0,11	13,29	67,51 ± 11,40	-32,49	0,85	0,12	14,01	68,24 ± 11,87	-31,76
		5	4,76	0,43	9,04	95,18 ± 4,71	-4,82	4,71	0,50	10,58	94,21 ± 5,28	-5,79
		50	47,49	2,31	4,87	94,97 ± 5,28	-5,03	47,53	2,96	6,22	95,05 ± 6,29	-4,95
		375	375,98	10,45	2,78	100,26 ± 5,93	0,26	370,39	26,89	7,26	98,77 ± 7,89	-1,23

33 Αφορά στην εκτίμηση της τιμής στόχου με βάση το μ. (βλ. §2.8.4)

34 μ: η μέση τιμή των μετρήσεων

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
6	<i>Ametryn</i>	1,25	1,16	0,10	8,59	92,74 ± 7,66	-7,26	1,20	0,15	12,41	95,74 ± 9,26	-4,26
		5	5,65	0,11	2,01	113,08 ± 4,98	13,08	5,41	0,32	5,83	108,24 ± 6,70	8,24
		50	49,49	2,59	5,24	98,97 ± 4,82	-1,03	48,46	3,63	7,49	96,92 ± 5,94	-3,08
		375	372,04	22,21	5,97	99,21 ± 5,01	-0,79	367,73	22,65	6,16	98,06 ± 5,21	-1,94
7	<i>Azoxystrobin</i>	1,25	1,32	0,12	8,97	105,84 ± 9,66	5,84	1,20	0,13	10,44	95,87 ± 10,10	-4,13
		5	5,50	0,23	4,18	110,08 ± 5,92	10,08	5,11	0,35	6,92	102,11 ± 7,63	2,11
		50	48,72	1,37	2,82	97,44 ± 6,16	-2,56	48,09	1,62	3,37	96,18 ± 7,08	-3,82
		375	367,35	6,54	1,78	97,96 ± 5,07	-2,04	357,79	14,35	4,01	95,41 ± 5,44	-4,59
8	<i>Benalaxyl</i>	1,25	1,24	0,01	1,11	98,80 ± 2,07	-1,20	1,20	0,05	4,03	95,85 ± 3,97	-4,15
		5	5,38	0,22	4,07	107,53 ± 5,24	7,53	4,92	0,37	7,50	98,41 ± 7,99	-1,59
		50	49,98	0,49	0,98	99,95 ± 1,53	-0,05	48,70	1,81	3,71	97,39 ± 4,02	-2,61
		375	374,51	4,38	1,17	99,87 ± 2,16	-0,13	367,50	10,95	2,98	98,00 ± 4,66	-2,00
9	<i>Benfuracarb</i>	1,25	1,09	0,02	2,07	87,21 ± 3,88	-12,79	1,15	0,08	6,62	91,70 ± 6,44	-8,30
		5	4,01	0,21	5,17	80,14 ± 5,59	-19,86	4,29	0,30	6,94	85,87 ± 6,03	-14,13
		50	45,46	2,88	6,33	90,92 ± 7,20	-9,08	45,10	2,92	6,48	90,20 ± 7,37	-9,80
		375	349,73	22,00	6,29	93,26 ± 6,17	-6,74	361,24	25,72	7,12	96,33 ± 6,34	-3,67
10	<i>Boscalid</i>	1,25	0,88	0,07	8,51	70,26 ± 9,44	-29,74	0,83	0,08	9,22	66,17 ± 9,97	-33,83
		5	3,42	0,16	4,77	68,37 ± 5,10	-31,63	3,62	0,25	6,98	72,41 ± 7,16	-27,59
		50	36,21	2,22	6,14	72,41 ± 8,77	-27,59	35,55	2,51	7,05	71,10 ± 9,51	-28,90
		375	293,93	28,19	9,59	78,38 ± 9,31	-21,62	290,55	33,18	11,42	77,48 ± 10,86	-22,52
11	<i>Buprofezin</i>	1,25	1,38	0,05	3,28	110,74 ± 4,00	10,74	1,29	0,12	8,96	103,12 ± 9,62	3,12
		5	4,06	0,17	4,22	81,28 ± 3,76	-18,72	4,61	0,25	5,52	92,11 ± 4,23	-7,89
		50	48,11	2,20	4,58	96,21 ± 3,93	-3,79	48,27	2,64	5,47	96,53 ± 5,03	-3,47
		375	358,09	20,48	5,72	95,49 ± 5,71	-4,51	356,70	22,44	6,29	95,12 ± 6,19	-4,88

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
12	<i>Caduzafos</i>	1,25	0,86	0,03	4,01	69,15 ± 4,84	-30,85	0,85	0,04	4,36	67,82 ± 4,92	-32,18
		5	4,30	0,49	11,31	86,05 ± 8,17	-13,95	4,38	0,53	12,10	87,52 ± 8,79	-12,48
		50	46,07	0,96	2,08	92,14 ± 5,52	-7,86	46,94	1,86	3,96	93,88 ± 5,96	-6,12
		375	356,81	22,91	6,42	95,15 ± 5,58	-4,85	360,38	24,54	6,81	96,10 ± 5,98	-3,90
13	<i>Carbendazim</i>	1,25	1,04	0,04	3,93	83,56 ± 2,73	-16,44	1,13	0,07	5,96	90,27 ± 4,36	-9,73
		5	4,86	0,10	2,14	97,17 ± 4,87	-2,83	4,81	0,17	3,56	96,14 ± 5,42	-3,86
		50	48,42	0,91	1,87	96,84 ± 4,10	-3,16	47,64	1,01	2,12	95,28 ± 4,65	-4,72
		375	359,44	20,74	5,77	95,85 ± 5,25	-4,15	365,40	23,09	6,32	97,44 ± 6,33	-2,56
14	<i>Carbofuran</i>	1,25	1,06	0,12	11,17	85,03 ± 10,12	-14,97	1,08	0,13	12,27	86,50 ± 10,45	-13,50
		5	4,45	0,24	5,32	88,94 ± 7,15	-11,06	4,51	0,27	6,01	90,13 ± 7,69	-9,87
		50	45,72	2,64	5,77	91,43 ± 7,22	-8,57	46,25	2,82	6,10	92,50 ± 7,37	-7,50
		375	345,64	20,74	6,00	92,17 ± 5,98	-7,83	335,40	24,65	7,35	89,44 ± 6,87	-10,56
15	<i>Chloridazon</i>	1,25	0,91	0,09	10,21	72,80 ± 8,97	-27,20	0,92	0,10	11,43	73,29 ± 11,09	-26,71
		5	4,27	0,18	4,17	85,41 ± 4,04	-14,59	4,62	0,29	6,19	92,44 ± 6,04	-7,56
		50	45,13	1,39	3,08	90,26 ± 3,07	-9,74	45,76	1,47	3,22	91,51 ± 3,29	-8,49
		375	343,80	21,87	6,36	91,68 ± 3,90	-8,32	365,33	34,74	9,51	97,42 ± 6,10	-2,58
16	<i>Chlorobromuron</i>	1,25	0,86	0,07	7,84	69,11 ± 7,44	-30,89	0,88	0,08	9,42	70,38 ± 7,96	-29,62
		5	4,57	0,30	6,51	91,40 ± 7,24	-8,60	4,68	0,42	8,91	93,64 ± 7,84	-6,36
		50	44,83	3,22	7,18	89,65 ± 7,79	-10,35	47,58	5,13	10,78	95,15 ± 8,05	-4,85
		375	340,16	17,93	5,27	90,71 ± 6,27	-9,29	357,00	25,95	7,27	95,20 ± 6,93	-4,80
17	<i>Chlorpyrifos-ethyl</i>	1,25	0,80	0,03	3,98	64,39 ± 5,11	-35,61	0,82	0,04	4,49	65,73 ± 5,60	-34,27
		5	5,12	0,25	4,87	102,30 ± 4,51	2,30	5,16	0,34	6,59	103,21 ± 4,88	3,21
		50	50,19	1,21	2,41	100,37 ± 4,62	0,37	48,06	2,31	4,81	96,12 ± 5,01	-3,88
		375	368,03	12,07	3,28	98,14 ± 4,79	-1,86	359,89	15,55	4,32	95,97 ± 4,91	-4,03

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
18	<i>Clethodim</i>	1,25	0,83	0,04	4,38	66,28 ± 4,11	-33,72	0,85	0,02	2,04	67,79 ± 4,18	-32,21
		5	4,74	0,40	8,43	94,87 ± 8,71	-5,13	4,60	0,42	9,16	92,05 ± 9,16	-7,95
		50	48,13	2,03	4,21	96,25 ± 5,52	-3,75	47,93	2,37	4,94	95,86 ± 6,02	-4,14
		375	338,18	14,98	4,43	90,18 ± 5,74	-9,82	342,75	16,69	4,87	91,40 ± 5,86	-8,60
19	<i>Clofentezine</i>	1,25	0,82	0,03	3,72	65,86 ± 5,14	-34,14	0,84	0,06	7,15	67,41 ± 6,83	-32,59
		5	4,36	0,44	10,21	87,14 ± 10,72	-12,86	4,52	0,57	12,71	90,31 ± 11,37	-9,69
		50	44,72	2,22	4,97	89,43 ± 5,92	-10,57	44,37	2,52	5,67	88,74 ± 6,58	-11,26
		375	358,65	11,69	3,26	95,64 ± 3,64	-4,36	360,38	16,07	4,46	96,10 ± 4,70	-3,90
20	<i>Clothianidin</i>	1,25	0,80	0,03	4,21	63,88 ± 4,74	-36,12	0,81	0,04	4,52	64,73 ± 4,92	-35,27
		5	4,92	0,39	7,96	98,35 ± 6,30	-1,65	4,78	0,44	9,13	95,64 ± 8,13	-4,36
		50	49,05	2,16	4,40	98,10 ± 5,19	-1,90	48,86	2,39	4,89	97,71 ± 5,23	-2,29
		375	367,01	13,54	3,69	97,87 ± 4,33	-2,13	361,43	14,60	4,04	96,38 ± 4,72	-3,62
21	<i>Coumaphos</i>	1,25	1,14	0,10	9,07	91,02 ± 8,88	-8,98	1,15	0,12	10,01	92,18 ± 8,93	-7,82
		5	4,53	0,20	4,31	90,57 ± 4,76	-9,43	5,16	0,26	4,99	103,10 ± 5,06	3,10
		50	48,56	1,64	3,37	97,11 ± 4,97	-2,89	48,03	1,85	3,86	96,06 ± 5,14	-3,94
		375	351,08	7,34	2,09	93,62 ± 3,13	-6,38	352,88	10,83	3,07	94,10 ± 3,97	-5,90
22	<i>Cyproconazole</i>	1,25	1,32	0,25	18,74	105,92 ± 14,12	5,92	1,16	0,22	18,88	93,14 ± 14,76	-6,86
		5	4,72	0,62	13,11	94,36 ± 11,41	-5,64	4,79	0,24	5,02	95,84 ± 12,51	-4,16
		50	46,39	1,97	4,24	92,77 ± 6,47	-7,23	46,99	2,08	4,43	93,97 ± 6,78	-6,03
		375	358,35	19,21	5,36	95,56 ± 6,98	-4,44	364,31	21,64	5,94	97,15 ± 7,19	-2,85
23	<i>Demeton-S-methyl sulfoxide</i>	1,25	1,19	0,04	3,17	95,14 ± 3,91	-4,86	1,20	0,04	3,73	96,10 ± 4,62	-3,90
		5	4,72	0,11	2,24	94,41 ± 2,94	-5,59	5,05	0,15	2,98	100,97 ± 3,40	0,97
		50	47,91	0,93	1,95	95,82 ± 2,58	-4,18	48,16	1,36	2,82	96,31 ± 2,96	-3,69
		375	357,26	21,19	5,93	95,27 ± 4,75	-4,73	360,11	23,66	6,57	96,03 ± 5,08	-3,97

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
24	<i>Desmetryn</i>	1,25	1,19	0,04	3,34	95,27 ± 4,51	-4,73	1,17	0,05	4,10	93,64 ± 4,92	-6,36
		5	5,03	0,15	3,01	100,58 ± 4,02	0,58	4,89	0,27	5,59	97,87 ± 4,46	-2,13
		50	47,88	2,95	6,16	95,76 ± 5,86	-4,24	47,50	2,99	6,30	94,99 ± 5,98	-5,01
		375	358,91	14,61	4,07	95,71 ± 3,82	-4,29	362,70	15,63	4,31	96,72 ± 4,10	-3,28
25	<i>Diazinon</i>	1,25	1,04	0,08	7,29	82,97 ± 6,31	-17,03	1,13	0,13	11,27	90,21 ± 8,36	-9,79
		5	5,26	0,31	5,83	105,29 ± 5,64	5,29	5,34	0,42	7,80	106,77 ± 6,72	6,77
		50	47,67	1,98	4,15	95,33 ± 5,77	-4,67	47,55	2,34	4,92	95,10 ± 5,83	-4,90
		375	352,58	32,90	9,33	94,02 ± 8,95	-5,98	361,24	39,66	10,98	96,33 ± 9,26	-3,67
26	<i>Dicrotophos</i>	1,25	1,28	0,22	17,56	102,21 ± 16,31	2,21	1,19	0,22	18,90	94,98 ± 16,81	-5,02
		5	4,47	0,23	5,13	89,32 ± 7,93	-10,68	5,10	0,53	10,37	102,09 ± 8,93	2,09
		50	46,07	5,25	11,40	92,14 ± 8,42	-7,86	46,16	5,46	11,82	92,32 ± 8,57	-7,68
		375	337,54	14,11	4,18	90,01 ± 9,76	-9,99	342,79	21,87	6,38	91,41 ± 9,92	-8,59
27	<i>Difenoconazole</i>	1,25	0,83	0,03	3,95	66,23 ± 4,76	-33,77	0,86	0,04	5,13	68,80 ± 5,25	-31,20
		5	4,71	0,24	5,04	94,12 ± 6,24	-5,88	4,62	0,28	6,10	92,47 ± 6,78	-7,53
		50	43,57	3,57	8,19	87,14 ± 6,53	-12,86	45,26	4,15	9,17	90,51 ± 7,23	-9,49
		375	354,11	12,04	3,40	94,43 ± 3,52	-5,57	350,59	14,55	4,15	93,49 ± 3,97	-6,51
28	<i>Dimethoate</i>	1,25	1,01	0,08	8,07	80,94 ± 7,98	-19,06	1,22	0,16	13,54	97,42 ± 10,34	-2,58
		5	4,81	0,28	5,90	96,16 ± 5,72	-3,84	4,66	0,29	6,18	93,14 ± 5,94	-6,86
		50	46,21	2,43	5,26	92,41 ± 5,01	-7,59	46,86	2,82	6,02	93,72 ± 5,77	-6,28
		375	357,64	12,27	3,43	95,37 ± 3,74	-4,63	363,38	13,52	3,72	96,90 ± 3,81	-3,10
29	<i>Dimethomorph</i>	1,25	0,97	0,03	3,17	77,22 ± 3,11	-22,78	0,92	0,05	5,39	73,24 ± 4,85	-26,76
		5	4,74	0,39	8,22	94,88 ± 7,64	-5,12	4,79	0,50	10,44	95,81 ± 8,80	-4,19
		50	46,71	1,91	4,10	93,41 ± 3,98	-6,59	47,52	2,78	5,86	95,03 ± 9,07	-4,97
		375	349,39	18,38	5,26	93,17 ± 5,21	-6,83	361,80	24,49	6,77	96,48 ± 6,39	-3,52

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
30	<i>Diuron</i>	1,25	1,01	0,17	16,51	80,92 ± 14,82	-19,08	1,15	0,21	17,95	92,24 ± 15,21	-7,76
		5	4,46	0,28	6,30	89,19 ± 7,05	-10,81	4,68	0,35	7,44	93,65 ± 7,94	-6,35
		50	45,71	3,38	7,39	91,42 ± 8,29	-8,58	48,55	3,89	8,01	97,10 ± 8,85	-2,90
		375	367,73	12,54	3,41	98,06 ± 4,72	-1,94	372,04	15,29	4,11	99,21 ± 4,96	-0,79
31	<i>EPN</i>	1,25	0,93	0,05	5,05	74,15 ± 6,18	-25,85	0,91	0,07	7,48	72,58 ± 7,77	-27,42
		5	4,26	0,56	13,11	85,23 ± 11,62	-14,77	4,32	0,66	15,18	86,37 ± 12,40	-13,63
		50	47,99	1,19	2,49	95,98 ± 2,98	-4,02	46,11	1,91	4,15	92,22 ± 3,97	-7,78
		375	364,73	15,61	4,28	97,26 ± 3,57	-2,74	364,91	17,88	4,90	97,31 ± 3,64	-2,69
32	<i>Ethion</i>	1,25	0,94	0,08	8,46	74,94 ± 5,02	-25,06	0,97	0,11	11,30	77,92 ± 7,04	-22,08
		5	5,46	0,34	6,31	109,20 ± 6,93	9,20	5,17	0,39	7,51	103,43 ± 7,15	3,43
		50	49,11	1,49	3,03	98,22 ± 4,83	-1,78	48,91	2,98	6,10	97,81 ± 6,08	-2,19
		375	363,90	15,54	4,27	97,04 ± 5,44	-2,96	362,33	21,63	5,97	96,62 ± 6,11	-3,38
33	<i>Ethoprophos</i>	1,25	1,01	0,05	5,01	80,40 ± 6,04	-19,60	1,15	0,09	7,58	91,76 ± 7,96	-8,24
		5	4,03	0,46	11,36	80,58 ± 10,47	-19,42	4,36	0,51	11,72	87,15 ± 10,58	-12,85
		50	47,71	1,42	2,97	95,41 ± 8,22	-4,59	47,06	2,08	4,41	94,12 ± 9,61	-5,88
		375	357,68	10,80	3,02	95,38 ± 7,65	-4,62	362,14	18,79	5,19	96,57 ± 8,27	-3,43
34	<i>Fenamidone</i>	1,25	1,14	0,01	1,00	91,03 ± 1,58	-8,97	1,16	0,04	3,37	92,61 ± 3,13	-7,39
		5	4,16	0,43	10,30	83,22 ± 9,57	-16,78	4,51	0,52	11,42	90,24 ± 10,72	-9,76
		50	48,17	1,00	2,07	96,34 ± 3,24	-3,66	47,17	1,45	3,08	94,33 ± 4,62	-5,67
		375	324,11	19,19	5,92	86,43 ± 6,34	-13,57	357,30	23,26	6,51	95,28 ± 7,07	-4,72
35	<i>Fenamiphos</i>	1,25	1,48	0,21	14,40	118,30 ± 12,11	18,30	1,36	0,25	18,65	109,14 ± 14,77	9,14
		5	4,31	0,14	3,24	86,19 ± 4,73	-13,81	5,08	0,29	5,71	101,63 ± 5,07	1,63
		50	42,32	0,85	2,00	84,63 ± 3,51	-15,37	48,71	2,80	5,74	97,41 ± 5,11	-2,59
		375	349,39	14,32	4,10	93,17 ± 3,68	-6,83	375,26	23,57	6,28	100,07 ± 5,41	0,07

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
36	<i>Fenamiphos sulfone</i>	1,25	1,01	0,16	15,41	80,67 ± 9,36	-19,33	1,05	0,17	16,40	84,15 ± 9,49	-15,85
		5	5,39	0,44	8,08	107,75 ± 7,45	7,75	5,06	0,46	9,04	101,21 ± 8,56	1,21
		50	46,27	1,00	2,16	92,54 ± 6,18	-7,46	49,00	1,72	3,52	97,99 ± 7,10	-2,01
		375	364,54	11,45	3,14	97,21 ± 3,44	-2,79	360,38	16,97	4,71	96,10 ± 4,52	-3,90
37	<i>Fenbuconazole</i>	1,25	1,03	0,19	18,23	82,41 ± 15,28	-17,59	1,14	0,21	18,52	91,26 ± 15,29	-8,74
		5	4,92	0,40	8,05	98,37 ± 9,21	-1,63	4,71	0,43	9,14	94,18 ± 10,01	-5,82
		50	48,73	1,68	3,44	97,46 ± 4,43	-2,54	47,16	2,46	5,21	94,31 ± 5,55	-5,69
		375	341,55	15,27	4,47	91,08 ± 5,07	-8,92	352,31	18,07	5,13	93,95 ± 6,07	-6,05
38	<i>Fenthion</i>	1,25	0,83	0,05	5,61	66,54 ± 5,10	-33,46	0,79	0,06	7,10	63,29 ± 6,82	-36,71
		5	4,66	0,52	11,13	93,10 ± 10,07	-6,90	4,61	0,56	12,06	92,21 ± 10,32	-7,79
		50	44,63	2,31	5,17	89,25 ± 5,16	-10,75	47,65	3,07	6,44	95,29 ± 5,96	-4,71
		375	357,79	17,75	4,96	95,41 ± 4,21	-4,59	367,05	19,12	5,21	97,88 ± 4,95	-2,12
39	<i>Fenthion sulfone</i>	1,25	0,88	0,06	7,18	70,13 ± 7,96	-29,87	0,87	0,07	7,94	69,48 ± 8,20	-30,52
		5	5,31	0,32	6,06	106,17 ± 6,74	6,17	4,90	0,31	6,33	98,02 ± 6,91	-1,98
		50	48,57	3,37	6,93	97,14 ± 7,42	-2,86	48,76	3,46	7,10	97,51 ± 7,70	-2,49
		375	359,93	11,01	3,06	95,98 ± 3,64	-4,02	367,01	16,77	4,57	97,87 ± 4,19	-2,13
40	<i>Fenthion sulfoxide</i>	1,25	0,87	0,16	18,20	69,34 ± 17,28	-30,66	0,94	0,17	18,57	75,21 ± 17,36	-24,79
		5	4,92	0,20	4,01	98,30 ± 3,56	-1,70	4,76	0,22	4,55	95,22 ± 4,02	-4,78
		50	48,84	2,09	4,28	97,67 ± 4,91	-2,33	48,19	2,44	5,06	96,37 ± 5,61	-3,63
		375	342,11	16,97	4,96	91,23 ± 4,53	-8,77	368,03	27,31	7,42	98,14 ± 6,31	-1,86
41	<i>Fluometuron</i>	1,25	1,01	0,08	8,28	80,52 ± 7,21	-19,48	1,14	0,15	12,85	91,34 ± 9,04	-8,66
		5	4,02	0,58	14,33	80,41 ± 13,77	-19,59	4,38	0,64	14,68	87,50 ± 13,84	-12,50
		50	46,63	0,99	2,13	93,26 ± 4,33	-6,74	46,59	1,50	3,22	93,18 ± 5,08	-6,82
		375	320,44	26,18	8,17	85,45 ± 8,95	-14,55	345,41	47,36	13,71	92,11 ± 10,91	-7,89

