POLITEHNIKA NOVA GORICA

POSLOVNO-TEHNIŠKA ŠOLA

DIPLOMSKA NALOGA

OCENA UPRAVICENOSTI UVEDBE POSTOPKA ZA ODKRIVANJE PRISOTNOSTI ORGANOFOSFATNIH PESTICIDOV

Primož Bacar

Mentor: Prof. dr. Mladen Franko

Nova Gorica, 2005

ZAHVALA

Diplomska naloga zahteva veliko znanja pridobljenega med študijem in tudi veliko izkušenj iz prakse, zato je velikega pomena pri izdelavi diplomske naloge tudi pomoc mentorja. Zato se zahvaljujem prof. dr. Mladenu Franku za vso pomoc in podporo pri izdelavi diplomske naloge.

Prav tako se zahvaljujem podjetju Fructal in še posebej mag. Irmi Koren za informacije v zvezi s podjetjem, ki sem jih potreboval za izdelavo diplomske naloge.

Zahvala gre tudi vsem mojim bližnjim, ki so me podpirali in vzpodbujali.

IZVLECEK

V nalogi je predstavljen pregled analiznih tehnik za detekcijo in dolocevanje lastnosti pesticidov in pa nova bioanalizna metoda za detekcijo organofosfatnih in karbamatnih pesticidov. Glavna tema diplomske naloge je analiza upravicenosti uvedbe nove bioanalizne metode, ki bi pripomogla k boljšemu nadzoru vhodnih surovin in s tem zmanjšanju možnosti nastanka vecje ekonomske škode v podjetju. Opisan je ekonomski vidik, kjer kljucni dejavniki kažejo, da je vpeljava bioanalizne metode kot nacina preverjanja vhodnih surovin smiselna.

KLJUCNE BESEDE

Organofosfatni in karbamatni pesticidi, bioanalizne metode, inhibicija encima acetilholinesteraze, kromatografske tehnike, plinska kromatografija, tekocinska kromatografija, biosenzorji,

ABSTRACT

This thesis describes the analytical tecnology used for detection of pesticides and also a new bioanalyitical method for detection of organophosphate and carbamate pesticides. At the core of this report is the analysis of economic factors and justification for introduction of a new bioanalyitical method. This method can provide better control over the primary materials and reduce the possibility of a larger economical damage. The economical advantages of this method are described in comparison to well established methods of chemical analysis. It was find out that the bioanalytical method is in our case very useful and its introduction economically justified.

KEY WORDS

Organophosphate and carbamate pesticides, bioanalyitical method, cholinesterase inhibition, cromatographic methods, gas cromatography, liquid cromatography, biosensors

KAZALO

1. PREDSTAVITEV PODJETJA 1

2. UVOD 3

3. PESTICIDI IN METODE ZA DETEKCIJO 4

3.1. PESTICIDI 4

3.2. Pesticidi in njihovi vplivi na okolje 7

3.3. Zakonodaja 8

3.3.1. Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili 8

3.3.2. Pravilnik o higieni živil 9

3.3.3. Pravilnik o ostankih pesticidov v oziroma na živilih in kmetijskih pridelkih 10

3.4. Kromatografske tehnike za odkrivanje organofosfornih pesticidov 10

3.4.1. Plinska kromatografija – GC 11

3.4.2. Tekocinska kromatografija – HPLC 12

4. BIOSENZORJI 15

4.1. Kaj so biosenzorji 15

4.2. Biosenzorji za detekcijo pesticidov 17

4.3. Optotermicni biosenzor 19

4.3.1. Analiza razlicnih pesticidov z razlicnimi bioanalitskimi kolonami 22

4.3.2. Prednosti uporabe optoptermicnih biosenzorjev 22

4.3.3. Analiza vzorcev sokov s pomocjo optotermicnega biosenzorja 23

5. OCENA UPRAVICENOSTI 24

5.1. Opredelitev projekta uvedbe novega nacina testiranja prisotnosti pesticidov v sadju..... 24

5.2. Okvirne analize lastnosti projekta 26

5.2.1. Tehnicno – tehnološke znacilnosti projekta..... 26

5.2.2. Delovna sila..... 26

5.2.3. Predvidena vrednost investicije vpeljave nove analizne tehnike 27

5.2.4. Variabilni stroški..... 28

5.2.5. Amortizacija crpalke in spektrofotometra kot osnovnih sredstev..... 28

5.3. Primerjava stroškov analize med kromatografsko analizno metodo in bioanalizno metodo..... 29

5.4. Simulacija možne ekonomske škode 31

5.4.1. Vsebnost pesticidov v sadni kaši v skladišcni cisterni..... 32

5.4.2. Vsebnost pesticidov v koncnem proizvodu 32

5.4.3. Primerjava simulacij 33

5.5. Ugotavljanje verjetnosti odkritja pesticidov pri analizi vhodnih surovin..... 34

5.5.1. Definicija verjetnosti..... 34

5.5.2. Ugotavljanje možnosti odkritja pesticidov s pomocjo uporabe matematicnega postopka za ugotavljanje verjetnosti..... 35