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
42	<i>Flusilazole</i>	1,25	1,03	0,17	16,60	82,51 ± 14,92	-17,49	1,08	0,19	17,24	86,32 ± 15,17	-13,68
		5	4,31	0,61	14,08	86,11 ± 11,51	-13,89	4,38	0,65	14,92	87,55 ± 11,74	-12,45
		50	40,68	4,90	12,05	81,35 ± 10,28	-18,65	44,57	5,44	12,20	89,14 ± 10,63	-10,86
		375	364,80	21,96	6,02	97,28 ± 6,11	-2,72	358,31	26,73	7,46	95,55 ± 6,95	-4,45
43	<i>Flutolanil</i>	1,25	1,11	0,06	5,08	88,65 ± 4,70	-11,35	1,21	0,10	7,94	96,56 ± 4,81	-3,44
		5	4,95	0,27	5,55	98,94 ± 5,90	-1,06	4,71	0,29	6,13	94,12 ± 6,01	-5,88
		50	50,23	1,21	2,41	100,46 ± 2,14	0,46	49,61	1,45	2,92	99,22 ± 2,67	-0,78
		375	350,74	14,42	4,11	93,53 ± 5,02	-6,47	370,16	31,54	8,52	98,71 ± 7,68	-1,29
44	<i>Imazalil</i>	1,25	1,15	0,05	4,14	92,14 ± 8,35	-7,86	1,19	0,06	5,02	95,20 ± 8,45	-4,80
		5	4,72	0,11	2,24	94,45 ± 2,22	-5,55	4,81	0,17	3,57	96,17 ± 2,60	-3,83
		50	46,93	1,44	3,06	93,86 ± 3,10	-6,14	49,12	2,54	5,18	98,23 ± 4,25	-1,77
		375	377,63	18,58	4,92	100,70 ± 4,52	0,70	372,79	22,52	6,04	99,41 ± 6,09	-0,59
45	<i>Imidacloprid</i>	1,25	1,30	0,16	12,24	104,27 ± 13,46	4,27	1,21	0,17	14,04	96,86 ± 14,05	-3,14
		5	5,18	0,42	8,19	103,52 ± 7,04	3,52	4,92	0,45	9,23	98,42 ± 7,77	-1,58
		50	51,33	3,33	6,49	102,66 ± 5,21	2,66	49,00	4,64	9,48	97,99 ± 8,21	-2,01
		375	361,16	8,31	2,30	96,31 ± 3,19	-3,69	362,93	16,40	4,52	96,78 ± 4,32	-3,22
46	<i>Linuron</i>	1,25	1,32	0,01	0,80	105,26 ± 2,45	5,26	1,26	0,05	3,84	101,16 ± 5,59	1,16
		5	4,86	0,46	9,46	97,24 ± 8,81	-2,76	4,81	0,48	9,92	96,14 ± 8,96	-3,86
		50	47,69	1,16	2,44	95,37 ± 3,68	-4,63	48,30	2,71	5,62	96,60 ± 5,74	-3,40
		375	391,16	27,26	6,97	104,31 ± 7,00	4,31	369,45	22,54	6,10	98,52 ± 7,00	-1,48
47	<i>Mepanipyrim</i>	1,25	1,36	0,07	5,14	108,77 ± 6,07	8,77	1,28	0,10	7,92	102,47 ± 7,66	2,47
		5	5,47	0,29	5,27	109,41 ± 4,15	9,41	5,04	0,32	6,25	100,80 ± 5,21	0,80
		50	51,12	4,20	8,22	102,24 ± 5,44	2,24	48,78	5,04	10,34	97,56 ± 5,97	-2,44
		375	333,41	19,27	5,78	88,91 ± 6,48	-11,09	368,03	35,55	9,66	98,14 ± 7,78	-1,86

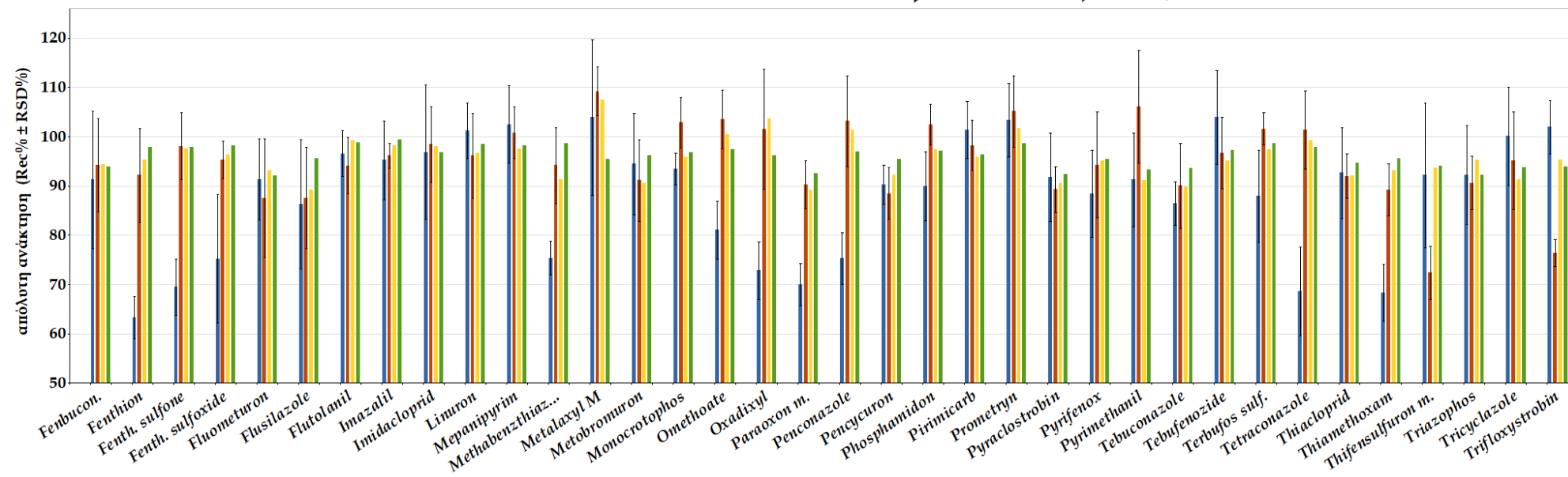
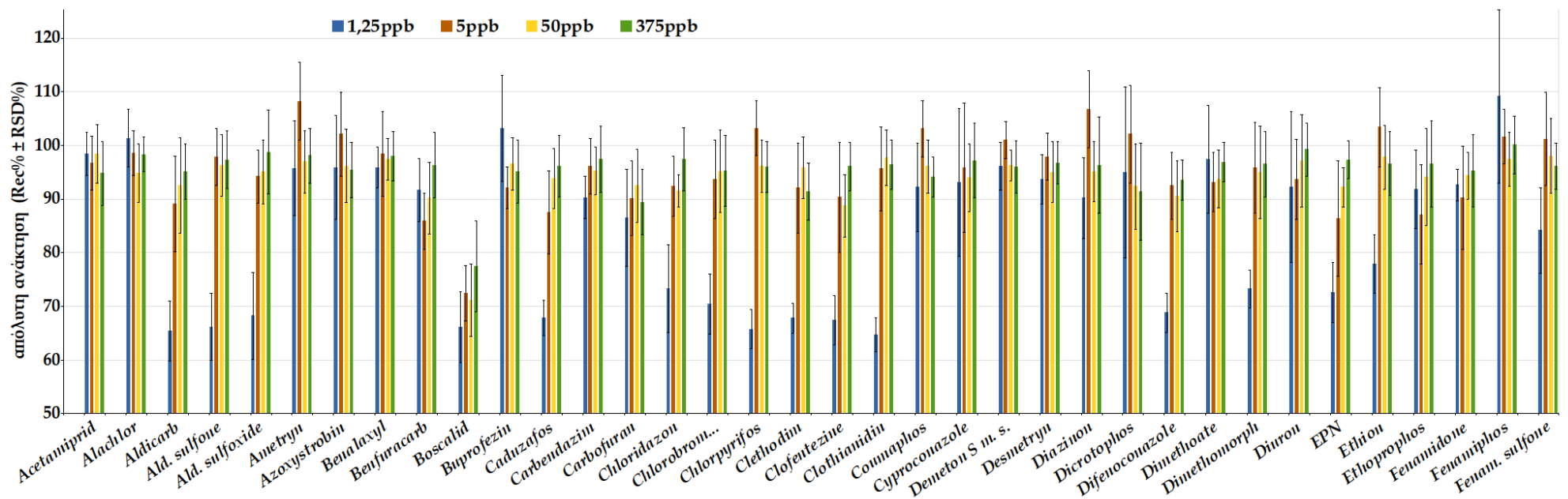
Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
48	<i>Methabenzthiazuron</i>	1,25	0,88	0,05	5,40	70,47 ± 4,13	-29,53	0,94	0,07	7,91	75,38 ± 4,52	-24,62
		5	4,37	0,36	8,21	87,30 ± 8,09	-12,70	4,71	0,61	13,02	94,16 ± 8,21	-5,84
		50	44,05	3,11	7,07	88,10 ± 7,54	-11,90	45,64	3,88	8,50	91,27 ± 7,69	-8,73
		375	401,06	32,21	8,03	106,95 ± 7,49	6,95	369,56	33,15	8,97	98,55 ± 7,85	-1,45
49	<i>Metalaxyl-M</i>	1,25	1,43	0,25	17,80	114,28 ± 15,02	14,28	1,30	0,24	18,55	103,88 ± 15,20	3,88
		5	5,77	0,29	5,01	115,45 ± 4,45	15,45	5,46	0,48	8,85	109,21 ± 4,59	9,21
		50	55,65	5,53	9,94	111,30 ± 9,13	11,30	53,78	6,78	12,61	107,46 ± 9,18	7,46
		375	339,04	10,58	3,12	90,41 ± 3,50	-9,59	358,01	26,92	7,52	95,47 ± 3,76	-4,53
50	<i>Metobromuron</i>	1,25	1,16	0,14	12,40	93,13 ± 10,84	-6,87	1,18	0,15	12,51	94,47 ± 10,87	-5,53
		5	4,21	0,38	9,11	84,10 ± 8,94	-15,90	4,56	0,53	11,62	91,10 ± 9,09	-8,90
		50	44,08	2,86	6,48	88,16 ± 6,11	-11,84	45,28	3,35	7,39	90,56 ± 6,23	-9,44
		375	364,39	11,08	3,04	97,17 ± 3,08	-2,83	360,64	19,01	5,27	96,17 ± 3,22	-3,83
51	<i>Monocrotophos</i>	1,25	1,14	0,04	3,07	91,21 ± 3,26	-8,79	1,17	0,06	5,14	93,43 ± 3,40	-6,57
		5	4,76	0,24	5,11	95,23 ± 4,71	-4,77	5,14	0,27	5,32	102,82 ± 4,99	2,82
		50	47,43	1,09	2,29	94,85 ± 2,42	-5,15	47,96	2,34	4,88	95,92 ± 2,87	-4,08
		375	356,29	15,93	4,47	95,01 ± 4,19	-4,99	362,70	25,32	6,98	96,72 ± 4,51	-3,28
52	<i>Omethoate</i>	1,25	1,02	0,08	7,82	81,56 ± 7,12	-18,44	1,01	0,08	7,94	81,04 ± 7,24	-18,96
		5	5,55	0,29	5,18	110,97 ± 5,73	10,97	5,18	0,47	9,11	103,52 ± 5,74	3,52
		50	51,18	0,69	1,34	102,36 ± 2,91	2,36	50,20	2,37	4,72	100,40 ± 3,26	0,40
		375	341,51	11,47	3,36	91,07 ± 3,82	-8,93	365,33	20,57	5,63	97,42 ± 4,17	-2,58
53	<i>Oxadixyl</i>	1,25	0,97	0,08	8,12	77,45 ± 7,90	-22,55	0,91	0,11	12,04	72,83 ± 8,07	-27,17
		5	5,35	0,72	13,51	106,94 ± 11,16	6,94	5,07	0,70	13,77	101,45 ± 12,02	1,45
		50	52,60	3,40	6,47	105,20 ± 5,87	5,20	51,82	3,58	6,90	103,64 ± 5,97	3,64
		375	355,76	19,14	5,38	94,87 ± 6,02	-5,13	360,45	27,29	7,57	96,12 ± 6,14	-3,88

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
54	<i>Paraoxon-methyl</i>	1,25	0,85	0,05	5,88	68,20 ± 5,65	-31,80	0,88	0,06	7,13	70,01 ± 6,07	-29,99
		5	4,57	0,16	3,43	91,41 ± 4,62	-8,59	4,51	0,19	4,14	90,21 ± 5,41	-9,79
		50	45,74	1,34	2,94	91,47 ± 3,24	-8,53	44,57	1,72	3,87	89,14 ± 4,25	-10,86
		375	352,46	10,43	2,96	93,99 ± 3,15	-6,01	346,91	12,32	3,55	92,51 ± 3,99	-7,49
55	<i>Penconazole</i>	1,25	0,88	0,06	6,83	70,37 ± 6,81	-29,63	0,94	0,09	9,91	75,24 ± 6,96	-24,76
		5	4,96	0,50	10,12	99,24 ± 8,59	-0,76	5,16	0,63	12,21	103,15 ± 8,91	3,15
		50	47,68	2,39	5,02	95,36 ± 4,97	-4,64	50,71	3,99	7,87	101,41 ± 5,42	1,41
		375	373,35	12,43	3,33	99,56 ± 3,08	-0,44	363,30	18,75	5,16	96,88 ± 3,73	-3,12
56	<i>Pencycuron</i>	1,25	1,05	0,04	3,98	84,01 ± 4,16	-15,99	1,13	0,08	7,52	90,24 ± 4,42	-9,76
		5	4,27	0,22	5,22	85,41 ± 5,03	-14,59	4,42	0,41	9,32	88,48 ± 5,87	-11,52
		50	42,62	1,47	3,44	85,23 ± 3,27	-14,77	46,15	3,47	7,51	92,30 ± 3,55	-7,70
		375	349,43	18,07	5,17	93,18 ± 5,11	-6,82	357,79	31,52	8,81	95,41 ± 5,79	-4,59
57	<i>Phosphamidon</i>	1,25	1,07	0,09	8,37	85,39 ± 7,55	-14,61	1,12	0,13	11,21	89,94 ± 7,84	-10,06
		5	4,51	0,14	3,13	90,18 ± 3,15	-9,82	5,12	0,39	7,63	102,41 ± 4,00	2,41
		50	46,11	0,97	2,10	92,22 ± 2,30	-7,78	48,71	2,68	5,51	97,41 ± 2,58	-2,59
		375	367,65	8,49	2,31	98,04 ± 2,22	-1,96	364,13	14,27	3,92	97,10 ± 2,66	-2,90
58	<i>Pirimicarb</i>	1,25	1,30	0,06	4,55	103,77 ± 5,16	3,77	1,27	0,07	5,84	101,41 ± 5,71	1,41
		5	5,58	0,29	5,18	111,62 ± 5,01	11,62	4,91	0,37	7,47	98,22 ± 5,20	-1,78
		50	49,52	1,99	4,02	99,04 ± 4,38	-0,96	47,93	3,80	7,92	95,85 ± 4,69	-4,15
		375	352,88	13,48	3,82	94,10 ± 3,71	-5,90	361,28	20,30	5,62	96,34 ± 3,92	-3,66
59	<i>Prometryn</i>	1,25	1,34	0,11	8,16	107,14 ± 6,84	7,14	1,29	0,13	10,27	103,38 ± 7,18	3,38
		5	5,62	0,29	5,17	112,32 ± 6,24	12,32	5,26	0,46	8,70	105,12 ± 6,84	5,12
		50	51,86	1,61	3,10	103,71 ± 4,27	3,71	50,85	2,17	4,26	101,70 ± 4,92	1,70
		375	323,10	18,06	5,59	86,16 ± 5,40	-13,84	369,79	28,99	7,84	98,61 ± 5,87	-1,39

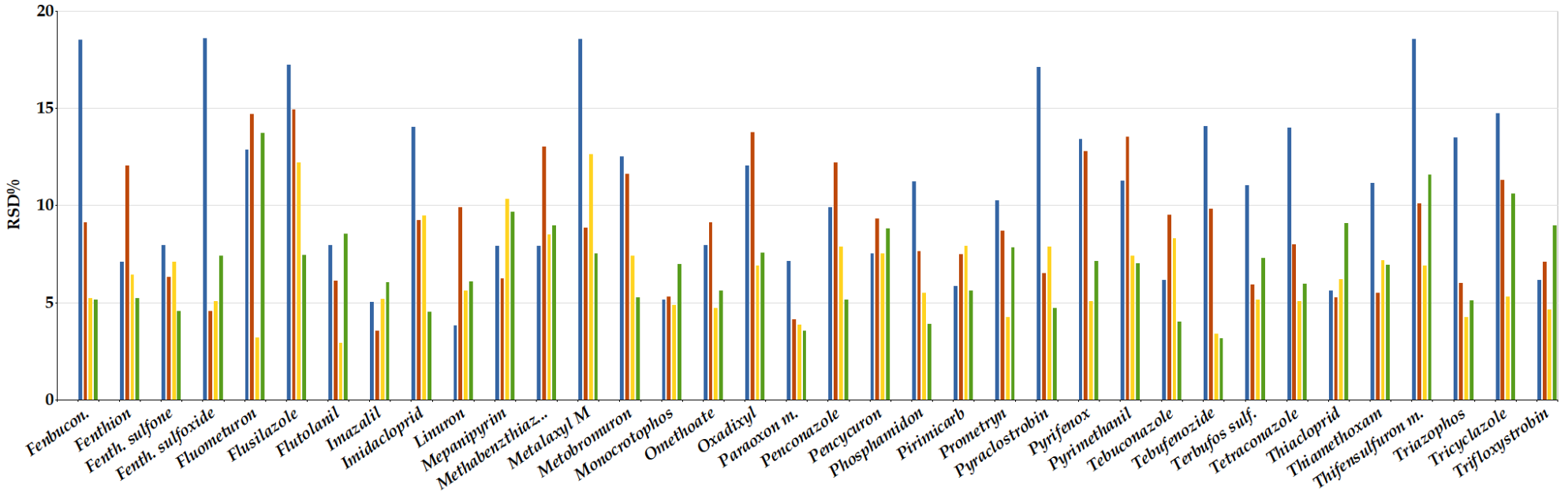
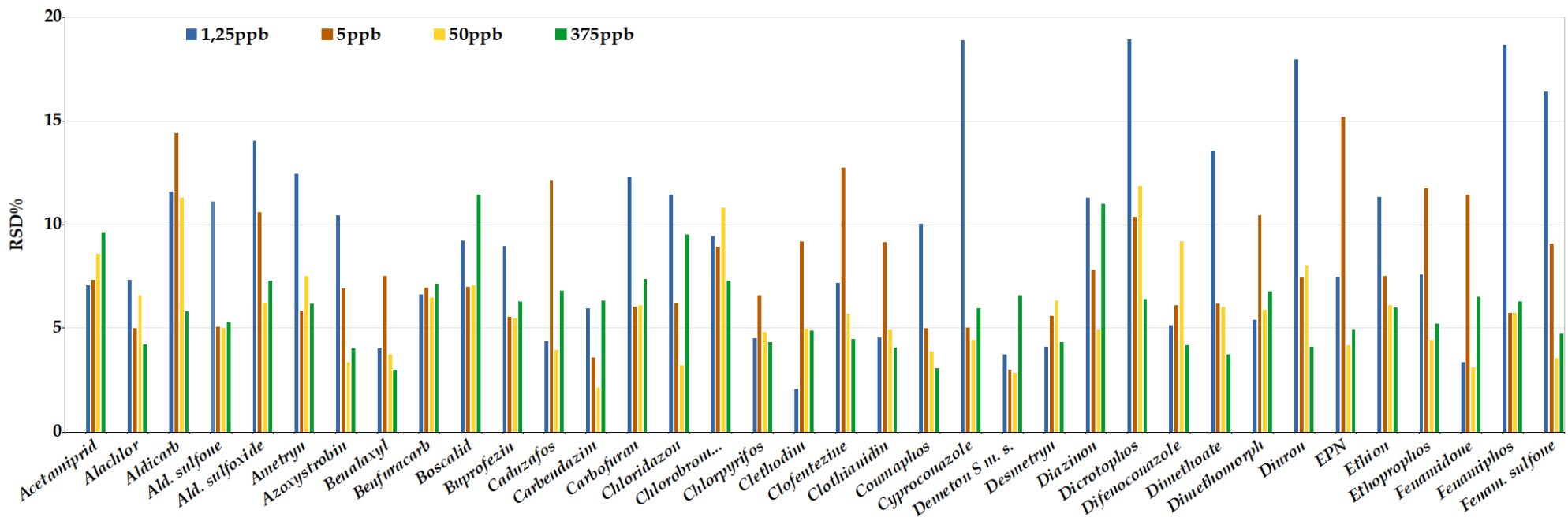
Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
60	<i>Pyraclostrobin</i>	1,25	1,06	0,17	16,35	85,09 ± 9,00	-14,91	1,15	0,20	17,11	91,74 ± 9,76	-8,26
		5	4,37	0,22	5,02	87,34 ± 4,98	-12,66	4,46	0,29	6,51	89,26 ± 5,26	-10,74
		50	45,73	3,25	7,11	91,45 ± 3,93	-8,55	45,27	3,57	7,89	90,54 ± 4,51	-9,46
		375	356,70	6,10	1,71	95,12 ± 1,82	-4,88	346,20	16,34	4,72	92,32 ± 2,99	-7,68
61	<i>Pyrifenox</i>	1,25	1,03	0,09	8,30	82,15 ± 8,11	-17,85	1,10	0,15	13,40	88,36 ± 9,99	-11,64
		5	5,23	0,49	9,44	104,51 ± 9,28	4,51	4,71	0,60	12,80	94,21 ± 11,40	-5,79
		50	48,13	1,96	4,08	96,25 ± 4,05	-3,75	47,56	2,41	5,07	95,12 ± 4,91	-4,88
		375	364,54	19,17	5,26	97,21 ± 3,94	-2,79	357,64	25,54	7,14	95,37 ± 4,57	-4,63
62	<i>Pyrimethanil</i>	1,25	1,19	0,12	10,12	95,49 ± 9,78	-4,51	1,14	0,13	11,28	91,26 ± 10,46	-8,74
		5	5,39	0,78	13,11	107,78 ± 10,66	7,78	5,30	0,72	13,52	106,07 ± 10,74	6,07
		50	46,69	1,90	4,07	93,37 ± 5,83	-6,63	45,61	3,38	7,42	91,21 ± 6,76	-8,79
		375	345,60	15,14	4,38	92,16 ± 5,97	-7,84	349,65	24,55	7,02	93,24 ± 7,03	-6,76
63	<i>Tebuconazole</i>	1,25	1,00	0,04	4,01	80,12 ± 4,17	-19,88	1,08	0,07	6,18	86,44 ± 5,03	-13,56
		5	4,76	0,41	8,67	95,28 ± 8,00	-4,72	4,50	0,43	9,52	90,03 ± 9,57	-9,97
		50	42,66	3,16	7,41	85,32 ± 6,80	-14,68	44,88	3,73	8,32	89,76 ± 7,22	-10,24
		375	363,75	7,38	2,03	97,00 ± 3,12	-3,00	350,81	14,10	4,02	93,55 ± 3,43	-6,45
64	<i>Tebufenozide</i>	1,25	1,44	0,13	9,19	115,39 ± 8,79	15,39	1,30	0,18	14,05	103,88 ± 9,21	3,88
		5	5,20	0,38	7,24	104,01 ± 7,11	4,01	4,84	0,47	9,82	96,70 ± 7,47	-3,30
		50	47,84	1,49	3,12	95,68 ± 2,97	-4,32	47,57	1,62	3,40	95,14 ± 3,05	-4,86
		375	364,01	11,25	3,09	97,07 ± 3,04	-2,93	364,95	11,53	3,16	97,32 ± 3,17	-2,68
65	<i>Terbufos sulfoxide</i>	1,25	1,08	0,11	9,95	86,14 ± 10,01	-13,86	1,10	0,12	11,02	87,91 ± 10,62	-12,09
		5	5,57	0,18	3,15	111,30 ± 2,96	11,30	5,08	0,30	5,94	101,59 ± 3,21	1,59
		50	49,61	2,47	4,98	99,21 ± 4,90	-0,79	48,72	2,50	5,13	97,44 ± 5,30	-2,56
		375	353,14	14,90	4,22	94,17 ± 4,37	-5,83	369,83	26,96	7,29	98,62 ± 4,79	-1,38

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
66	<i>Tetraconazole</i>	1,25	0,75	0,10	13,92	60,27 ± 12,90	-39,73	0,86	0,12	14,00	68,57 ± 13,08	-31,43
		5	5,20	0,38	7,24	104,05 ± 7,21	4,05	5,07	0,41	8,01	101,36 ± 7,77	1,36
		50	49,61	2,47	4,98	99,21 ± 4,67	-0,79	49,62	2,51	5,06	99,23 ± 4,73	-0,77
		375	353,14	10,81	3,06	94,17 ± 3,15	-5,83	367,05	21,95	5,98	97,88 ± 3,29	-2,12
67	<i>Thiacloprid</i>	1,25	1,13	0,06	5,11	90,23 ± 6,06	-9,77	1,16	0,06	5,61	92,61 ± 10,03	-7,39
		5	4,77	0,21	4,41	95,41 ± 4,32	-4,59	4,60	0,24	5,28	91,98 ± 4,87	-8,02
		50	48,08	1,00	2,08	96,16 ± 2,07	-3,84	46,06	2,86	6,21	92,12 ± 5,17	-7,88
		375	361,43	22,55	6,24	96,38 ± 6,17	-3,62	355,20	32,32	9,10	94,72 ± 7,86	-5,28
68	<i>Thiamethoxam</i>	1,25	0,83	0,08	9,18	66,02 ± 7,77	-33,98	0,85	0,10	11,14	68,31 ± 8,57	-31,69
		5	4,57	0,24	5,24	91,41 ± 5,21	-8,59	4,46	0,25	5,50	89,24 ± 5,91	-10,76
		50	49,16	1,71	3,47	98,32 ± 4,12	-1,68	46,56	3,34	7,18	93,12 ± 5,21	-6,88
		375	351,64	10,69	3,04	93,77 ± 3,08	-6,23	358,58	24,85	6,93	95,62 ± 5,77	-4,38
69	<i>Thifensulfuron-methyl</i>	1,25	1,19	0,22	18,37	95,21 ± 15,82	-4,79	1,15	0,21	18,53	92,15 ± 15,94	-7,85
		5	3,42	0,29	8,45	68,38 ± 6,77	-31,62	3,62	0,37	10,11	72,35 ± 7,54	-27,65
		50	46,07	2,81	6,09	92,14 ± 3,21	-7,86	46,82	3,23	6,89	93,63 ± 4,11	-6,37
		375	338,48	31,11	9,19	90,26 ± 7,59	-9,74	352,80	40,85	11,58	94,08 ± 8,08	-5,92
70	<i>Triazophos</i>	1,25	1,04	0,08	7,28	83,19 ± 7,10	-16,81	1,15	0,16	13,48	92,24 ± 10,84	-7,76
		5	4,56	0,25	5,41	91,24 ± 5,25	-8,76	4,53	0,27	6,02	90,60 ± 5,94	-9,40
		50	48,10	1,93	4,01	96,19 ± 4,02	-3,81	47,66	2,03	4,27	95,31 ± 4,17	-4,69
		375	348,34	13,65	3,92	92,89 ± 3,88	-7,11	346,09	17,72	5,12	92,29 ± 4,71	-7,71
71	<i>Tricyclazole</i>	1,25	1,10	0,07	6,03	87,83 ± 6,53	-12,17	1,25	0,18	14,74	100,09 ± 9,99	0,09
		5	5,46	0,46	8,39	109,28 ± 8,09	9,28	4,76	0,54	11,32	95,15 ± 10,43	-4,85
		50	47,26	1,98	4,18	94,52 ± 4,06	-5,48	45,64	2,42	5,30	91,27 ± 4,87	-8,73
		375	343,76	30,25	8,80	91,67 ± 3,97	-8,33	351,75	37,32	10,61	93,80 ± 4,17	-6,20

Α/Α	Ονομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
72	<i>Trifloxystrobin</i>	1,25	1,23	0,06	5,26	98,71 ± 5,11	-1,29	1,27	0,08	6,16	101,92 ± 5,27	1,92
		5	3,32	0,13	3,77	66,32 ± 3,03	-33,68	5,04	0,71	7,08	76,34 ± 3,62	0,70
		50	46,76	1,44	3,09	93,51 ± 2,47	-6,49	47,61	2,21	4,65	95,21 ± 2,94	-4,79
		375	365,33	25,17	6,89	97,42 ± 6,51	-2,58	351,90	31,53	8,96	93,84 ± 7,04	-6,16



Σχήμα 5.3: Η ορθότητα εκφρασμένη ως απόλυτη ανάκτηση ($Rec\% \pm RSD\%$) υπό συνθήκες εργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας για τους 72 α.σ. σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ορού αίματος.



Σχήμα 5.4: Η ποιότητα - αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τοπική απόκλιση (RSD%) για τους 72 α.σ. σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ορού αίματος.

Πίνακας 5.4: Στατιστικά δεδομένα ορθότητας και ποιότητας για 12 από το σύνολο των 72 α.σ. σε τέσσερα (4) επίπεδα συγκέντρωσεων υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας σε υπόστρωμα ούρων.

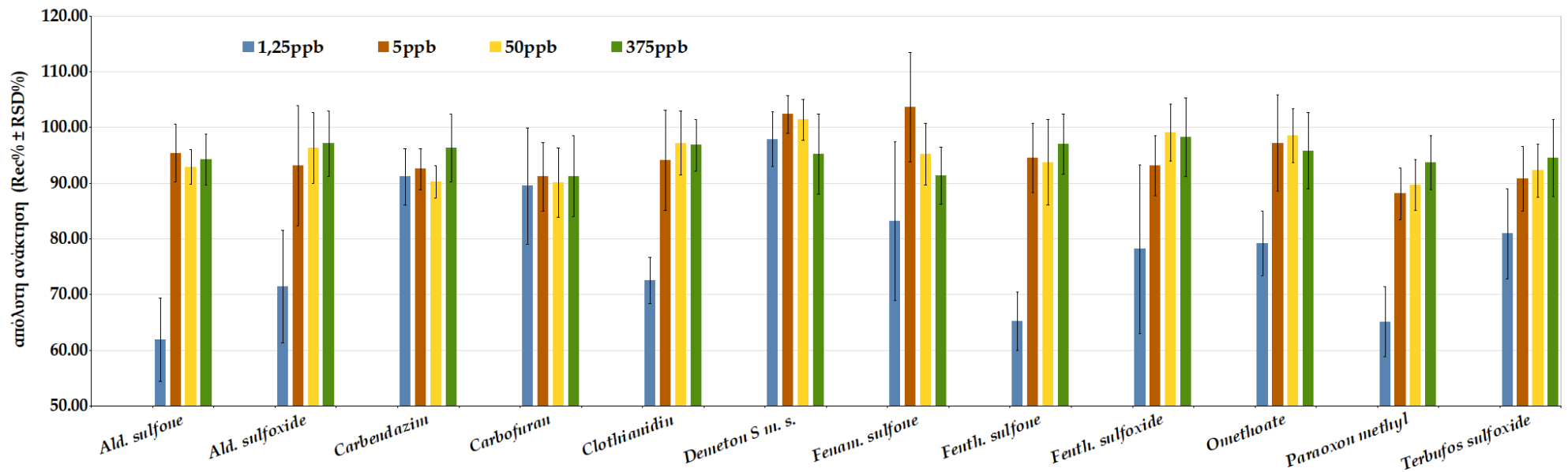
Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%) ³⁵	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ ³⁶ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
1	<i>Aldicarb sulfone</i>	1,25	0,84	0,08	9,56	67,30 ± 9,32	-32,70	0,77	0,10	12,40	61,91 ± 12,10	-38,09
		5	4,79	0,10	2,17	95,80 ± 2,15	-4,20	4,77	0,28	5,91	95,40 ± 5,42	-4,60
		50	47,08	0,97	2,06	94,16 ± 2,14	-5,84	46,45	2,44	5,26	92,90 ± 3,34	-7,10
		375	367,16	10,57	2,88	97,91 ± 2,92	-2,09	353,48	16,86	4,77	94,26 ± 4,89	-5,74
2	<i>Aldicarb sulfoxide</i>	1,25	0,79	0,10	13,29	62,91 ± 13,36	-37,09	0,89	0,12	13,96	71,46 ± 14,11	-28,54
		5	4,86	0,44	9,04	97,28 ± 9,09	-2,72	4,66	0,52	11,10	93,12 ± 11,59	-6,88
		50	48,11	2,34	4,87	96,21 ± 4,59	-3,79	48,17	3,15	6,54	96,33 ± 6,58	-3,67
		375	372,79	10,36	2,78	99,41 ± 2,64	-0,59	364,28	21,93	6,02	97,14 ± 6,04	-2,86
3	<i>Carbendazim</i>	1,25	1,08	0,03	3,04	86,71 ± 3,09	-13,29	1,14	0,06	5,52	91,17 ± 5,49	-8,83
		5	4,67	0,16	3,50	93,40 ± 3,69	-6,60	4,63	0,18	3,81	92,56 ± 3,99	-7,44
		50	46,33	1,09	2,35	92,66 ± 2,63	-7,34	45,14	1,42	3,14	90,28 ± 3,19	-9,72
		375	359,44	15,56	4,33	95,85 ± 4,51	-4,15	361,13	22,25	6,16	96,30 ± 6,29	-3,70
4	<i>Carbofuran</i>	1,25	1,04	0,10	10,09	83,24 ± 10,17	-16,76	1,12	0,13	11,28	89,49 ± 11,60	-10,51
		5	4,36	0,26	5,86	87,10 ± 5,62	-12,90	4,56	0,31	6,77	91,15 ± 6,74	-8,85
		50	44,52	2,81	6,31	89,04 ± 6,35	-10,96	45,05	2,77	6,58	90,10 ± 6,89	-9,90
		375	340,39	18,01	5,29	90,77 ± 5,41	-9,23	342,19	27,10	7,92	91,25 ± 7,96	-8,75
5	<i>Clothianidin</i>	1,25	0,84	0,04	5,22	67,12 ± 5,61	-32,88	0,91	0,05	5,70	72,55 ± 5,74	-27,45
		5	4,06	0,29	7,10	81,21 ± 7,21	-18,79	4,71	0,45	9,58	94,10 ± 9,52	-5,90
		50	48,13	2,39	4,96	96,25 ± 5,25	-3,75	48,60	2,75	5,66	97,20 ± 5,92	-2,80
		375	360,53	15,39	4,27	96,14 ± 4,38	-3,86	360,30	17,80	4,90	96,88 ± 4,78	-3,12

35 Αφορά στην εκτίμηση της τιμής στόχου με βάση το μ. (βλ. §)

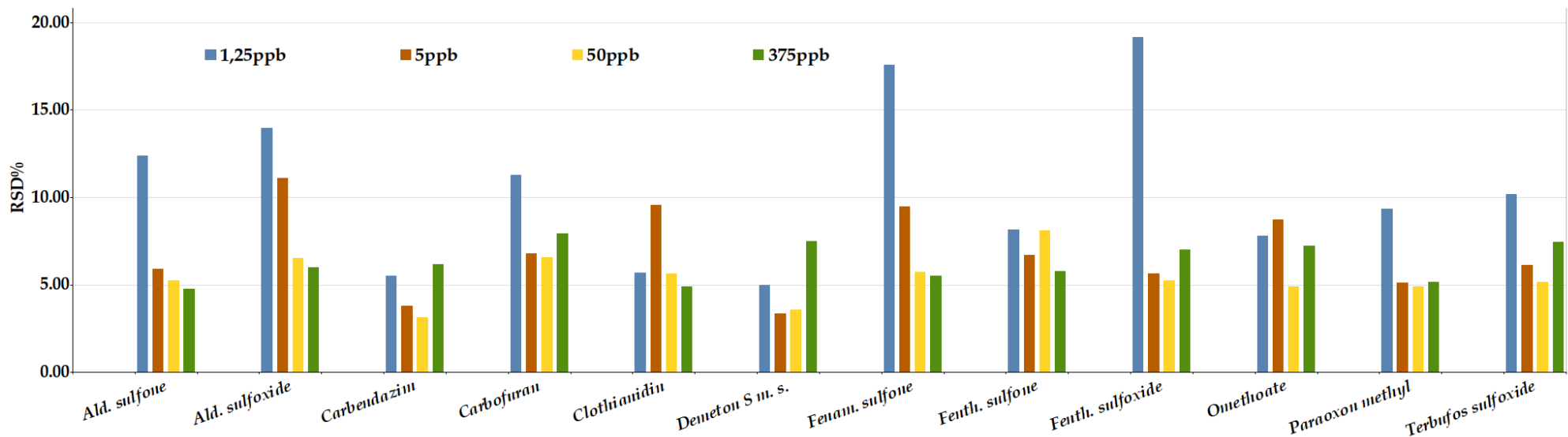
36 μ: η μέση τιμή των μετρήσεων

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
6	<i>Demeton-S-methyl sulfoxide</i>	1,25	1,14	0,05	4,10	90,87 ± 3,89	-9,13	1,22	0,06	4,97	97,88 ± 5,02	-2,12
		5	4,78	0,12	2,52	95,66 ± 2,56	-4,34	5,12	0,17	3,36	102,36 ± 3,33	2,36
		50	47,86	1,47	3,07	95,71 ± 3,16	-4,29	50,70	1,82	3,59	101,40 ± 3,61	1,40
		375	345,60	21,12	6,11	92,16 ± 6,31	-7,84	357,19	26,72	7,48	95,25 ± 7,59	-4,75
7	<i>Fenamiphos sulfone</i>	1,25	1,02	0,17	16,27	81,32 ± 16,33	-18,68	1,04	0,18	17,56	83,16 ± 17,15	-16,84
		5	5,21	0,37	7,04	104,10 ± 7,19	4,10	5,18	0,49	9,49	103,62 ± 9,47	3,62
		50	48,05	2,56	5,33	96,10 ± 5,04	-3,90	47,61	2,72	5,72	95,22 ± 5,80	-4,78
		375	359,40	17,18	4,78	95,84 ± 4,60	-4,16	342,64	18,95	5,53	91,37 ± 5,62	-8,63
8	<i>Fenthion sulfone</i>	1,25	0,84	0,05	6,32	67,11 ± 6,52	-32,89	0,81	0,07	8,15	65,18 ± 8,03	-34,82
		5	5,02	0,23	4,51	100,37 ± 4,46	0,37	4,73	0,32	6,70	94,55 ± 6,60	-5,45
		50	47,15	3,39	7,19	94,30 ± 7,04	-5,70	46,88	3,79	8,09	93,76 ± 8,18	-6,24
		375	345,98	11,38	3,29	92,26 ± 3,19	-7,74	363,86	20,99	5,77	97,03 ± 5,60	-2,97
9	<i>Fenthion sulfoxide</i>	1,25	0,79	0,14	17,46	63,43 ± 17,41	-36,57	0,98	0,19	19,16	78,16 ± 19,36	-21,84
		5	4,55	0,23	5,12	91,00 ± 5,25	-9,00	4,66	0,26	5,63	93,20 ± 5,78	-6,80
		50	47,57	2,23	4,69	95,13 ± 4,55	-4,87	49,52	2,61	5,27	99,04 ± 5,16	-0,96
		375	350,78	14,49	4,13	93,54 ± 4,19	-6,46	368,70	25,85	7,01	98,32 ± 7,17	-1,68
10	<i>Omethoate</i>	1,25	0,96	0,06	6,33	76,92 ± 6,23	-23,08	0,99	0,08	7,82	79,18 ± 7,29	-20,82
		5	5,17	0,38	7,28	103,45 ± 7,39	3,45	4,86	0,42	8,73	97,23 ± 8,82	-2,77
		50	49,06	1,77	3,61	98,11 ± 3,79	-1,89	49,26	2,41	4,90	98,52 ± 4,95	-1,48
		375	357,00	13,85	3,88	95,20 ± 3,93	-4,80	359,40	25,95	7,22	95,84 ± 7,11	-4,16
11	<i>Paraoxon-methyl</i>	1,25	0,78	0,04	5,47	62,59 ± 5,56	-37,41	0,81	0,08	9,34	65,11 ± 9,69	-34,89
		5	4,24	0,17	3,96	84,70 ± 4,26	-15,30	4,41	0,23	5,13	88,12 ± 5,21	-11,88
		50	45,26	1,75	3,87	90,52 ± 4,21	-9,48	44,85	2,20	4,91	89,70 ± 5,02	-10,30
		375	341,70	8,75	2,56	91,12 ± 2,74	-8,88	351,23	18,19	5,18	93,66 ± 5,15	-6,34

Α/Α	Όνομασία μορίου	Τιμή στόχος (ppb)	Μετρήσεις υπό συνθήκες επαναληψιμότητας (n=5)					Μετρήσεις υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (n=6)				
			μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)	μετρηθείσα συγκέντρωση (ppb)			Ορθότητα ως απόλυτη ανάκτηση (Rec% ± RSD%)	Συστηματικό σφάλμα, bias (%)
			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%			μ (ppb)	SD (ppb)	RSD%		
12	<i>Terbufos sulfoxide</i>	1,25	0,99	0,08	7,61	79,51 ± 6,91	-20,49	1,01	0,10	10,18	80,96 ± 9,98	-19,04
		5	4,29	0,21	4,89	85,77 ± 4,70	-14,23	4,54	0,28	6,12	90,77 ± 6,37	-9,23
		50	45,16	1,01	2,24	90,32 ± 2,29	-9,68	46,13	2,39	5,18	92,26 ± 5,22	-7,74
		375	356,40	18,18	5,10	95,04 ± 5,92	-4,96	354,53	26,34	7,43	94,54 ± 7,28	-5,46



Σχήμα 5.5: Η ορθότητα εκφρασμένη ως απόλυτη ανάκτηση ($Rec\% \pm RSD\%$) υπό συνθήκες εργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας για 12 από τους 72 α.σ. σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ούρων.



Σχήμα 5.6: Η αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση ($RSD\%$) για 12 από τους 72 α.σ. σε 4 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ I & ΠΕΑ I (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ούρων.

Πίνακας 5.5: Η ένταση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού (ME) για τους 72 α.σ. σε τρία (3) επίπεδα συγκεντρώσεων σε υπόστρωμα ορού αίματος.

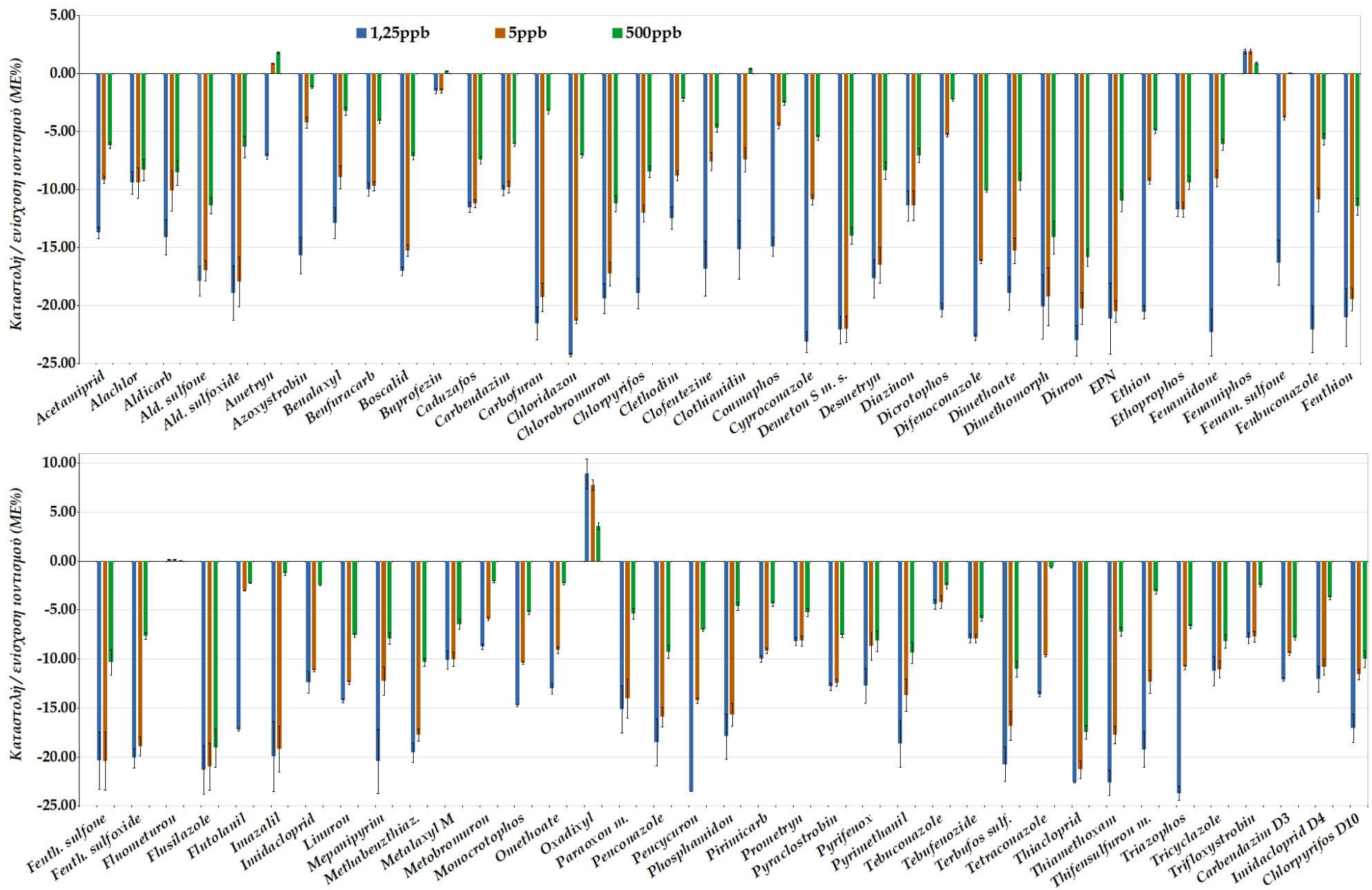
Α/Α	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος και σχετική τοπική απόκλιση (n = 6)					
			1,25ppb		5ppb		500ppb	
			\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)
1	<i>Acetamiprid</i>	νεονικοτινοειδές	-13,75	3,60	-9,17	3,47	-6,21	4,21
2	<i>Alachlor</i>	οργανοχλωρίνη / χλωροακετανιλίδιο	-9,45	10,02	-9,45	14,02	-8,32	11,24
3	<i>Aldicarb</i>	καρβαμιδικό	-14,12	10,73	-10,12	17,06	-8,57	12,41
4	<i>Aldicarb sulfone</i>	καρβαμιδικό	-17,90	7,18	-17,01	5,42	-11,42	6,16
5	<i>Aldicarb sulfoxide</i>	μη ταξινομημένο	-18,95	12,38	-17,96	12,05	-6,36	14,41
6	<i>Ametryn</i>	τριαζίνη (μεθυλθειο-1,3,5-τριαζίνη)	-7,16	3,47	0,84	3,16	1,77	5,18
7	<i>Azoxystrobin</i>	στρομπλουρίνη	-15,70	10,12	-4,25	11,14	-1,21	8,49
8	<i>Benalaxyl</i>	ακυλαμινοξύ (φαινυλαμίδιο - ακυλαλανίνη)	-12,91	10,49	-8,99	11,01	-3,26	10,33
9	<i>Benfuracarb</i>	καρβαμιδικό	-10,02	5,93	-9,74	4,25	-4,12	4,17
10	<i>Boscalid</i>	πυριδινο-καρβοξαμίδιο	-17,07	2,11	-15,29	3,26	-7,14	4,22
11	<i>Buprofezin</i>	μη ταξινομημένο	-1,53	15,21	-1,53	10,21	0,21	11,78
12	<i>Caduzafos</i>	οργανοφωσφορικό	-11,56	3,80	-11,24	3,06	-7,46	4,25
13	<i>Carbendazim</i>	καρβαμιδικό με βενζιμιδαζολική ομάδα	-10,09	4,45	-9,81	5,07	-6,13	2,29
14	<i>Carbofuran</i>	καρβαμιδικό	-21,56	6,68	-19,32	6,30	-3,28	5,94
15	<i>Chloridazon</i>	πυραδοζιόννη	-24,29	0,61	-21,35	1,02	-7,10	2,13
16	<i>Chlorobromuron</i>	ουρία	-19,41	6,60	-17,30	5,98	-11,22	6,28
17	<i>Chlorpyrifos-ethyl</i>	οργανοφωσφορικό	-18,98	6,95	-12,07	6,08	-8,47	5,89

Α/Α	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος και σχετική τοπική απόκλιση (n = 6)					
			1,25ppb		5ppb		500ppb	
			\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)
18	<i>Clethodim</i>	κυκλοεξανοδιόνη	-12,49	7,82	-8,83	5,07	-2,24	6,01
19	<i>Clofentezine</i>	τετραζίνη	-16,85	13,88	-7,62	10,22	-4,70	7,55
20	<i>Clothianidin</i>	νεονικοτινοειδές	-15,20	16,60	-7,46	14,20	0,41	12,20
21	<i>Coumaphos</i>	οργανοφωσφορικό	-14,97	5,37	-4,52	5,66	-2,57	5,80
22	<i>Cyproconazole</i>	τριαζόλη	-23,17	3,81	-10,91	4,14	-5,55	3,67
23	<i>Demeton-S-methyl sulfoxide</i>	οργανοφωσφορικό	-22,12	5,43	-22,06	5,21	-14,01	5,14
24	<i>Desmetryn</i>	τριαζίνη (μεθυλθιο-1,3,5-τριαζίνη)	-17,71	9,35	-16,54	9,36	-8,40	9,09
25	<i>Diazinon</i>	οργανοφωσφορικό	-11,43	11,44	-11,43	11,17	-7,08	8,37
26	<i>Dicrotophos</i>	οργανοφωσφορικό	-20,42	2,89	-5,34	2,83	-2,28	4,21
27	<i>Difenoconazole</i>	τριαζόλη / διοξολάνη	-22,76	1,18	-16,22	1,14	-10,13	0,93
28	<i>Dimethoate</i>	οργανοφωσφορικό	-18,98	7,47	-15,31	7,09	-9,29	8,07
29	<i>Dimethomorph</i>	μορφολίνη	-20,11	13,94	-19,24	12,94	-14,15	10,14
30	<i>Diuron</i>	φανυλουρία	-23,06	5,63	-20,28	6,77	-15,87	4,79
31	<i>EPN</i>	οργανοφωσφορικό	-21,16	14,42	-20,52	4,50	-11,00	8,22
32	<i>Ethion</i>	οργανοφωσφορικό	-20,59	2,96	-9,29	2,90	-4,98	3,61
33	<i>Ethoprophos</i>	οργανοφωσφορικό	-11,73	5,32	-11,73	5,46	-9,45	6,15
34	<i>Fenamidone</i>	ιμιδαζόλη	-22,36	8,89	-9,06	8,05	-6,12	8,06
35	<i>Fenamiphos</i>	οργανοφωσφορικό	1,88	12,04	1,88	10,31	0,87	10,34

Α/Α	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος και σχετική τοπική απόκλιση (n = 6)					
			1,25ppb		5ppb		500ppb	
			\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)
36	<i>Fenamiphos sulfone</i>	μη ταξινομημένο	-16,32	12,04	-3,83	4,64	0,04	5,66
37	<i>Fenbuconazole</i>	τριαζόλη	-22,08	9,11	-10,91	9,11	-5,68	8,96
38	<i>Fenthion</i>	οργανοφωσφορικό	-21,07	11,88	-19,48	5,00	-11,48	6,31
39	<i>Fenthion sulfone</i>	μη ταξινομημένο	-20,39	14,34	-20,45	14,34	-10,32	12,77
40	<i>Fenthion sulfoxide</i>	οργανοφωσφορικό	-20,13	5,07	-18,94	5,07	-7,65	4,62
41	<i>Fluometuron</i>	φαινιλουρία	0,15	12,67	0,16	10,53	0,07	9,48
42	<i>Flusilazole</i>	τριαζόλη	-21,34	11,46	-21,01	11,40	-19,10	10,30
43	<i>Flutolanil</i>	βενζαμιδιο	-17,24	0,82	-3,01	0,89	-2,26	1,21
44	<i>Imazalil</i>	ιμιδαζόλη / διχλωροβενζόλιο	-19,95	18,03	-19,20	12,03	-1,29	14,02
45	<i>Imidacloprid</i>	νεονικοτινοειδές	-12,41	8,97	-11,14	1,26	-2,44	3,53
46	<i>Linuron</i>	φαινιλουρία	-14,26	1,26	-12,43	1,26	-7,60	2,99
47	<i>Mepanipyrim</i>	ανιλινοπυριμιδίνη	-20,47	16,01	-12,24	11,87	-7,91	7,49
48	<i>Methabenzthiazuron</i>	βενζοθειαζόλη / ουρία	-19,58	4,98	-17,74	3,54	-10,33	3,93
49	<i>Metalaxyl-M</i>	φαινυλαμιδιο	-10,11	9,06	-10,05	7,14	-6,46	8,07
50	<i>Metobromuron</i>	φαινιλουρία	-8,76	3,05	-5,91	3,09	-2,12	4,84
51	<i>Monocrotophos</i>	οργανοφωσφορικό	-14,76	0,88	-10,40	1,41	-5,26	3,57
52	<i>Omethoate</i>	οργανοφωσφορικό	-13,03	3,98	-9,11	3,98	-2,28	6,11
53	<i>Oxadixyl</i>	Φαινυλαμιδιο / οξαζολιδινόνη	8,91	17,10	7,72	7,12	3,57	9,61

Α/Α	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος και σχετική τοπική απόκλιση (n = 6)					
			1,25ppb		5ppb		500ppb	
			\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)
54	<i>Paraoxon-methyl</i>	οξόνιο (του <i>Parathion-methyl</i>)	-15,14	16,05	-14,06	14,07	-5,39	10,34
55	<i>Penconazole</i>	τριαζόλη	-18,51	13,08	-15,93	6,28	-9,28	7,00
56	<i>Pencycuron</i>	φανυλουρία	-23,53	0,05	-14,25	1,94	-7,01	2,03
57	<i>Phosphamidon</i>	οργανοφωσφορικό	-17,93	12,97	-15,71	7,45	-4,64	8,92
58	<i>Pirimicarb</i>	καρβαμιδικό	-9,98	3,29	-9,17	3,13	-4,38	5,12
59	<i>Prometryn</i>	τριαζίνη (μεθυλθιο-1,3,5-τριαζίνη)	-8,21	5,29	-8,14	6,33	-5,26	7,78
60	<i>Pyraclostrobin</i>	στρομπλουρίνη	-12,84	3,04	-12,44	3,08	-7,61	2,40
61	<i>PyrifenoX</i>	πυριδίνη	-12,73	14,08	-8,70	16,08	-8,14	13,09
62	<i>Pyrimethanil</i>	ανιλινοπυριμιδίνη	-18,65	12,96	-13,71	12,15	-9,37	11,47
63	<i>Tebuconazole</i>	τριαζόλη /δ-ταγής αλκοόλη	-4,42	11,26	-4,20	15,26	-2,52	13,01
64	<i>Tebufenozide</i>	διακυλδραζίνη	-7,92	5,68	-7,92	5,77	-5,88	4,95
65	<i>Terbufos sulfoxide</i>	μη ταξινομημένο	-20,77	8,43	-16,84	8,91	-11,04	7,62
66	<i>Tetraconazole</i>	τριαζόλη	-13,61	1,69	-9,68	1,04	-0,67	3,85
67	<i>Thiacloprid</i>	νεονικοτινοειδές	-22,59	0,37	-21,29	4,44	-17,47	3,98
68	<i>Thiamethoxam</i>	νεονικοτινοειδές	-22,62	5,78	-17,76	5,19	-7,21	6,21
69	<i>Thifensulfuron-methyl</i>	σουλφονουρία	-19,26	9,44	-12,35	9,37	-3,12	8,61
70	<i>Triazophos</i>	οργανοφωσφορικό	-23,71	2,92	-10,84	2,16	-6,69	3,27
71	<i>Tricyclazole</i>	τριαζολοβενζοθειαζόλη	-11,25	13,38	-11,08	7,70	-8,22	8,59

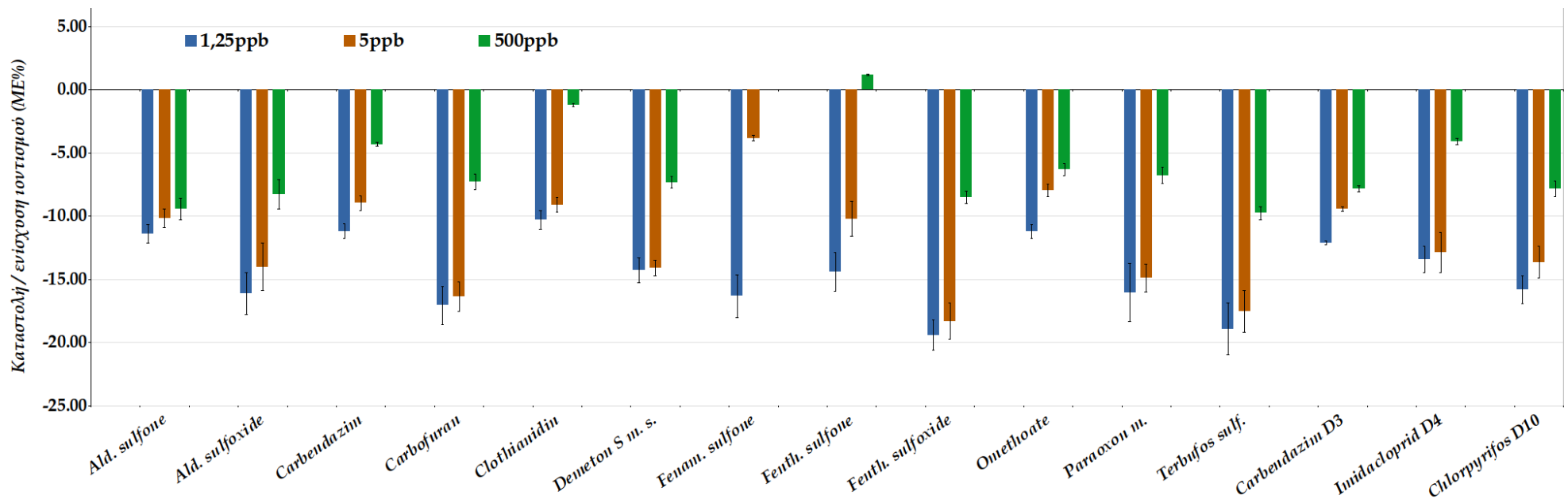
Α/Α	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος και σχετική τοπική απόκλιση (n = 6)					
			1,25ppb		5ppb		500ppb	
			\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)
72	<i>Trifloxystrobin</i>	στρομπλουρίνη	-7,86	7,14	-7,71	6,93	-2,48	7,16
ISs	<i>Carbendazim D3</i>		-12,11	1,43	-9,45	2,01	-7,83	3,07
	<i>Imidacloprid D4</i>		-12,05	10,73	-10,80	7,61	-3,75	4,26
	<i>Chlorpyrifos D10</i>		-17,07	8,47	-11,56	4,64	-9,97	9,04



Σχήμα 5.7: Η ένταση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού για τους 72 α.σ. σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ Ι & ΠΕΑ Ι (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ορού αίματος.

Πίνακας 5.6: Η ένταση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού (ΜΕ) για 12 από τους 72 α.σ. σε τρία (3) επίπεδα συγκεντρώσεων σε υπόστρωμα ούρων.

Α/Α	Όνομασία μορίου	Ομάδα μορίου	Φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος και σχετική τοπική απόκλιση (n = 6)					
			1,25ppb		5ppb		500ppb	
			\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)	\overline{ME} (%)	RSD(%)
1	<i>Aldicarb sulfone</i>	καρβαμιδικό	-11,41	6,51	-10,18	7,12	-9,43	9,01
2	<i>Aldicarb sulfoxide</i>	μη ταξινομημένο	-16,11	10,33	-14,02	13,25	-8,27	14,09
3	<i>Carbendazim</i>	καρβαμιδικό με βενζιμιδαζολική ομάδα	-11,19	5,10	-8,96	6,38	-4,31	3,79
4	<i>Carbofuran</i>	καρβαμιδικό	-17,06	8,90	-16,36	7,08	-7,28	8,62
5	<i>Clothianidin</i>	νεονικοτινοειδές	-10,29	7,30	-9,12	6,36	-1,20	10,90
6	<i>Demeton-S-methyl sulfoxide</i>	οργανοφωσφορικό	-14,28	7,06	-14,10	4,15	-7,33	6,39
7	<i>Dimethoate</i>	οργανοφωσφορικό	-19,14	6,17	-18,48	9,11	-11,25	6,27
8	<i>Ethion</i>	οργανοφωσφορικό	-18,44	6,61	-15,93	5,91	-9,43	6,44
9	<i>Fenamiphos sulfone</i>	μη ταξινομημένο	-16,32	10,29	-3,83	5,18	0,04	6,48
10	<i>Fenthion sulfone</i>	μη ταξινομημένο	-14,39	10,71	-10,20	13,64	1,18	5,88
11	<i>Fenthion sulfoxide</i>	οργανοφωσφορικό	-19,43	6,16	-18,31	7,85	-8,52	5,92
12	<i>Omethoate</i>	οργανοφωσφορικό	-11,24	4,92	-7,94	6,20	-6,28	7,81
13	<i>Paraoxon-methyl</i>	οξόνιο (του <i>Parathion-methyl</i>)	-16,04	14,23	-14,90	7,52	-6,77	9,76
14	<i>Terbufos sulfoxide</i>	μη ταξινομημένο	-18,93	10,89	-17,52	9,47	-9,76	5,15
ISs	<i>Carbendazim D3</i>		-12,11	1,43	-9,45	2,01	-7,83	3,07
	<i>Imidacloprid D4</i>		-13,41	7,66	-12,86	12,34	-4,10	6,52
	<i>Chlorpyrifos D10</i>		-15,82	7,12	-13,66	9,24	-7,85	8,02



Σχήμα 5.8: Η ένταση του φαινομένου καταστολής/ενίσχυσης ιοντισμού για 12 από τους 72 α.σ. σε 3 επίπεδα συγκέντρωσης μετά την εφαρμογή των ΠΠΔ Ι & ΠΕΑ Ι (βλ. §4.5.4) σε υπόστρωμα ούρων.

Κεφάλαιο 6 Συμπεράσματα

Στις μέρες μας, η τοξικολογία με την κλασική της θεώρηση ως επιστήμη που μελετά τις δυσμενείς επιδράσεις των τοξικών παραγόντων (χημικών, φυσικών και βιολογικών) στους έμβιους οργανισμούς, έχει αποκτήσει μία πολυδιάστατη υπόσταση. Πραγματώνεται δε μέσα από σύγχρονες μεθόδους και εφαρμογές, που προσφέρει η τεχνολογική ανάπτυξη του 21ου αιώνα. Ωστόσο, η δυνατότητα της συνδυαστικής αξιοποίησης των διαθέσιμων επιστημονικών δεδομένων είναι καθοριστικής σημασίας, προκειμένου να εξάγονται βάσιμα και συνεπή συμπεράσματα, αναγκαία για την κατά το δυνατό πιο ρεαλιστική και πληρέστερη εκτίμηση επικινδυνότητας (*Risk Assessment*).

Σημαντική πρόκληση ωστόσο για τους σύγχρονους τοξικολόγους αποτελεί η έκθεση των ανθρώπων σε μείγματα ξеноβιοτικών χημικών ουσιών, που συμβαίνει μέσω του περιβάλλοντος, των καταναλωτικών προϊόντων, της τροφής, του νερού ανθρώπινης κατανάλωσης και στην εργασία. Η ταυτόχρονη παρουσία πολλών τέτοιων χημικών παραγόντων στον ανθρώπινο οργανισμό δεν αξιολογείται με απλή άθροιση των δυσμενών επιπτώσεών τους, αλλά μπορεί να οδηγήσει σε μία σύνθετη και δύσκολα προσδιοριζόμενη τοξικολογική συνάρτηση - απόκριση. Κρίσιμο στοιχείο στην κατανόηση των σύνθετων τοξικολογικών φαινομένων αποτελεί η ποσότητα της κάθε ουσίας, που εν τέλει απορροφήθηκε από τον οργανισμό. Η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση (*Human Biomonitoring*) επιτρέπει την αξιολόγηση της εσωτερικής αυτής δόσης, προσδιορίζοντας είτε το μητρικό μόριο, είτε κάποιο μεταβολίτη του, είτε κάποιο σχετιζόμενο βιοδείκτη έκθεσης, ευαισθησίας ή επίδρασης (βλ. 1.4) σε κάποιο βιολογικό υπόστρωμα (βιολογικά υγρά, όπως αίμα, ούρα και ιστούς).

Μαζί με τις κλασικές *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* και τις διαρκώς εξελισσόμενες *in silico* μεθόδους αξιολόγησης της τοξικότητας, η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση συμβάλλει σημαντικά στην οχύρωση και τη διαρκή ενδυνάμωση των κλάδων της τοξικολογία της δημόσιας και της επαγγελματικής υγείας, τροφοδοτώντας τους με καιρίες πληροφορίες ως προς το χωρικό και χρονικό *in vitro* τοξικολογικό προφίλ του μελετούμενου πληθυσμού, την ρεαλιστική δηλαδή ποιοτική και ποσοτική κατάσταση των διαφόρων τοξικών παραγόντων μέσα στο ανθρώπινο οργανισμό, την κατανομή τους στους διάφορους ιστούς, τον μεταβολισμό τους, τη βιοσυσώρευση και την απέκκρισή τους (*Absorption, Distribution, Metabolism & Excretion, ADME*).

Οι πληροφορίες που προσφέρει η ανάλυση των δεδομένων βιοπαρακολούθησης είναι πολυδιάστατες. Εξετάζοντας τα αίτια που προκάλεσαν την εμφάνιση του εκάστοτε τοξικού ξеноβιοτικού παράγοντα στο υπό εξέταση βιολογικό υγρό ή ιστό, οι πληροφορίες αυτές μπορούν να συμβάλλουν στην εκτίμηση της έκθεσης στον παράγοντα αυτό. Από την άλλη μεριά, εξετάζοντας τις συνέπειες της παρουσίας του παράγοντα σε κάποιον οργανισμό, παρέχουν μία συσχέτιση με τις δυνητικά εμφανιζόμενες δυσμενείς επιδράσεις. Η προσέγγιση αυτή μπορεί εν τέλει να συμβάλλει σημαντικά σε μία κατά το δυνατό βελτιστοποιημένη και πληρέστερη διασύνδεση αιτίου - αιτιατού, έκθεσης - επιπτώσεων.

Στο πλαίσιο αυτό, η ανθρώπινη βιοπαρακολούθηση αποκτά ολοένα και περισσότερη βαρύτητα στην εκτίμηση της επικινδυνότητας, μέσω της εφαρμογής εθνικών και διεθνών προγραμμάτων. Στην Ευρώπη σήμερα, σε ενωσιακό επίπεδο, βρίσκεται σε εξέλιξη το έργο “Ευρωπαϊκή Πρωτοβουλία Βιολογικής Παρακολούθησης του Ανθρώπου ή Ανθρώπινης Βιοπαρακολούθησης” (“*European Human Biomonitoring Initiative – HBM4EU*”, [5]), έχοντας μεταξύ άλλων σαν βασικά αντικείμενα την παραγωγή δεδομένων εσωτερικών δόσεων και τη διασύνδεσή τους με δεδομένα έκθεσης και σχετικές οδούς έκθεσης, την ανάπτυξη νέων μεθόδων εκτίμησης της εσωτερικής έκθεσης σε ξеноβιοτικούς παράγοντες από το περιβάλλον και το χώρο εργασίας και τον καθορισμό αιτιωδών σχέσεων μεταξύ εσωτερικής έκθεσης και επιπτώσεων στην ανθρώπινη υγεία, την παροχή στους υπεύθυνους χάραξης πολιτικής και στο ευρύ κοινό, γνώσης βασισμένη στην επιστήμη σχετικά με τους κινδύνους που ενέχει για την υγεία η έκθεση σε διάφορους χημικούς παράγοντες και τη βελτίωση της εκτίμησης χημικής επικινδυνότητας (*Chemical Risk Assessment*) στην *Ευρωπαϊκή Ένωση*, μέσω της αποτελεσματικής χρήσης των δεδομένων της ανθρώπινης βιοπαρακολούθησης. Η υλοποίηση τέτοιων προγραμμάτων και η εξαγωγή επιστημονικών συμπερασμάτων συμβάλλουν σημαντικά στην βαθύτερη και πληρέστερη κατανόηση της δαιδαλώδους σχέσης μεταξύ έκθεσης και δυσμενών επιπτώσεων και αποτελούν αρωγό για την προάσπιση της δημόσιας υγείας και του περιβάλλοντος.

Καίριο ρόλο στην ορθή εφαρμογή της βιοπαρακολούθησης παίζει η αναλυτική τοξικολογία, μέσω του ποιοτικού και ποσοτικού προσδιορισμού πολυάριθμων αναλυτών στόχων τοξικολογικού ενδιαφέροντος σε βιολογικά υγρά και ιστούς. Στο πεδίο ενδιαφέροντος της αναλυτικής τοξικολογίας εντάσσονται και τα πολυάριθμα φυτοπροστατευτικά προϊόντα (φ.π.), καθώς ανάλογα με τη χημική τους δομή ενέχουν ποικίλους κινδύνους για την ανθρώπινη υγεία, που εκτίνεται με ποικίλες εντάσεις σε όλη την έκταση του εύρους μεταξύ οξείας και χρόνιας τοξικότητας. Τούτο βέβαια βρίσκεται πάντοτε σε άμεση συνάρτηση με τη δόση στην οποία εκτίθεται το υποκείμενο, καθώς αυτή αποτελεί τον βασικό παράγοντα εμφάνισης ή μη τοξικότητας μέσα από τη σχέση δόσης – απόκρισης. Τη συλλογιστική αυτή διατύπωσε εδώ και αιώνες ο γερμανοελβετός ιατρός και αλχημιστής *Θεόφραστος Παράκελσος* (*Philippus Aureolus Theophrastus Bombastus von Hohenheim*), πατέρας της σύγχρονης τοξικολογίας, στη ρήση του “*Sola dosis facit venenum*”³⁷. [164],[165]

Η έκθεση του γενικού πληθυσμού σε διάφορα φ.π. συμβαίνει κυρίως μέσω του πόσιμου νερού και των τροφίμων γεωργικής προέλευσης, ενώ τα επίπεδα υπολειμματικότητάς τους καθορίζονται και ελέγχονται από σαφές νομοθετικό πλαίσιο (βλ. §1.6.4). Σε ειδικές ομάδες, όπως σε εργαζόμενους στην παραγωγή και την εφαρμογή των φ.π. στο πεδίο, η έκθεση μπορεί να συμβεί και διαδερμικά ή δια της εισπνοής. Κατά συνέπεια, το ενδιαφέρον των αναλυτικών τοξικολόγων εστιάζεται στην ανάπτυξη και την εφαρμογή πολυδύναμων μεθόδων, ικανών να ανιχνεύουν και να ποσοτικοποιούν εντός μίας κοινής και ταυτόχρονης πειραματικής εφαρμογής περισσότερους αναλύτες στόχους με την

37 “*Alle Dinge sind Gift und nichts ist ohne Gift. Allein die Dosis macht, dass ein Ding kein Gift ist.*”, *Paracelsus dritte defensio*, 1538. [164]

υψηλότερη δυνατή ακρίβεια. Έτσι περιορίζεται τόσο ο απαιτούμενος χρόνος ανάλυσης, όσο και η αναγκαία ποσότητα εργαστηριακού δείγματος, η οποία σε πολλές περιπτώσεις τοξικολογικού ενδιαφέροντος ενδέχεται να είναι περιορισμένη (αίμα, γαστρικά υγρά, ιστοί κ.ά.).

Κομβικό σημείο για την εφαρμογή μίας τέτοιας πολυδύναμης μεθόδου αποτελεί η επικύρωση της, καθώς συνιστά σημαντική απαίτηση σε όλες τις εφαρμογές της αναλυτικής χημείας. Ως διαδικασία η επικύρωση μιας βιοαναλυτικής μεθόδου στοχεύει στην τεκμηρίωση της καταλληλότητάς της για τον σκοπό που αναπτύχθηκε και προορίζεται (*“fit for its intended purpose”*). Με σημείο αναφοράς διεθνή αναγνωρισμένα πρότυπα (βλ. §2.3), η επικύρωση προσφέρει έναν κοινό κώδικα επικοινωνίας μεταξύ των αναλυτικών τοξικολόγων και των εργαστηρίων όπου εφαρμόζεται, αναφορικά με τη βασική συλλογιστική που πρέπει να ακολουθηθεί, προκειμένου να εξεταστεί η καταλληλότητα αυτή.

Στην αναλυτική τοξικολογία δύο βασικά στάδια απαρτίζουν την πειραματική διαδικασία. Το πρώτο, αφορά στην προκατεργασία του δείγματος, ενώ το δεύτερο στην ενόργανη ανάλυσή του. Τα σύνθετα υποστρώματα, όπως το αίμα (ολικό, ορός ή πλάσμα) και τα ούρα χρίζουν εντατικής και μεθοδευμένης προκατεργασίας, προκειμένου οι αναλύτες στόχοι να εκχυλιστούν και να μεταφερθούν σε ένα μικρό συμπύκνωμα καθαρού διαλύτη, κατάλληλο για την έγχυση του στα αναλυτικά όργανα, όπου λαμβάνει χώρα ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών στόχων. Η ενόργανη ανάλυση συνίσταται συνήθως από διάφορες τεχνικές, όπως η φασματομετρία μάζας επαγωγικά συζευγμένου πλάσματος (*Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, ICP-MS*), συζευγμένες τεχνικές διαχωρισμού, π.χ. αέρια ή υγρή χρωματογραφία (*Liquid Chromatography, LC & Gas Chromatography, GC*) με συμβατούς ανιχνευτές, όπως ανιχνευτή υπεριώδους (*ultraviolet, UV detector*), ανιχνευτή ιοντισμού φλόγας (*Flame Ionization Detector, FID*), φασματογράφους μάζας σε σειρά (*Tandem Mass Spectrometry, MS/MS*) κ.ά., ανάλογα πάντοτε με το είδος του αναλύτη στόχου, τις σχετικές απαιτήσεις και δυνατότητες.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία εξετάστηκε η δυνατότητα επικύρωσης και εφαρμογής μίας πολυδύναμης μεθόδου κατάλληλης για τον προσδιορισμό 72 φυτοπροστατευτικών προϊόντων και μεταβολιτών τους (στο εξής αναλύτες στόχοι α.σ.), διαφόρων ομάδων, όπως οργανοφωσφορικές, καρβαμιδικές ενώσεις, νεονικοτινοειδή, ουρίες κ.ά., σε βιολογικά υποστρώματα ορού αίματος και ούρων. Κατά την ανάπτυξη και βελτιστοποίηση της μεθόδου εξετάστηκαν τρία (3) πρωτόκολλα προκατεργασίας δειγμάτων και δύο (2) πρωτόκολλα ενόργανης ανάλυσης προς αναζήτηση του καλύτερου δυνατού αποτελέσματος. Το στάδιο της προκατεργασίας περιελάμβανε μεταξύ άλλων τα κρίσιμα στάδια της μετουσίωσης και κατακρήμνισης των πρωτεϊνών του υποστρώματος και την εκχύλιση στερεάς φάσης με κατάλληλες μικροστήλες, προκειμένου τα δείγματα να καταστούν κατάλληλα για έγχυση στο αναλυτικό όργανο. Για την ενόργανη ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της υγρής χρωματογραφίας συζευγμένη με διαδοχική φασματομετρία μάζας (*LC-ESI-MS/MS*) και συγκεκριμένα το σύστημα *6410 Series Triple*

Quad LC/MS, Model: G6410B του κατασκευαστικού οίκου *Agilent Technologies* και λογισμικό πακέτο *MassHunter Workstation Software* του ίδιου οίκου.

Συνολικά μελετήθηκαν 72 α.σ. διαφόρων κατηγοριών, όπως εντομοκτόνα (27), ζιζανιοκτόνα (13), μυκητοκτόνα (24), μεταβολίτες (12) κ.ά., που ανήκουν σε διάφορες ομάδες (χημικές οικογένειες), όπως καρβαμιδικές ενώσεις (6), νεονικοτινοειδή (5), οργανοφωσφορικές ενώσεις (17) και ουρίες (8) κ.ά.. Από αυτά τα μόρια κατά το στάδιο ολοκλήρωσης της διπλωματικής αυτής εργασίας (Οκτώβριος 2021) 24 ήταν εγκεκριμένα προς χρήση στην *Ευρωπαϊκή Ένωση* και 43 μη εγκεκριμένα, βάσει του Ευρωπαϊκού Κανονισμού ΕΚ 1107/2009 (βλ. §1.6.4). Τα υπόλοιπα 5 είναι μεταβολίτες μητρικών φ.π., οπότε δεν εμπίπτουν και δεν εξετάζονται από αυτή τη νομοθεσία. Αναλυτικότερα και οι 72 α.σ. παρουσιάζονται με αλφαβητική σειρά στον πίνακα 1 του Παραρτήματος.

Η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τη γραμμικότητα (*linearity*), την ορθότητα και την πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας (*accuracy & precision under repeatability & reproducibility conditions*), την εκλεκτικότητα (*selectivity*), το φαινόμενο επιμόλυνσης/μόλυνσης εκ μεταφοράς (*carry-over*), την ευαισθησία (*sensitivity*), τα όρια ποσοτικοποίησης (κατώτερο & ανώτερο, *LLOQ & ULOQ*) και ανίχνευσης (*LOD*) και το φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος - μήτρας (*Matrix Effect, ME*).

Οι παράμετροι προσδιορίστηκαν και για τους 72 α.σ. σε ανθρώπινα βιολογικά υποστρώματα ορού αίματος και ούρα. Το γραμμικό εύρος της μεθόδου ορίστηκε από το 1,25ppb έως τα 500ppb. Τα άκρα αυτά αποτελούν το κατώτερο και ανώτερο όριο ποσοτικοποίησης αντίστοιχα. Η ορθότητα και η πιστότητα προσδιορίστηκαν σε τέσσερα επίπεδα συγκεντρώσεων 1,25ppb, 5ppb, 50ppb και 375ppb. Στο κατώτερο όριο ποσοτικοποίησης (*LLOQ*), στον ορό αίματος για 48 μόρια η ορθότητα βρισκόταν εντός εύρους $\pm 20\%$ της ονομαστικής τιμής και για τα υπόλοιπα 24 στο 60-80% αυτής, ενώ στα ούρα για 54 α.σ. βρισκόταν εντός εύρους $\pm 20\%$ και για τους υπόλοιπους 18 στο 60-80%. Στα άλλα τρία επίπεδα συγκέντρωσης, στον ορό αίματος για 69 μόρια οι τιμές κυμάνθηκαν εντός εύρους $\pm 15\%$ και για τα υπόλοιπα 3 στο 60-80%, ενώ στα ούρα και για τους 72 α.σ. η τιμές βρισκόταν στο εύρος $\pm 15\%$. Η πιστότητα, τόσο ως επαναληψιμότητα, όσο και ως αναπαραγωγιμότητα, δεν ξεπέρασε το 20% στο 1,25ppb και το 15% στα υπόλοιπα επίπεδα και στα δύο εξεταζόμενα υποστρώματα. Το φαινόμενο επίδρασης υποστρώματος εκτιμήθηκε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, 1,25ppb, 5ppb και 500ppb και εκφράστηκε κυρίως ως καταστολή ιοντισμού, κομινόμενο στο εύρος -24% έως 9% στον ορό αίματος παρουσιάζοντας μέγιστη σχετική τυπική απόκλιση 18%, ενώ για τα ούρα οι αντίστοιχες τιμές ήταν -19% έως 1% και 14%.

Συνολικά, η μέθοδος ικανοποίησε τις απαιτήσεις των σχετικών οδηγιών (βλ. Κεφάλαιο 2) και κρίθηκε κατάλληλη για τον σκοπό για τον οποίο προορίζεται ("*fit for the intended purpose*"). Η σημασία τέτοιων εργασιών, που αφορούν στην ανάπτυξη και επικύρωση πολυδύναμων μεθόδων είναι μεγάλη, καθώς απαντούν σε πληθώρα δραστικών μορίων ετερόκλητων χημικών οικογενειών και σε αυτές μπορούν να βασιστούν και άλλες σχετικές εργασίες. Όσον αφορά στο ειδικό αντικείμενο, η ενσωμάτωση ποικίλων δραστικών των

φ.π. είναι σημαντική, διότι καλύπτει όσο είναι δυνατό, ένα ευρύ φάσμα από ουσίες οι οποίες εφαρμόζονται στον αγρό. Σε αυτές τις ουσίες εκτίθενται δυνητικά οι αγρότες και οι εργάτες που εφαρμόζουν τα εν λόγω σκευάσματα για την φυτοπροστασία, ενώ αναφορές έχουν γίνει και για την επίδραση των ψεκασμών/εφαρμογών των φ.π. στους κατοίκους και παρευρισκόμενους (*bystanders*) των περιοχών. Επομένως μπορούν να αποτελέσουν ένα σημαντικό εργαλείο στο στόχο της αποτελεσματικής βιοπαρακολούθησης των πληθυσμών, η οποία σε συνδυασμό με την παρακολούθηση ειδικών βιοδεικτών είναι σημαντική για την ανθρώπινη υγεία.

Βιβλιογραφία

- [1] World Health Organization. Regional Office for Europe, *Human biomonitoring: facts and figures*. World Health Organization. Regional Office for Europe, 2015. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 09, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/164588>
- [2] G. Schwedler κ.ά., '2nd International Conference on Human Biomonitoring, Berlin 2016', *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, τ. 220, τχ. 2, Part A, σσ. 1-2, Μαρτίου 2017, doi: 10.1016/j.ijheh.2017.01.004.
- [3] L. C. de C. Abrão κ.ά., 'Toxicological analyses: analytical method validation for prevention or diagnosis', *Toxicology Mechanisms and Methods*, τ. 31, τχ. 1, σσ. 18-32, Ιανουαρίου 2021, doi: 10.1080/15376516.2020.1839612.
- [4] A. Polcher και Miriam Schöpel, 'Establishment of human biomonitoring at EU level within the framework of the EHBMI (European Human Biomonitoring Initiative, HBM4EU)', *Umweltbundesamt / German Environment Agency*, τ. TEXTE 168/2020, Project No. (FKZ) 3716 62 200 0, τχ. Report No. FB000325/ENG, Σεπτεμβρίου 2020, Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 15, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://www.umweltbundesamt.de/en/publications>
- [5] HBM4EU - science and policy for a healthy future, 'About HBM4EU'. <https://www.hbm4eu.eu/about-hbm4eu/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [6] European Environment Agency and European Commission / HBM4EU Project, 'Βιοδείκτες επίδρασης: Τι πρέπει να γνωρίζετε.' 2018. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 15, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: https://www.hbm4eu.eu/wp-content/uploads/2018/12/20166_brief_n1_biomarkers_EL_v02_HL_JG.pdf
- [7] K. Sexton, L. L. Needham, και J. L. Pirkle, 'Human Biomonitoring of Environmental Chemicals: Measuring chemicals in human tissues is the 'gold standard' for assessing people's exposure to pollution', *American Scientist*, τ. 92, τχ. 1, σσ. 38-45, 2004.
- [8] J. Angerer, U. Ewers, και M. Wilhelm, 'Human biomonitoring: State of the art', *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, τ. 210, τχ. 3, σσ. 201-228, Μαΐου 2007, doi: 10.1016/j.ijheh.2007.01.024.
- [9] Agamemnon Desporoulos και Stefan Silbernagl, *Εγχειρίδιο φυσιολογίας με έγχρωμο άτλαντα*. Αθήνα: Ιατρικές εκδόσεις Λίτσας, 1989.
- [10] 'Ούρο', *Βικιπαιδεία*. Ιανουαρίου 13, 2021. Ημερομηνία πρόσβασης: Οκτωβρίου 17, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://el.wikipedia.org/w/index.php?title=%CE%9F%CF%8D%CF%81%CE%BF&oldid=8628717>
- [11] C. Ladeira και S. Viegas, 'Human Biomonitoring - An overview on biomarkers and their application in Occupational and Environmental Health', *Biomonitoring*, τ. 3, σσ. 15-24, Δεκεμβρίου 2016, doi: 10.1515/bimo-2016-0003.
- [12] C. D. Klaassen και J. B. Watkins III, *Casarett & Doull's essentials of toxicology*, Third edition. New York, N.Y.: McGraw-Hill Companies, 2015. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://accesspharmacy.mhmedical.com/book.aspx?bookid=449>

- [13] *International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides (Revised Version) Adopted by the Hundred and twenty-third Session of the FAO Council in November 2002*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2002.
- [14] *The International Code of Conduct on Pesticide Management*, 4. version. Rome: FAO and WHO, 2014. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/code/en/>
- [15] C. D. Klaassen και J. B. Watkins III, *Βασική Τοξικολογία*, Casarett & Doull, Δεύτερη έκδοση. ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΠΑΡΙΣΙΑΝΟΥ Α.Ε., 2015.
- [16] ΝΟΜΟΣ ΥΠ' ΑΡΙΘ. 4036 *Διάθεση γεωργικών φαρμάκων στην αγορά, ορθολογική χρήση αυτών και συναφείς διατάξεις.*, τ. Φεκ. 8 Α' /27.01.2012. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: https://www.hellenicparliament.gr/Nomothetiko-Ergo/Anazitisi-Nomothetikou-Ergou?law_id=ed2ee696-0291-411d-9567-9bd62d0f213c
- [17] *Regulation (EC) No 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC*, τ. 309. 2009. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://data.europa.eu/eli/reg/2009/1107/oj/eng>
- [18] *Regulation (EU) No 528/2012 of the European Parliament and of the Council of 22 May 2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products*, τ. 167. 2012. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://data.europa.eu/eli/reg/2012/528/oj/eng>
- [19] A. J. Li, A. A. Banjabi, M. Takazawa, T. A. Kumosani, J. M. Yousef, και K. Kannan, 'Serum concentrations of pesticides including organophosphates, pyrethroids and neonicotinoids in a population with osteoarthritis in Saudi Arabia', *Science of The Total Environment*, τ. 737, σ. 139706, Οκτωβρίου 2020, doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.139706.
- [20] *Regulation (EU) 2016/425 of the European Parliament and of the Council of 9 March 2016 on personal protective equipment and repealing Council Directive 89/686/EEC*, τ. 081. 2016. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://data.europa.eu/eli/reg/2016/425/oj/eng>
- [21] *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and guidelines to classification*, 2019 edition. Geneva: World Health Organization; 2020. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 14, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662>
- [22] United Nations, *Globally harmonized system of classification and labelling of chemicals (GHS)*, Eighth revised edition. New York & Geneva: United Nations, 2019. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev08/ST-SG-AC10-30-Rev8e.pdf
- [23] *Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC*. 2012. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://data.europa.eu/eli/reg/2005/396/oj>
- [24] *Directive (EU) 2020/2184 of the European Parliament and of the Council of 16 December 2020 on the quality of water intended for human consumption*, τ. 435. 2020. Ημερομηνία

- πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://data.europa.eu/eli/dir/2020/2184/oj/eng>
- [25] A. J. Li, Z. Chen, T.-C. Lin, G. M. Buck Louis, και K. Kannan, 'Association of urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid insecticides, and phenoxy herbicides with endometriosis', *Environment International*, τ. 136, σ. 105456, Μαρτίου 2020, doi: 10.1016/j.envint.2019.105456.
- [26] R. Bates, *Nerve agents, Lecture 7-10 / Toxicology / Introduction to Forensic Science Offered by Nanyang Technological University, Singapore - Coursera*, (Αυγούστου 11, 2019). [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή Video]. Διαθέσιμο στο: <https://www.coursera.org/learn/forensic-science>
- [27] Πετράκης Δημήτριος, 'Φυτοφάρμακα και Φάρμακα'. Ιατρικός Σύλλογος Ηρακλείου, Νοεμβρίου 13, 2015. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 15, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: http://www.ish.gr/?content_lang=1&subsite=1&cat_id=66
- [28] C. A. Ellison, Y. Tian, J. B. Knaak, P. J. Kostyniak, και J. R. Olson, 'Human Hepatic Cytochrome P450-Specific Metabolism of the Organophosphorus Pesticides Methyl Parathion and Diazinon', *Drug Metab Dispos*, τ. 40, τχ. 1, σσ. 1-5, Ιανουαρίου 2012, doi: 10.1124/dmd.111.042572.
- [29] T. Ma και J. E. Chambers, 'Kinetic parameters of desulfuration and dearylation of parathion and chlorpyrifos by rat liver microsomes', *Food and Chemical Toxicology*, τ. 32, τχ. 8, σσ. 763-767, Ιανουαρίου 1994, doi: 10.1016/S0278-6915(09)80009-4.
- [30] 'The European Molecular Biology Laboratory - The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI)'. <https://www.ebi.ac.uk/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 14, 2021).
- [31] IARC/WHO, 'IARC Monographs Volume 112: evaluation of five organophosphate insecticides and herbicides', Μαΐου 20, 2015. <https://www.iarc.who.int/news-events/2019-revised-preamble-to-the-iarc-monographs/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [32] 'PPDB: Pesticide Properties DataBase / University of Hertfordshire'. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [33] D. L. Sudakin και D. L. Stone, 'Dialkyl phosphates as biomarkers of organophosphates: The current divide between epidemiology and clinical toxicology', *Clinical Toxicology*, τ. 49, τχ. 9, σσ. 771-781, Νοεμβρίου 2011, doi: 10.3109/15563650.2011.624101.
- [34] *Carbamate Pesticides: A General Introduction, Environmental Health Criteria 64*. Geneva: World Health Organization, 1986.
- [35] S. A. Hardinger, 'Illustrated Glossary of Organic Chemistry'. <http://www.chem.ucla.edu/~harding/IGOC/IGOC.html> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [36] M. Minagawa, M. Shirato, M. Toya, και M. Sato, 'Dual Impact of a Benzimidazole Resistant β -Tubulin on Microtubule Behavior in Fission Yeast', *Cells*, τ. 10, τχ. 5, Art. τχ. 5, Μαΐου 2021, doi: 10.3390/cells10051042.

- [37] 'European Commission, Neonicotinoids'. https://ec.europa.eu/food/plants/pesticides/approval-active-substances/renewal-approval/neonicotinoids_en (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 14, 2021).
- [38] X. Xiu, N. L. Puskar, J. A. P. Shanata, H. A. Lester, και D. A. Dougherty, 'Nicotine binding to brain receptors requires a strong cation-π interaction', *Nature*, τ. 458, τχ. 7237, σσ. 534-537, Μαρτίου 2009, doi: 10.1038/nature07768.
- [39] Q. Zhang, Z. Li, C. H. Chang, J. L. Lou, M. R. Zhao, και C. Lu, 'Potential human exposures to neonicotinoid insecticides: A review', *Environ Pollut*, τ. 236, σσ. 71-81, Μαΐου 2018, doi: 10.1016/j.envpol.2017.12.101.
- [40] T. Iwasa, N. Motoyama, J. T. Ambrose, και R. M. Roe, 'Mechanism for the differential toxicity of neonicotinoid insecticides in the honey bee, *Apis mellifera*', *Crop Protection*, τ. 23, τχ. 5, σσ. 371-378, Μαΐου 2004, doi: 10.1016/j.cropro.2003.08.018.
- [41] Α. Βαλαβανίδης και Κ. Ευσταθίου, 'Η χημική ένωση του μήνα: Νικοτίνη', 2009. http://195.134.76.37/chemicals/chem_nicotine.htm (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 14, 2021).
- [42] 'List of classifications by cancer sites with sufficient or limited evidence in humans, IARC Monographs Volumes 1-129'. https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2019/07/Classifications_by_cancer_site.pdf (ημερομηνία πρόσβασης Αυγούστου 10, 2021).
- [43] '2019 Revised Preamble to the IARC Monographs - IARC/WHO', Ιανουαρίου 18, 2019. <https://www.iarc.who.int/news-events/2019-revised-preamble-to-the-iarc-monographs/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [44] R. Kanissery, B. Gairhe, D. Kadyampakeni, O. Batuman, και F. Alferez, 'Glyphosate: Its Environmental Persistence and Impact on Crop Health and Nutrition', *Plants (Basel)*, τ. 8, τχ. 11, σ. 499, Νοεμβρίου 2019, doi: 10.3390/plants8110499.
- [45] IARC/WHO, 'Q&A on Glyphosate, IARC explains the carcinogenicity of Glyphosate', Μαρτίου 01, 2016. <https://iarc.who.int/news-events/qa-on-glyphosate/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [46] European Food Safety Authority (EFSA), 'Glyphosate: EFSA responds to critics'. <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/160113> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [47] European Food Safety Authority (EFSA), 'Glyphosate'. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/glyphosate> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [48] C. M. Benbrook, 'How did the US EPA and IARC reach diametrically opposed conclusions on the genotoxicity of glyphosate-based herbicides?', *Environmental Sciences Europe*, τ. 31, τχ. 1, σ. 2, Ιανουαρίου 2019, doi: 10.1186/s12302-018-0184-7.
- [49] EPA's Office of Pesticide Programs, 'Glyphosate Issue Paper: Evaluation of Carcinogenic Potential'. U. S. Environmental Protection Agency, Σεπτεμβρίου 02, 2016. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: https://cfpub.epa.gov/si/si_public_record_Report.cfm?Lab=OPP&dirEntryId=337935

- [50] C. Gillezeau κ.ά., 'The evidence of human exposure to glyphosate: a review', *Environmental Health*, τ. 18, τχ. 1, σ. 2, Ιανουαρίου 2019, doi: 10.1186/s12940-018-0435-5.
- [51] J.-F. Bienvenu, P. Bélanger, É. Gaudreau, G. Provencher, και N. Fleury, 'Determination of glyphosate, glufosinate and their major metabolites in urine by the UPLC-MS/MS method applicable to biomonitoring and epidemiological studies', *Anal Bioanal Chem*, τ. 413, τχ. 8, σσ. 2225–2234, Μαρτίου 2021, doi: 10.1007/s00216-021-03194-x.
- [52] 'COPHES'. <http://www.eu-hbm.info/cophes> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 14, 2021).
- [53] 'CROME - Life', *CROME - Life*. <http://www.crome-life.eu/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 14, 2021).
- [54] P. Grandjean, 'Strengths and limitations of HBM--imprecision matters', *Int J Hyg Environ Health*, τ. 215, τχ. 2, σ. 94, Φεβρουαρίου 2012, doi: 10.1016/j.ijheh.2011.11.008.
- [55] 'WMA - The World Medical Association-WMA Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects'. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 14, 2021).
- [56] 'International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects / Council for International Organizations of Medical Sciences'. <https://cioms.ch/publications/product/international-ethical-guidelines-for-biomedical-research-involving-human-subjects-2/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 15, 2021).
- [57] 'ICH harmonised guideline integrated addendum to ICH E6(R1): Guideline for Good Clinical Practice ICH E6(R2) ICH Consensus Guideline', *ICH GCP*. <https://ichgcp.net/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 14, 2021).
- [58] 'ICH harmonised guideline M10 on bioanalytical method validation Step 2b'. International council for harmonisation of technical requirements for pharmaceuticals for human use, Draft version - Currently under public consultation 2019. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 10, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m10-bioanalytical-method-validation#current-version-section>
- [59] 'Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry'. FDA, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine, Μαΐου 24, 2018. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry>
- [60] 'Guideline on bioanalytical method validation'. European Medicines Agency (EMA), Ιουλίου 21, 2011. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation#current-effective-version-section>
- [61] 'Guideline on Bioanalytical Method Validation in Pharmaceutical Development'. MHLW, Japan, Ιουλίου 25, 2013.

- [62] 'Scientific Working Group for Forensic Toxicology (SWGTOX) Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology', *Journal of Analytical Toxicology*, τ. 37, τχ. 7, σσ. 452-474, Σεπτεμβρίου 2013, doi: 10.1093/jat/bkt054.
- [63] 'Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, Standard 036, First Edition'. ANSI/ASB, 2019. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: www.asbstandardsboard.org
- [64] U. Örnemark και B. Magnusson, Επιμ., *Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods – A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics*, Second edition. Eurachem, 2014. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: www.eurachem.org
- [65] G. Hopfgartner, 'Bioanalytical method validation: How much should we do and how should we document?', *Anal Bioanal Chem*, τ. 412, τχ. 3, σσ. 531-532, Ιανουαρίου 2020, doi: 10.1007/s00216-019-02334-8.
- [66] F. T. Peters και H. H. Maurer, 'Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology – A review', *Accred Qual Assur*, τ. 7, τχ. 11, σσ. 441-449, Νοεμβρίου 2002, doi: 10.1007/s00769-002-0516-5.
- [67] F. T. Peters, O. H. Drummer, και F. Musshoff, 'Validation of new methods', *Forensic Science International*, τ. 165, τχ. 2, σσ. 216-224, Ιανουαρίου 2007, doi: 10.1016/j.forsciint.2006.05.021.
- [68] B. P. Booth, 'Welcome to Bioanalysis', *Bioanalysis*, τ. 1, τχ. 1, σσ. 1-2, Απριλίου 2009, doi: 10.4155/bio.09.4.
- [69] M.-L. Chen κ.ά., 'Bioavailability and Bioequivalence: An FDA Regulatory Overview', *Pharm Res*, τ. 18, τχ. 12, σσ. 1645-1650, Δεκεμβρίου 2001, doi: 10.1023/A:1013319408893.
- [70] H. Hill, 'Development of bioanalysis: a short history', *Bioanalysis*, τ. 1, τχ. 1, σσ. 3-7, Απριλίου 2009, doi: 10.4155/bio.09.3.
- [71] 'ICH Q2 (R1) Validation of analytical procedures: text and methodology - Step 5'. 1995. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2-r1-validation-analytical-procedures-text-methodology#current-effective-version-section>
- [72] C. Hartmann, J. Smeyers-Verbeke, D. L. Massart, και R. D. McDowall, 'Validation of bioanalytical chromatographic methods', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, τ. 17, τχ. 2, σσ. 193-218, Ιουνίου 1998, doi: 10.1016/S0731-7085(97)00198-2.
- [73] V. P. Shah κ.ά., 'Analytical methods validation: Bioavailability, bioequivalence, and pharmacokinetic studies', *Journal of Pharmaceutical Sciences*, τ. 81, τχ. 3, σσ. 309-312, 1992, doi: 10.1002/jps.2600810324.
- [74] V. P. Shah κ.ά., 'Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress', *Pharm Res*, τ. 17, τχ. 12, σσ. 1551-1557, Δεκεμβρίου 2000, doi: 10.1023/A:1007669411738.
- [75] B. Booth, F. Vazvaei, E. Fluhler, H. Myler, και E. Woolf, 'AAPS Workshop Report on ICH M10', *AAPS J*, τ. 22, τχ. 1, σ. 10, Δεκεμβρίου 2019, doi: 10.1208/s12248-019-0398-7.
- [76] 'M10 Bioanalytical Method Validation; International Council for Harmonisation; Draft Guidance for Industry; Availability', *Federal Register*, Ιουνίου 27, 2019. <https://www.federalregister.gov/documents/2019/06/27/2019-13698/m10->

bioanalytical-method-validation-international-council-for-harmonisation-draft-guidance-for (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 13, 2021).

- [77] M. M. Moein, A. El Beqqali, και M. Abdel-Rehim, 'Bioanalytical method development and validation: Critical concepts and strategies', *Journal of Chromatography B*, τ. 1043, σσ. 3-11, Φεβρουαρίου 2017, doi: 10.1016/j.jchromb.2016.09.028.
- [78] 'The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use (ICH) Official Website'. <https://www.ich.org/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 10, 2021).
- [79] 'Final endorsed Concept Paper M10: Bioanalytical Method Validation', Οκτωβρίου 2016, Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 10, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: https://database.ich.org/sites/default/files/M10_EWG_Concept_Paper.pdf
- [80] P. Timmerman κ.ά., 'European Bioanalysis Forum feedback on draft ICH M10 guideline on bioanalytical method validation during the Step 2b public consultation period', *Bioanalysis*, τ. 12, τχ. 6s, σσ. 1-11, Μαρτίου 2020, doi: 10.4155/bio-2020-0065.
- [81] S. Lowes και M. Brown, 'Bioanalytical method validation guidance language and a decade of progress', *Bioanalysis*, τ. 11, τχ. 7, σσ. 587-593, Απριλίου 2019, doi: 10.4155/bio-2019-0051.
- [82] N. Kadian, K. S. R. Raju, M. Rashid, M. Y. Malik, I. Taneja, και M. Wahajuddin, 'Comparative assessment of bioanalytical method validation guidelines for pharmaceutical industry', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, τ. 126, σσ. 83-97, Ιουλίου 2016, doi: 10.1016/j.jpba.2016.03.052.
- [83] S. Costa και J. P. Teixeira, 'Toxicology', στο *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, P. Wexler, Επιμ. Oxford: Academic Press, 2014, σσ. 718-720. doi: 10.1016/B978-0-12-386454-3.00440-1.
- [84] 'Nature portfolio: Bioanalytical chemistry'. <https://www.nature.com/subjects/bioanalytical-chemistry> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 10, 2021).
- [85] F. T. Peters, M. Hartung, M. Herbold, G. Schmitt, T. Daldrup, και F. Musshoff, 'Anlage zu den Richtlinien der GTFCh zur Qualitätssicherung bei forensisch-toxikologischen Untersuchungen, Anhang C: Anforderungen an die Durchführung von Analysen, 1. Validierung', *Toxichem. Krimtech.*, τ. 71, σσ. 146-154, 2004.
- [86] 'Academy Standards Board'. <http://www.asbstandardsboard.org/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 10, 2021).
- [87] *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM), 2008 version with minor corrections / Vocabulaire international de métrologie – Concepts fondamentaux et généraux et termes associés (VIM), Version 2008 avec corrections mineures*, Third. JCGM, 2012.
- [88] 'ΕΛΟΤ EN ISO/IEC 17025:2017, Γενικές απαιτήσεις για την ικανότητα των εργαστηρίων δοκιμών και διακριβώσεων / General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (ISO/IEC 17025:2017)'. Ελληνικός Οργανισμός Τυποποίησης (ΕΛΟΤ), 2017.

- [89] A. P. Worth και M. Balls, 'The Principles of Validation and the ECVAM Validation Process', *Altern Lab Anim*, τ. 32, τχ. 1_suppl, σσ. 623–629, Ιανουαρίου 2004, doi: 10.1177/026119290403201s105.
- [90] Publications Office of the European Union, 2002/657/EC: *Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*. Publications Office of the European Union, 2002. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://op.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858>
- [91] Publications Office of the European Union, 2002/657/EK: *Απόφαση της Επιτροπής, της 12ης Αυγούστου 2002, για εφαρμογή της οδηγίας 96/23/EK του Συμβουλίου σχετικά με την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων*. Publications Office of the European Union, 2002. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://op.europa.eu/el/publication-detail/-/publication/ed928116-a955-4a84-b10a-cf7a82bad858>
- [92] A. Krueve κ.ά., 'Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II', *Analytica Chimica Acta*, τ. 870, σσ. 8–28, Απριλίου 2015, doi: 10.1016/j.aca.2015.02.016.
- [93] D. C. Harris, *Ποσοτική χημική ανάλυση, Τόμος Α', Τέταρτη έκδοση.*, τ. Τόμος Α'. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2019.
- [94] H. Gu, G. Liu, J. Wang, A.-F. Aubry, και M. E. Arnold, 'Selecting the Correct Weighting Factors for Linear and Quadratic Calibration Curves with Least-Squares Regression Algorithm in Bioanalytical LC-MS/MS Assays and Impacts of Using Incorrect Weighting Factors on Curve Stability, Data Quality, and Assay Performance', *Anal. Chem.*, τ. 86, τχ. 18, σσ. 8959–8966, Σεπτεμβρίου 2014, doi: 10.1021/ac5018265.
- [95] V. Barwick και E. Prichard, *Eurachem Guide: Terminology in Analytical Measurement – Introduction to VIM 3*, First. Eurachem, 2011. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: www.eurachem.org
- [96] Κ. Χριστοδουλίδης, *Ανάλυση και παρουσίαση πειραματικών αποτελεσμάτων*, Πρώτη έκδοση. Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, 2009. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://www.physics.ntua.gr/~christ/ERGASTIRIA/SFALMATA.pdf>
- [97] Π. Ε. Χριστοπούλου, 'Ανάλυση σφαλμάτων', 2005. http://old.physics.upatras.gr/UploadedFiles/course_173_6304.pdf (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 10, 2021).
- [98] V. Barwick, Επιμ., *Eurachem/CITAC Guide: Guide to Quality in Analytical Chemistry: An Aid to Accreditation*, Third edition. Eurachem, 2016. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: www.eurachem.org
- [99] B. Walther και J. Moore, 'The concepts of bias, precision and accuracy, and their use in testing the performance of species richness estimators, with a literature review of estimator performance', *Ecography*, τ. 28, σσ. 815–829, Δεκεμβρίου 2005, doi: 10.1111/j.2005.0906-7590.04112.x.
- [100] B. Magnusson, H. Hovind, M. Krysell, U. Lund, και I. Mäkinen, *Handbook - Inter Quality control, Nordtest Report TR 569*, Fifth edition. NORDTEST, 2018. Ημερομηνία

πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 12, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: www.nordtest.info

- [101] Γ. Θεοδωρίδης, Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Α. Σ. Ζώτου, και Β. Σαμανίδου, *Βιοαναλυτική χημεία*, (Ηλεκτρονικό βιβλίο). Αθήνα: Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών, 2015. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/3667>
- [102] Ι. Δεληγιάννης και Δ. Χελά, *Ενόργανη Περιβαλλοντική Ανάλυση*. Ιωάννινα: Πανεπιστημιακό Τυπογραφείο Ιωαννίνων, 2007.
- [103] M. Thompson, S. L. R. Ellison, A. Fajgelj, P. Willetts, και R. Wood, 'Harmonised guidelines for the use of recovery information in analytical measurement', *Pure and Applied Chemistry*, τ. 71, τχ. 2, σσ. 337-348, Φεβρουαρίου 1999, doi: 10.1351/pac199971020337.
- [104] M. Thompson, S. L. R. Ellison, και R. Wood, 'Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report)', *Pure and Applied Chemistry*, τ. 74, τχ. 5, σσ. 835-855, Μαΐου 2002, doi: 10.1351/pac200274050835.
- [105] J. X. Duggan, 'Quantification below the LLOQ in regulated LC-MS/MS assays: a review of bioanalytical considerations and cautions', *Bioanalysis*, τ. 11, τχ. 8, σσ. 797-814, Απριλίου 2019, doi: 10.4155/bio-2018-0261.
- [106] E. Theodorsson, 'Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry', *Bioanalysis*, τ. 4, τχ. 3, σσ. 305-320, Φεβρουαρίου 2012, doi: 10.4155/bio.11.311.
- [107] P. Panuwet κ.ά., 'Biological Matrix Effects in Quantitative Tandem Mass Spectrometry-Based Analytical Methods: Advancing Biomonitoring', *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, τ. 46, τχ. 2, σσ. 93-105, Μαρτίου 2016, doi: 10.1080/10408347.2014.980775.
- [108] W. Zhou, S. Yang, και P. G. Wang, 'Matrix effects and application of matrix effect factor', *Bioanalysis*, τ. 9, τχ. 23, σσ. 1839-1844, Δεκεμβρίου 2017, doi: 10.4155/bio-2017-0214.
- [109] H. Trufelli, P. Palma, G. Famiglini, και A. Cappiello, 'An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry', *Mass Spectrometry Reviews*, τ. 30, τχ. 3, σσ. 491-509, 2011, doi: 10.1002/mas.20298.
- [110] O. A. Ismaiel, M. S. Halquist, M. Y. Elmamly, A. Shalaby, και H. Thomas Karnes, 'Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations', *Journal of Chromatography B*, τ. 875, τχ. 2, σσ. 333-343, Νοεμβρίου 2008, doi: 10.1016/j.jchromb.2008.08.032.
- [111] Β. Σαμανίδου, 'Η προκατεργασία δείγματος στη χημική ανάλυση', *Χημικά Χρονικά*, τ. Τόμος 82, τχ. Τεύχος 06, σσ. 10-13, 2020.
- [112] D. C. Harris, *Ποσοτική χημική ανάλυση, Τόμος Β'*, Δεύτερη έκδοση., τ. Τόμος Β'. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2010.
- [113] D. C. Harris και C. A. Lucy, *Quantitative chemical analysis*, Ninth edition. New York, NY: W. H. Freeman and Company, 2016.
- [114] V. F. Samanidou, 'Extraction Techniques In Sample Preparation', *Scholarly Community Encyclopedia*, Μαΐου 2020, doi: 10.32545/encyclopedia202004.0027.v4.

- [115] K. M. Kasiotis, E. Baira, E. Manea-Karga, D. Nikolopoulou, K. Ganas, και K. Machera, 'Investigating a human pesticide intoxication incident: The importance of robust analytical approaches', *Open Chemistry*, τ. 19, τχ. 1, σσ. 107-118, Ιανουαρίου 2021, doi: 10.1515/chem-2021-0193.
- [116] M. Honda, M. Robinson, K. Kannan, M. Honda, M. Robinson, και K. Kannan, 'A simple method for the analysis of neonicotinoids and their metabolites in human urine', *Environ. Chem.*, τ. 16, τχ. 3, σσ. 171-178, Μαρτίου 2019, doi: 10.1071/EN18240.
- [117] M. Honda, M. Robinson, K. Kannan, M. Honda, M. Robinson, και K. Kannan, 'A rapid method for the analysis of perfluorinated alkyl substances in serum by hybrid solid-phase extraction', *Environ. Chem.*, τ. 15, τχ. 2, σσ. 92-99, Μαΐου 2018, doi: 10.1071/EN17192.
- [118] Η. Μπέγας και Ε. Ασπροδίνη, 'Μεταβολισμός ξενοβιοτικών ουσιών, στο μάθημα: Μεταβολισμός ξενοβιοτικών ουσιών, τοξικοκινητική, doping, ιατροδιακοστική τοξικολογία, ΠΜΣ Τοξικολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας', Λάρισα, 2020.
- [119] A. Eriksson, 'Development of a Urinary Lipidomics Method Using LC-MS, Application in a Kidney Rejection Study', Bachelor thesis, Umeå University, 2018. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 10, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <http://www.diva-portal.org/smash/get/diva2:1237958/FULLTEXT01.pdf>
- [120] P. Tiphara και V. Thongboonkerd, 'Differential human urinary lipid profiles using various lipid-extraction protocols: MALDI-TOF and LIFT-TOF/TOF analyses', *Sci Rep*, τ. 6, σ. 33756, Σεπτεμβρίου 2016, doi: 10.1038/srep33756.
- [121] 'HybridSPE® - Phospholipid Technology, Merck'. <https://www.sigmaaldrich.com/GR/en/technical-documents/technical-article/analytical-chemistry/solid-phase-extraction/hybridspe-ppt#hybridspe> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 10, 2021).
- [122] D. A. Skoog, F. J. Holler, και S. R. Crouch, *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*, Πέμπτη έκδοση. Εκδόσεις Κωσταράκης Α.Ε., 2002.
- [123] D. A. Skoog, F. J. Holler, και S. R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*, Seventh Edition. 2018.
- [124] Α. Τσακάλωφ, 'Χρωματογραφία - Φασματομετρία μαζών και εφαρμογές της στην τοξικολογία και ιατρική, στο μάθημα: Μεταβολισμός ξενοβιοτικών ουσιών, τοξικοκινητική, doping, ιατροδιακοστική τοξικολογία, ΠΜΣ Τοξικολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας', Λάρισα, Μαΐου 17, 2020.
- [125] A. Sunil, 'HPLC Detectors, Their Types and Use: A Review', *Organic & Medicinal Chemistry International Journal*, τ. 6, τχ. 5, Μαΐου 2018, doi: 10.19080/OMCIJ.2018.06.555700.
- [126] Μ. Χαλαμπαλάκη, 'Φασματομετρία μάζας (Mass Spectrometry - MS) και Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης συνδεδεμένη με Φασματομετρία μάζας (LC-MS), Εργαστήριο Φαρμακογνωσίας ΙΕργαστήριο Φαρμακογνωσίας Ι, Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων Τομέας Φαρμακογνωσίας και Χημείας Φυσικών Προϊόντων, Φαρμακευτικό Τμήμα, Πανεπιστήμιο Αθηνών'. Ημερομηνία πρόσβασης: Σεπτεμβρίου 11, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://eclass.uoa.gr/modules/document/file.php/PHARM100/Lab%206.pdf>

- [127] X. Fang κ.ά., 'Quadrupole-linear ion trap tandem mass spectrometry system for clinical biomarker analysis', *Engineering*, Φεβρουαρίου 2021, doi: 10.1016/j.eng.2020.10.021.
- [128] 'The Nobel Prize in Chemistry 2002'. <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2002/summary/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 10, 2021).
- [129] R. Raina-Fulton, N. Dunn, και Z. Xie, *Pesticides and Their Degradation Products Including Metabolites: Chromatography-Mass Spectrometry Methods*. IntechOpen, 2017. doi: 10.5772/68074.
- [130] Α. Τσακάλωφ, 'Φασματομετρία μαζών, στο μάθημα: Μεταβολισμός ξενοβιοτικών ουσιών, τοξικοκινητική, doping, ιατροδιακοτική τοξικολογία, ΠΜΣ Τοξικολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας', Λάρισα, Μαΐου 17, 2020.
- [131] 'The Nobel Prize in Physics 1989'. <https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1989/summary/> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 10, 2021).
- [132] Χρήστος Γ. Μπάκαβος, 'Σύνθεση των d0/d3 N-υδροξυσουκινιμιδυλεστέρων του π-μεθοξυβενζοϊκού οξέος και χρήση τους στην ανάλυση βιογενών αμινών σε τρόφιμα με τη μέθοδο ισοτοπικής αραίωσης φασματομετρίας μαζών', Διατριβή για την απόκτηση μεταπτυχιακού διπλώματος, Πανεπιστήμιο Πατρών, Τμήμα Χημείας, Πάτρα, 2014. Ημερομηνία πρόσβασης: Οκτωβρίου 05, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://nemertes.library.upatras.gr/>
- [133] B. Domon και R. Aebersold, 'Mass Spectrometry and Protein Analysis', *Science*, τ. 312, τχ. 5771, σσ. 212–217, Απριλίου 2006, doi: 10.1126/science.1124619.
- [134] Κ. Κασιώτης, 'Τοξικολογία & Αναλυτική Χημεία: Σύγχρονες Εφαρμογές, στο μάθημα: Περιβαλλοντική και διατροφική τοξικολογία, ΠΜΣ Τοξικολογία, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας', Λάρισα, Απριλίου 05, 2020.
- [135] J. L. F. Moreno, A. G. Frenich, P. P. Bolaños, και J. L. M. Vidal, 'Multiresidue method for the analysis of more than 140 pesticide residues in fruits and vegetables by gas chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry', *Journal of Mass Spectrometry*, τ. 43, τχ. 9, σσ. 1235–1254, 2008, doi: 10.1002/jms.1400.
- [136] L. Alder, K. Greulich, G. Kempe, και B. Vieth, 'Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?', *Mass Spectrometry Reviews*, τ. 25, τχ. 6, σσ. 838–865, 2006, doi: 10.1002/mas.20091.
- [137] S. Mostafalou και M. Abdollahi, 'Pesticides and human chronic diseases: Evidences, mechanisms, and perspectives', *Toxicology and Applied Pharmacology*, τ. 268, τχ. 2, σσ. 157–177, Απριλίου 2013, doi: 10.1016/j.taap.2013.01.025.
- [138] W. J. Lee, D. P. Sandler, A. Blair, C. Samanic, A. J. Cross, και M. C. R. Alavanja, 'Pesticide use and colorectal cancer risk in the agricultural health study', *International Journal of Cancer*, τ. 121, τχ. 2, σσ. 339–346, 2007, doi: 10.1002/ijc.22635.
- [139] H. J. Hamlin και L. J. Guillette, 'Birth defects in wildlife: the role of environmental contaminants as inducers of reproductive and developmental dysfunction', *Syst Biol Reprod Med*, τ. 56, τχ. 2, σσ. 113–121, Απριλίου 2010, doi: 10.3109/19396360903244598.
- [140] K. M. Hayden κ.ά., 'Occupational exposure to pesticides increases the risk of incident AD: The Cache County Study', *Neurology*, τ. 74, τχ. 19, σσ. 1524–1530, Μαΐου 2010, doi: 10.1212/WNL.0b013e3181dd4423.

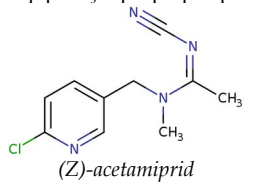

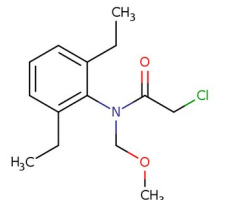

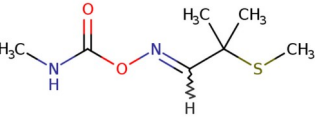

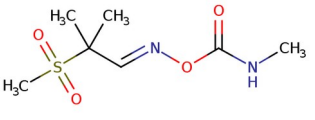

- [141] T. Parrón, M. Requena, A. F. Hernández, και R. Alarcón, 'Association between environmental exposure to pesticides and neurodegenerative diseases', *Toxicology and Applied Pharmacology*, τ. 256, τχ. 3, σσ. 379–385, Νοεμβρίου 2011, doi: 10.1016/j.taap.2011.05.006.
- [142] C. J. Everett και E. M. Matheson, 'Biomarkers of pesticide exposure and diabetes in the 1999–2004 National Health and Nutrition Examination Survey', *Environment International*, τ. 36, τχ. 4, σσ. 398–401, Μαΐου 2010, doi: 10.1016/j.envint.2010.02.010.
- [143] C. G. Parks κ.ά., 'Insecticide use and risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus in the Women's Health Initiative Observational Study', *Arthritis Care Res (Hoboken)*, τ. 63, τχ. 2, σσ. 184–194, Φεβρουαρίου 2011, doi: 10.1002/acr.20335.
- [144] G. M. Forster, D. G. Brown, G. P. Dooley, R. L. Page, και E. P. Ryan, 'Multiresidue Analysis of Pesticides in Urine of Healthy Adult Companion Dogs', *Environ. Sci. Technol.*, τ. 48, τχ. 24, σσ. 14677–14685, Δεκεμβρίου 2014, doi: 10.1021/es503764s.
- [145] T. Yamamuro, H. Ohta, M. Aoyama, και D. Watanabe, 'Simultaneous determination of neonicotinoid insecticides in human serum and urine using diatomaceous earth-assisted extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry', *Journal of Chromatography B*, τ. 969, σσ. 85–94, Οκτωβρίου 2014, doi: 10.1016/j.jchromb.2014.06.008.
- [146] K. Zhang κ.ά., 'Multiresidue Pesticide Analysis of Agricultural Commodities Using Acetonitrile Salt-Out Extraction, Dispersive Solid-Phase Sample Clean-Up, and High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry', *J. Agric. Food Chem.*, τ. 59, τχ. 14, σσ. 7636–7646, Ιουλίου 2011, doi: 10.1021/jf2010723.
- [147] D. Debayle, G. Dessalces, και M. F. Grenier-Loustalot, 'Multi-residue analysis of traces of pesticides and antibiotics in honey by HPLC-MS-MS', *Anal Bioanal Chem*, τ. 391, τχ. 3, σσ. 1011–1020, Ιουνίου 2008, doi: 10.1007/s00216-008-2003-2.
- [148] J. B. Leyva-Morales, J. B. Valdez-Torres, P. J. Bastidas-Bastidas, και M. Betancourt-Lozano, 'Validation and Application of a Multi-residue Method, Using Accelerated Solvent Extraction Followed by Gas Chromatography, for Pesticides Quantification in Soil', *Journal of Chromatographic Science*, τ. 53, τχ. 10, σσ. 1623–1630, Νοεμβρίου 2015, doi: 10.1093/chromsci/bmv063.
- [149] Kari Organtini, Gareth Cleland, Eimear McCall, και Simon Hird, 'LC-MS/MS and GC-MS/MS Multi Residue Pesticide Analysis in Fruit and Vegetable Extracts on a Single Tandem Quadrupole Mass Spectrometer', *Chromatography Today*. <http://www.chromatographytoday.com/article/lc-ms/48/waters-corporation/plc-msms-and-gc-msmsnbspmulti-residue-pesticide-analysisnbspin-fruit-and-vegetable-extractsnbspon-a-single-tandem-quadrupole-mass-spectrometerp/2228> (ημερομηνία πρόσβασης Σεπτεμβρίου 17, 2021).
- [150] Agilent Technologies, *Agilent 6400 Series Triple Quadrupole LC/MS System, Concepts Guide, The Big Picture, B.08.00*, Revision A, August 2015. Santa Clara, USA: © Agilent Technologies. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://www.agilent.com/>
- [151] E. Sierra-Diaz κ.ά., 'Urinary Pesticide Levels in Children and Adolescents Residing in Two Agricultural Communities in Mexico', *International Journal of Environmental Research and Public Health*, τ. 16, τχ. 4, Art. τχ. 4, Ιανουαρίου 2019, doi: 10.3390/ijerph16040562.

- [152] *Environmental Health Criteria 149, Carbendazim*. Geneva: World Health Organization, 1993.
- [153] R. H. Hill κ.ά., 'Pesticide Residues in Urine of Adults Living in the United States: Reference Range Concentrations', *Environmental Research*, τ. 71, τχ. 2, σσ. 99-108, Νοεμβρίου 1995, doi: 10.1006/enrs.1995.1071.
- [154] S.-S. E. Petropoulou, E. Gikas, A. Tsarbopoulos, και P. A. Siskos, 'Gas chromatographic-tandem mass spectrometric method for the quantitation of carbofuran, carbaryl and their main metabolites in applicators' urine', *Journal of Chromatography A*, τ. 1108, τχ. 1, σσ. 99-110, Μαρτίου 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2005.12.058.
- [155] M. Hussain, K. Yoshida, M. Atiemo, και D. Johnston, 'Occupational exposure of grain farmers to carbofuran', *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, τ. 19, τχ. 2, σσ. 197-204, Μαρτίου 1990, doi: 10.1007/BF01056087.
- [156] R. I. Krieger και T. Thongsinthusak, 'Metabolism and excretion of dimethoate following ingestion of overtolerance peas and a bolus dose', *Food and Chemical Toxicology*, τ. 31, τχ. 3, σσ. 177-182, Μαρτίου 1993, doi: 10.1016/0278-6915(93)90091-C.
- [157] A. W. Abu-Qare και M. B. Abou-Donia, 'Urinary excretion of metabolites following a single dermal dose of [14C]methyl parathion in pregnant rats', *Toxicology*, τ. 150, τχ. 1, σσ. 119-127, Σεπτεμβρίου 2000, doi: 10.1016/S0300-483X(00)00250-X.
- [158] P. R. Harp, 'Aldicarb', στο *Encyclopedia of Toxicology (Second Edition)*, P. Wexler, Επιμ. New York: Elsevier, 2005, σσ. 64-66. doi: 10.1016/B0-12-369400-0/00038-7.
- [159] 'National Biomonitoring Program, CDC', Σεπτεμβρίου 01, 2021. <https://www.cdc.gov/biomonitoring/index.html> (ημερομηνία πρόσβασης Οκτωβρίου 24, 2021).
- [160] T. Yokota, K. Mikata, H. Nagasaki, και K. Ohta, 'Absorption, Tissue Distribution, Excretion, and Metabolism of Clothianidin in Rats', *J. Agric. Food Chem.*, τ. 51, τχ. 24, σσ. 7066-7072, Νοεμβρίου 2003, doi: 10.1021/jf034760f.
- [161] M. A. Montesano, A. O. Olsson, P. Kuklennyik, L. L. Needham, A. S. A. Bradman, και D. B. Barr, 'Method for determination of acephate, methamidophos, omethoate, dimethoate, ethylenethiourea and propylenethiourea in human urine using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry', *J Expo Sci Environ Epidemiol*, τ. 17, τχ. 4, σσ. 321-330, Ιουλίου 2007, doi: 10.1038/sj.jes.7500550.
- [162] Y.-J. Xu κ.ά., 'Urinary levels of dimethoate, bisphenol A and benzo[a]pyrene in first-year students of Hohai University from different geographical regions', *BMC Public Health*, τ. 21, τχ. 1, σ. 1692, Σεπτεμβρίου 2021, doi: 10.1186/s12889-021-11726-4.
- [163] SANTE/12682/2019, *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed*, τ. 12682/2019. σ. 52. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: https://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmpl_article.asp?CntID=727
- [164] 'The dose makes the poison', *Wikipedia*. Σεπτεμβρίου 26, 2021. Ημερομηνία πρόσβασης: Οκτωβρίου 15, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: https://en.wikipedia.org/w/index.php?title=The_dose_makes_the_poison&oldid=1046497390

- [165] 'Paracelsus, Biography & Facts', *Encyclopedia Britannica*. Ημερομηνία πρόσβασης: Οκτωβρίου 15, 2021. [Έκδοση σε ψηφιακή μορφή]. Διαθέσιμο στο: <https://www.britannica.com/biography/Paracelsus>
- [166] 'PubChem'. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (ημερομηνία πρόσβασης Οκτωβρίου 02, 2021).
- [167] 'CompTox Chemicals Dashboard'. <https://comptox.epa.gov/dashboard> (ημερομηνία πρόσβασης Οκτωβρίου 02, 2021).
- [168] 'Food and Agriculture Organization of the United Nations', *PRD-FAO Home*. <https://www.fao.org/home/home/en> (ημερομηνία πρόσβασης Οκτωβρίου 16, 2021).
- [169] 'GHS Classification'. https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/ghs/#_haz (ημερομηνία πρόσβασης Οκτωβρίου 02, 2021).






Παράρτημα

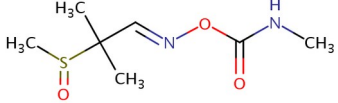

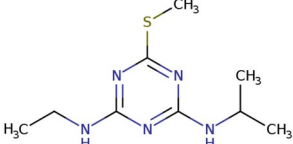

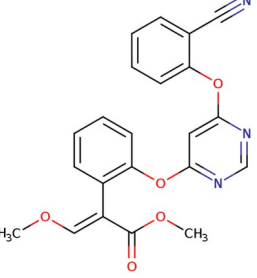

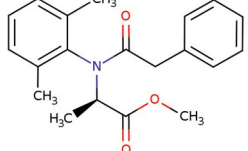

Πίνακας 1: Οι 72 αναλότες στόχοι (α.σ.) σε αλφαβητική σειρά και βασικές πληροφορίες για αυτούς. [30],[32],[166],[167],[168]

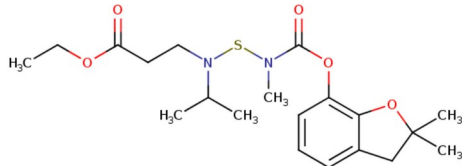

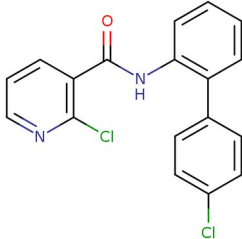

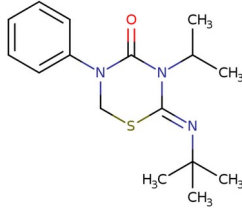

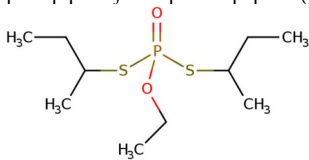

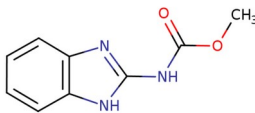

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Διοδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ. ³⁸	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009 ³⁹	Χημική ασφάλεια ⁴⁰
1	Acetamiprid	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	<p>Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια</p>  <p>(Z)-acetamiprid</p>	222,67	εντομοκτόνο	νεονικοτινοειδές	135410-20-7	εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
2	Alachlor	C ₁₄ H ₂₀ ClNO ₂		269,77	ζιζανιοκτόνο	οργανοχλωρίνη / χλωροακετανιλίδιο	15972-60-8	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
3	Aldicarb	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₂ S		190,26	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, νηματοκτόνο	καρβαμιδικό	116-06-3	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
4	Aldicarb sulfone (Aldoxycarb)	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₄ S		222,26	εντομοκτόνο, νηματοκτόνο, μεταβολίτης του Aldicarb στο έδαφος και σε οργανισμούς	καρβαμιδικό	1646-88-4	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος

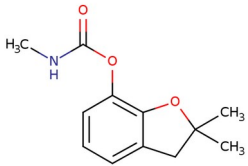

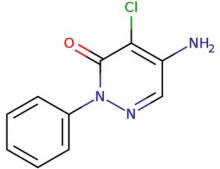

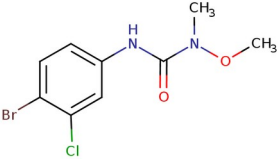

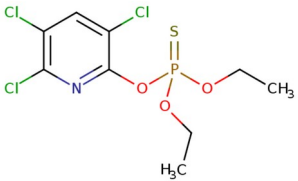

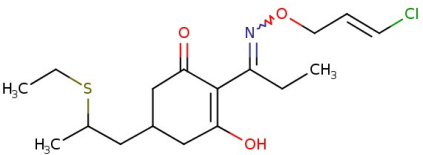

³⁸ Όπου αναφέρονται υποστρώματα μεταβολισμού (π.χ. έδαφος, φυτά, ζώα), αυτά είναι ενδεικτικά και όχι περιοριστικά.

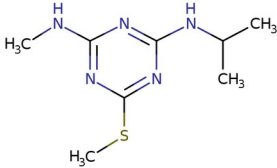

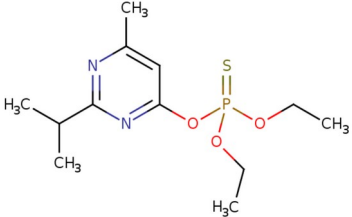

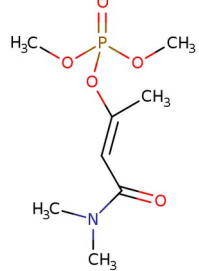

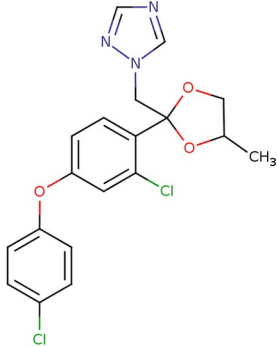

³⁹ Η τελευταία ενημέρωση πραγματοποιήθηκε στις 15.10.2021. [32],[166]

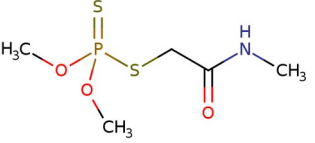

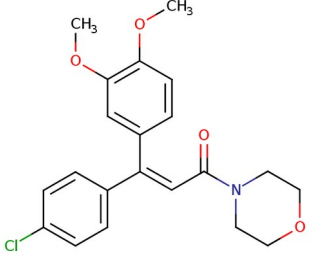

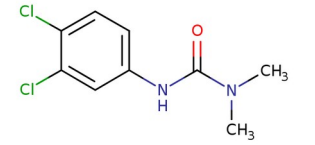

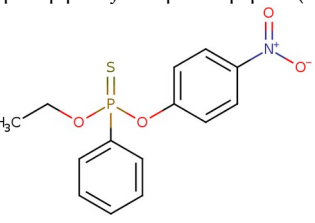

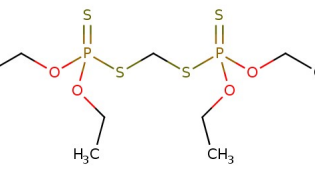

⁴⁰ Περιλαμβάνει τα εικονογράμματα και τις προειδοποιητικές λέξεις σύμφωνα με το Παγκόσμια Εναρμονισμένο Σύστημα του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals, GHS). [22] Τα εικονογράμματα αφορούν ως εξής: : ερεθιστικό, : κίνδυνος για την υγεία, : διαβρωτικό, : οξεία τοξικότητα, : κίνδυνος για το περιβάλλον. [169]

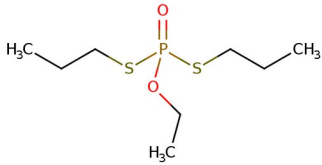

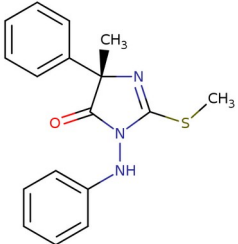

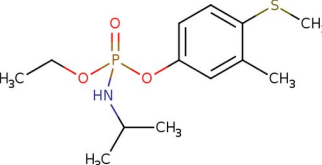

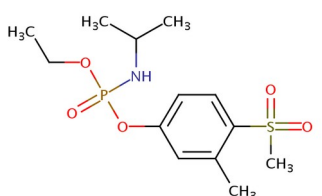

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
5	<i>Aldicarb sulfoxide</i>	C ₇ H ₁₄ N ₂ O ₃ S		206,27	μεταβολίτης του <i>Aldicarb</i> στο έδαφος, στα φυτά και στους αρουραίους (ουροποιητικό) και σε άλλους οργανισμούς	μη ταξινομημένο	1646-87-3	-	 Κίνδυνος
6	<i>Ametryn</i>	C ₉ H ₁₇ N ₅ S		227,33	ζιζανιοκτόνο	τριαζίνη (μεθυλθειο-1,3,5-τριαζίνη)	834-12-8	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
7	<i>Azoxystrobin</i>	C ₂₂ H ₁₇ N ₃ O ₅	Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια  (<i>E</i>)-azoxystrobin	403,38	μυκητοκτόνο	στρομπιλουρίνη	131860-33-8	εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
8	<i>Benalaxyl</i>	C ₂₀ H ₂₃ NO ₃	Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια. Διαθέτει 1 χειραλικό κέντρο (χ.κ.)  <i>benalaxyl-M</i> είναι το (<i>R</i>)-ισομερές του <i>Benalaxyl</i>	325,40	μυκητοκτόνο	ακυλαμινοξύ (φαινυλαμιδίο - ακυλαλανίνη)	71626-11-4	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή

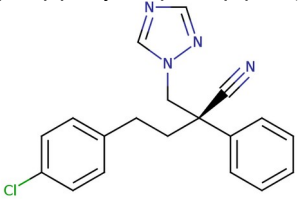

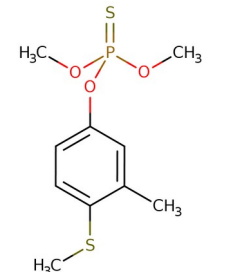

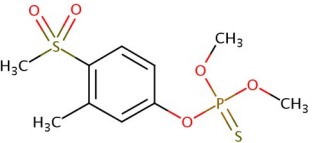

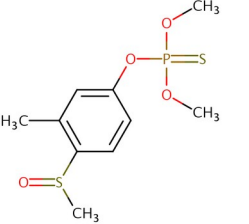

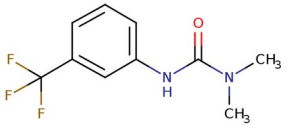

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
9	<i>Benfuracarb</i>	C ₂₀ H ₃₀ N ₂ O ₅ S		410,53	εντομοκτόνο, νηματοκτόνο	καρβαμιδικό	82560-54-1	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
10	<i>Boscalid</i>	C ₁₈ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O		343,20	μυκητοκτόνο	πυριδινο- καρβοξαμίδιο	188425-85-6	εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
11	<i>Buprofezin</i>	C ₁₆ H ₂₃ N ₃ OS	Το μόριο θεωρητικά εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια  απαντάται ωστόσο μόνο ως (Z)-buprofezin	305,44	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο	μη ταξινομημένο	69327-76-0	εγκεκριμένο	 Προσοχή
12	<i>Cadusafos</i>	C ₁₀ H ₂₃ O ₂ PS ₂	Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (2 χ.κ.) 	270,39	εντομοκτόνο, νηματοκτόνο	οργανοφωσφορικό	95465-99-9	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
13	<i>Carbendazim</i>	C ₉ H ₉ N ₃ O ₂		191,19	μυκητοκτόνο, μεταβολίτης των <i>Benomyl</i> , <i>Thiophanate- methyl</i> , <i>Thiophanate</i> στο έδαφος	καρβαμιδικό με βενζιμιδαζολική ομάδα	10605-21-7	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος

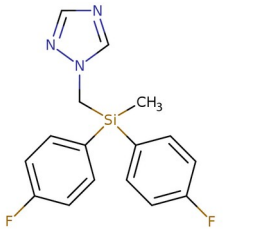

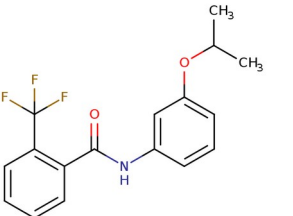

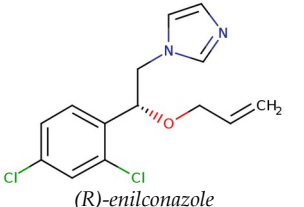

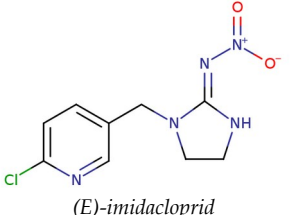

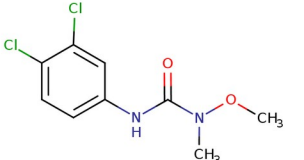

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
14	<i>Carbofuran</i>	C ₁₂ H ₁₅ NO ₃		221,25	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, νηματοκτόνο, μεταβολίτης των <i>Furathiocarb</i> , <i>Benfuracarb</i> , <i>Carbosulfan</i> στο έδαφος και στους ανθρώπους για το τελευταίο	καρβαμιδικό	1563-66-2	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
15	<i>Chloridazon</i>	C ₁₀ H ₈ ClN ₃ O		221,64	ζιζανιοκτόνο	πυραδοζιμόνη	1698-60-8	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
16	<i>Chlorobromuron</i>	C ₉ H ₁₀ BrClN ₂ O ₂		293,54	ζιζανιοκτόνο	ουρία	13360-45-7	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
17	<i>Chlorpyrifos-ethyl</i>	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS		350,58	εντομοκτόνο	οργανοφωσφορικό	2921-88-2	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
18	<i>Clethodim</i>	C ₁₇ H ₂₆ ClNO ₃ S	Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (1 χ.κ.) 	359,92	ζιζανιοκτόνο	κυκλοεξανοδιόνη	99129-21-2	εγκεκριμένο	 Προσοχή

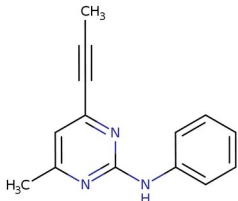

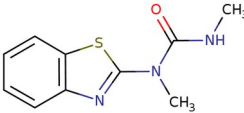

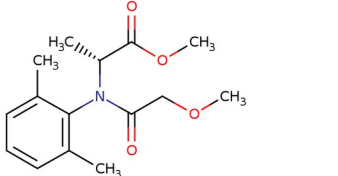

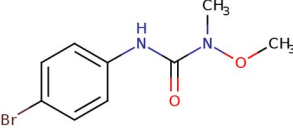

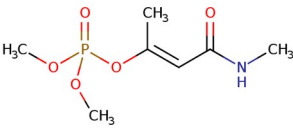

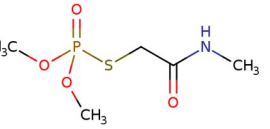

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
24	<i>Desmetryn</i>	C ₈ H ₁₅ N ₅ S		213,30	ζιζανιοκτόνο	τριαζίνη (μεθυλθειο-1,3,5- τριαζίνη)	1014-69-3	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
25	<i>Diazinon</i>	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS		304,35	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, εντομοαπωθητικό, κτηνιατρική ουσία	οργανοφωσφορικό	333-41-5	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
26	<i>Dicrotophos</i>	C ₈ H ₁₆ NO ₅ P	<p>Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια</p>  <p>(<i>E</i>)-<i>dicrotophos</i>: εμφανίζει ισχυρότερη εντομοκτόνο δράση</p>	237,19	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο	οργανοφωσφορικό	141-66-2	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
27	<i>Difenoconazole</i>	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	<p>Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (2 χ.κ.)</p> 	406,26	μυκητοκτόνο	τριαζόλη / διοξολάνη	119446-68-3	εγκεκριμένο	 Προσοχή

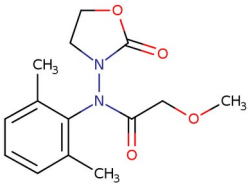

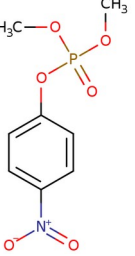

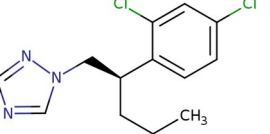



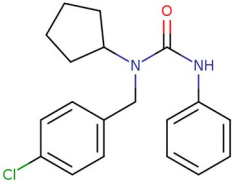

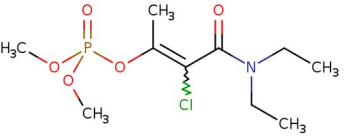



A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
28	<i>Dimethoate</i>	C ₅ H ₁₂ NO ₃ PS ₂		229,26	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, μεταβολίτης του <i>Formothion</i> στο έδαφος και σε φυτά	οργανοφωσφορικό	60-51-5	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
29	<i>Dimethomorph</i>	C ₂₁ H ₂₂ ClNO ₄	<p>Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια</p>  <p>Μόνο το (<i>E</i>)-<i>dimethomorph</i> εμφανίζει μυκητοκτόνο δράση</p>	387,86	μυκητοκτόνο	μορφολίνη	110488-70-5	εγκεκριμένο	
30	<i>Diuron</i>	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O		233,09	ζιζανιοκτόνο	φαινλουρία	330-54-1	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
31	<i>EPN</i>	C ₁₄ H ₁₄ NO ₄ PS	<p>Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (1 χ.κ.)</p> 	323,30	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο	οργανοφωσφορικό	2104-64-5	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
32	<i>Ethion</i>	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄		384,48	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, μεταβολίτης του <i>Chlormephos</i> στο έδαφος	οργανοφωσφορικό	563-12-2	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος

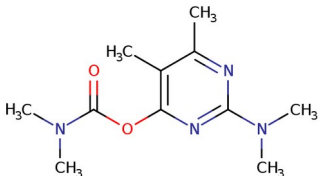

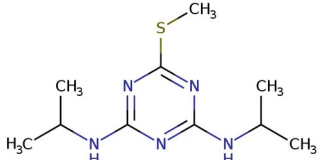

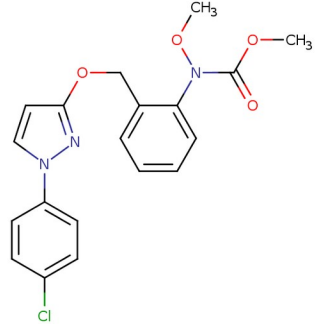

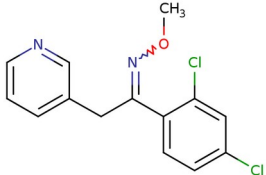

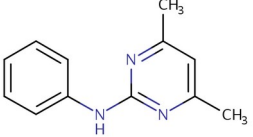

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
33	<i>Ethoprophos</i>	C ₈ H ₁₉ O ₂ PS ₂		242,34	εντομοκτόνο, νηματοκτόνο	οργανοφωσφορικό	13194-48-4	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
34	<i>Fenamidone</i>	C ₁₇ H ₁₇ N ₃ OS	Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (1 χ.κ.)  Μόνο το (S)-fenamidone είναι βιολογικά ενεργό	311,40	μυκητοκτόνο	ιμιδαζόλη	161326-34-7	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
35	<i>Fenamiphos</i>	C ₁₃ H ₂₂ NO ₃ PS	Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (1 χ.κ.) 	303,36	νηματοκτόνο	οργανοφωσφορικό	22224-92-6	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
36	<i>Fenamiphos sulfone</i>	C ₁₃ H ₂₂ NO ₅ PS		335,36	μεταβολίτης του <i>Fenamiphos</i> στο έδαφος, σε επιφανειακά και υπόγεια νερά, σε φυτά, αρουραίους κ.ά.	μη ταξινομημένο	31972-44-8	-	 Κίνδυνος

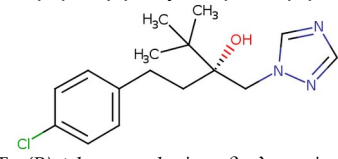

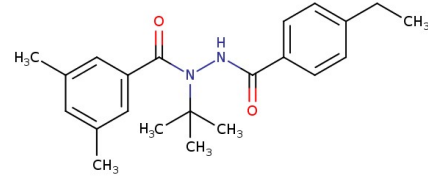

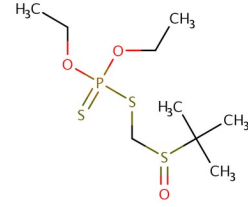

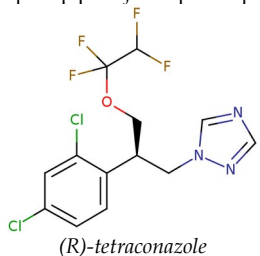

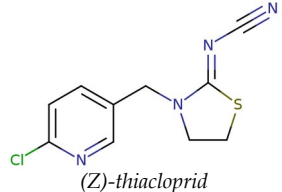

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
37	<i>Fenbuconazole</i>	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₄	<p>Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (1 χ.κ.)</p>  <p>(R)-fenbuconazole</p>	336,81	μυκητοκτόνο	τριαζόλη	114369-43-6	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
38	<i>Fenthion</i>	C ₁₀ H ₁₅ O ₃ PS ₂		278,33	ακαρεοκτόνο, κτηνιατρική ουσία, πιθηνοκτόνο	οργανοφωσφορικό	55-38-9	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
39	<i>Fenthion sulfone</i>	C ₁₀ H ₁₅ O ₅ PS ₂		310,33	μεταβολίτης του <i>Fenthion</i> στο έδαφος, σε αουραιούς κ.ά.	μη ταξινομημένο	3761-42-0	-	 Κίνδυνος
40	<i>Fenthion sulfoxide (Mesulfenfos)</i>	C ₁₀ H ₁₅ O ₄ PS ₂		294,33	εντομοκτόνο, μεταβολίτης του <i>Fenthion</i> στο έδαφος, σε αουραιούς κ.ά.	οργανοφωσφορικό	3761-41-9	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
41	<i>Fluometuron</i>	C ₁₀ H ₁₁ F ₃ N ₂ O		232,20	ζιζανιοκτόνο	φαινυλουρία	2164-17-2	εγκεκριμένο	 Προσοχή

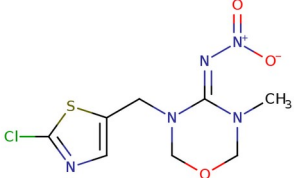

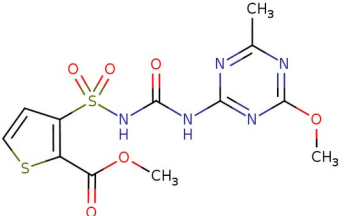

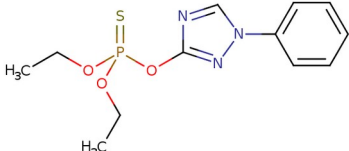

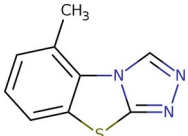

A/A	Ονομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
42	<i>Flusilazole</i>	C ₁₆ H ₁₅ F ₂ N ₃ Si		315,39	μυκητοκτόνο	τριαζόλη	85509-19-9	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
43	<i>Flutolanil</i>	C ₁₇ H ₁₆ F ₃ NO ₂		323,31	μυκητοκτόνο	βενζαμιδιο	66332-96-5	εγκεκριμένο	 Προσοχή
44	<i>Imazalil</i> (<i>Enilconazole</i>)	C ₁₄ H ₁₄ Cl ₂ N ₂ O	Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (1 χ.κ.)  (<i>R</i>)- <i>enilconazole</i>	297,18	μυκητοκτόνο, κτηνιατρική ουσία	ιμιδαζόλη / διχλωροβενζόλιο	35554-44-0	εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
45	<i>Imidacloprid</i>	C ₉ H ₁₀ ClN ₅ O ₂	Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια  (<i>E</i>)- <i>imidacloprid</i>	255,66	εντομοκτόνο, κτηνιατρική ουσία	νεονικοτινοειδές	138261-41-3	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
46	<i>Linuron</i>	C ₉ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₂		249,09	ζιζανιοκτόνο	φαινολουρία	330-55-2	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος

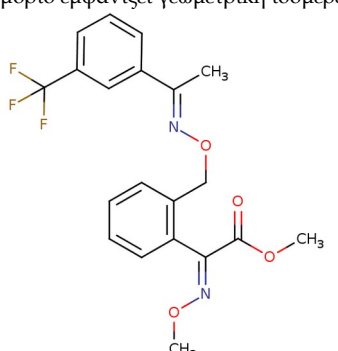

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
47	<i>Mepronipyrin</i>	C ₁₄ H ₁₃ N ₃		223,27	μυκητοκτόνο, βακτηριοκτόνο, συντηρητικό ξύλων	αντλιοπορμιδίνη	110235-47-7	εγκεκριμένο	 Προσοχή
48	<i>Methabenz- thiazuron</i>	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ OS		221,28	ζιζανιοκτόνο	βενζοθειαζόλη / ουρία	18691-97-9	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
49	<i>Metalaxyl-M</i>	C ₁₅ H ₂₁ NO ₄	Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (1 χ.κ.)  Το <i>metalaxyl-M</i> είναι το βιολογικά δραστικό εναντιομερές (<i>R</i> -ισομερές) του <i>metalaxyl</i> .	279,33	μυκητοκτόνο	φαινυλαμιδίο	70630-17-0	εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
50	<i>Metobromuron</i>	C ₉ H ₁₁ BrN ₂ O ₂		259,10	ζιζανιοκτόνο	φαινυλουρία	3060-89-7	εγκεκριμένο	 Προσοχή
51	<i>Monocrotophos</i>	C ₇ H ₁₄ NO ₅ P		223,16	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο	οργανοφωσφορικό	6923-22-4	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
52	<i>Omethoate</i>	C ₅ H ₁₂ NO ₄ PS		213,19	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, μεταβολίτης του <i>Dimethoate</i> στο έδαφος, σε οργανισμούς και στον άνθρωπο	οργανοφωσφορικό	1113-02-6	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
53	<i>Oxadixyl</i>	C ₁₄ H ₁₈ N ₂ O ₄		278,30	μυκητοκτόνο	Φαινυλαμίδιο / οξαζολιδινόνη	77732-09-3	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
54	<i>Paraoxon-methyl</i>	C ₈ H ₁₀ NO ₆ P		247,14	μεταβολίτης του <i>Parathion-methyl</i> σε αρουραίους κ.ά.	οξόνιο (οξυγονωμένο ανάλογο του μητρικού εντομοκτόνου <i>Parathion-methyl</i>)	950-35-6	-	 Κίνδυνος
55	<i>Penconazole</i>	C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ N ₃	Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια (1 χ.κ.)  <i>(R)-penconazole</i>	284,18	μυκητοκτόνο	τριαζόλη	66246-88-6	εγκεκριμένο	   Προσοχή
56	<i>Pencycuron</i>	C ₁₉ H ₂₁ ClN ₂ O		328,83	μυκητοκτόνο	φαινυλουρία	66063-05-6	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
57	<i>Phosphamidon</i>	C ₁₀ H ₁₉ ClNO ₅ P	Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια 	299,69	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο	οργανοφωσφορικό	13171-21-6	μη εγκεκριμένο	   Κίνδυνος

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
58	<i>Pirimicarb</i>	C ₁₁ H ₁₈ N ₄ O ₂		238,29	εντομοκτόνο	καρβαμικό	23103-98-2	εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
59	<i>Prometryn</i>	C ₁₀ H ₁₉ N ₅ S		241,36	ζιζανιοκτόνο	τριαζίνη (μεθυλθειο-1,3,5- τριαζίνη)	7287-19-6	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
60	<i>Pyraclostrobin</i>	C ₁₉ H ₁₈ ClN ₃ O ₄		387,81	μυκητοκτόνο	στρομπιλουρίνη	175013-18-0	εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
61	<i>PyrifenoX</i>	C ₁₄ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O	Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια 	295,16	μυκητοκτόνο	πυριδίνη	88283-41-4	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
62	<i>Pyrimethanil</i>	C ₁₂ H ₁₃ N ₃		199,25	μυκητοκτόνο	ανλινοπυριμιδίνη	53112-28-0	εγκεκριμένο	

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
63	<i>Tebuconazole</i>	C ₁₆ H ₂₂ ClN ₃ O	<p>Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια</p>  <p>Το (R)-<i>tebuconazole</i> είναι βιολογικά πιο δραστικό από το (S)-<i>tebuconazole</i>.</p>	307,82	μυκητοκτόνο, ρυθμιστής ανάπτυξης σε φυτά	τριαζόλη /δ-ταγής αλκοόλη	107534-96-3	εγκεκριμένο	 Προσοχή
64	<i>Tebufenozide</i>	C ₂₂ H ₂₈ N ₂ O ₂		352,48	εντομοκτόνο	διακυλυδραζίνη	112410-23-8	εγκεκριμένο	 Προσοχή
65	<i>Terbufos sulfoxide</i>	C ₉ H ₂₁ O ₃ PS ₃		304,42	μεταβολίτης του <i>Terbufos</i> στο έδαφος, σε αρουραίους και αίγες	μη ταξινομημένο	10548-10-4	-	 Κίνδυνος
66	<i>Tetraconazole</i>	C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ F ₄ N ₃ O	<p>Το μόριο εμφανίζει στερεοϊσομέρεια</p>  <p>(R)-<i>tetraconazole</i></p>	372,14	μυκητοκτόνο	τριαζόλη	112281-77-3	εγκεκριμένο	 Προσοχή
67	<i>Thiacloprid</i>	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	<p>Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια</p>  <p>(Z)-<i>thiacloprid</i></p>	252,72	εντομοκτόνο, μαλακιοκτόνο	νεονικοτινοειδές	111988-49-9	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
68	<i>Thiamethoxam</i> (Actara)	C ₈ H ₁₀ ClN ₅ O ₃ S	<p>Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια</p>  <p>(E)-thiamethoxam</p>	291,71	εντομοκτόνο	νεονικοτινοειδές	153719-23-4	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή
69	<i>Thifensulfuron- methyl</i>	C ₁₂ H ₁₃ N ₅ O ₆ S ₂		387,39	ζιζανιοκτόνο	σουλφονουρία	79277-27-3	εγκεκριμένο	 Προσοχή
70	<i>Triazophos</i>	C ₁₂ H ₁₆ N ₃ O ₃ PS		313.31	εντομοκτόνο, ακαρεοκτόνο, νηματοκτόνο	οργανοφωσφορικό	24017-47-8	μη εγκεκριμένο	 Κίνδυνος
71	<i>Tricyclazole</i>	C ₉ H ₇ N ₃ S		189,24	μυκητοκτόνο	τριαζολοβενζο- θειαζόλη	41814-78-2	μη εγκεκριμένο	 Προσοχή

A/A	Όνομασία μορίου	Μοριακός τύπος	Συντακτικός τύπος - Δισδιάστατη Δομή (2D)	M _R (g/mol)	Κατηγορία α.σ.	Ομάδα	Αριθμός μητρώου CAS	Τρέχουσα κατάσταση ως προς τον ΕΚ 1107/2009	Χημική ασφάλεια
72	<i>Trifloxystrobin</i>	C ₂₀ H ₁₉ F ₃ N ₂ O ₄	<p>Το μόριο εμφανίζει γεωμετρική ισομέρεια</p>  <p>(<i>E,E</i>)-trifloxystrobin</p>	408,38	μυκητοκτόνο	στρομπιλουρίνη	141517-21-7	εγκεκριμένο	 Προσοχή

-: μη εφαρμόσιμο