5.6. Zakljucki in predlogi..... 37

6. LITERATURA..... 39

KAZALO SLIK

Slika 1. Shematski prikaz plinskega kromatografa. 11

Slika 2. Shematski prikaz sestave in delovanja biosenzorja. 16

Slika 3. Inhibicijski mehanizem med encimom holinesterazo in organofosfatnim pesticidom..... 18

Slika 4. Možne oblike imobilizacije biokemijsko aktivnih snovi..... 18

Slika 5. Prikaz signalov, ki jih pri bioanalizni metodi z AChE zazna detektor med analizo vzorca, ki vsebuje pesticid 21

Slika 6. Proces predelave sadja. 25

Slika 7. Primerjava stroškov in prihrankov..... 30

Slika 8. Proces izdelave sadnega soka. 31

Slika 9. Primerjava možne ekonomske škode in vrednosti investicije. 33

KAZALO TABEL

Tabela 1. Pesticidi za posamezne vrste škodljivcev 5

Tabela 2. Razvrstitev pesticidov glede na kemicno sestavo. 6

Tabela 3**.** Letni stroški dela. 27

Tabela 4**.** Vrednost investicije vpeljave nove analizne tehnike. 27

Tabela 5. Casovno amortiziranje – sorazmerno 28

Tabela 6**.** Prikaz letnih stroškov uporabe bioanalizne metode. 29

Tabela 7**.** Primer nastale škode na koncnem proizvodu. 33

1. PREDSTAVITEV PODJETJA

Zacetki podjetja Fructal segajo v leto 1945, ko je bilo ustanovljeno Pokrajinsko podjetje za izvoz in predelavo sadja, prvotna dejavnost tega podjetja pa je bila proizvodnja brinjevega destilata. Leta 1948 je bil vgrajen prvi kotel za proizvodnjo džemov, podjetje pa je dobilo ime Tovarna likerjev in sadnih sokov. V letu 1950 je podjetje zašlo v hudo krizo, zato so ga kot državno podjetje likvidirali in leta 1953 prikljucili trgovskemu podjetju Rastlina iz Šempetra pri Novi Gorici. Leta 1954 je na prošnjo delavskega sveta podjetje spet postalo samostojno.

Leta 1955 je podjetje dobilo ime Fructal – Sadno likerski kombinat Ajdovšcina.

Po letu 1960 se je pricela proizvodnja sadnih sokov, najprej sicer z zastarelo tehnologijo, nato pa z vedno vecjim posodabljanjem tehnoloških postopkov predelave sadja in proizvodnje sadnih sokov, predelave sadja v maticne sokove, v pasterizirane marke, sterilnega skladišcenja polproizvodov in prvih avtomatskih linij za polnjenje sokov. V teh letih intenzivnega razvoja je bila kakovost proizvodov glavno vodilo. Strokovni delavci so se v skrbi za zdravo življenje zavestno odlocili za zahtevnejšo proizvodnjo sokov brez kemijskih konzervansov

Leta 1971 se je podjetju pridružilo podjetje Alko, novo podjetje pa je dobilo ime Fructal – Alko. Podjetji sta se združili zaradi sorodnosti programov in skupnega nastopa na trgu. Alko je namrec proizvajal alkoholne pijace in sirupe, Fructal pa sadne sokove.

Visoki transportni stroški, visoka kala in slabša kakovost surovine po dolgem transportu so narekovala izgradnjo hladilnice in predelovalnih linij za proizvodno zamrznjenih polproizvodov v bližini surovinske osnove. Tako je bila leta 1973 zgrajena tovarna Frigos v Celicu v tedanji republiki Bosni in Hercegovini.

V letih od 1974 do 1990 je potekalo posodabljanje in investiranje v proizvodnje linije. Prav tako pa je Fructal v tem casu odkupil obrat Irig sredi najvecjih nasadov sadja v Srbiji.

Leto 1991 je bilo za Fructal ponovno velik mejnik v zgodovini. Z osamosvojitvijo Slovenije so se dotedanji cilji biti najkakovostnejši in najvecji proizvajalec sadnih

sokov ter biti prvi z novimi sorodnimi programi na Jugoslovanskem trgu, porušili. Podjetje je bilo postavljeno pred nove izzive iskanja novih nabavnih in prodajnih trgov. V obdobju do leta 1996 je podjetje izpeljalo dva vecja projekta in sicer izgradnja in pridobitev certifikata po sistemu kakovosti ISO 9001 ter lastninsko preoblikovanje podjetja. Podjetje je postalo delniška družba in s tem se je zacela izgradnja nove celostne podobe podjetja.

Z letom 1999 se je pricela posodobitev programov in poenotenje blagovnih znamk (Frutek, Frutabela ter alkoholne pijace Matiss in Prior).

Leto 2000 je bilo v znamenju nakupa podjetja v Makedoniji – Fruktal Mak a.d.in pa uvedbe nove tehnologije za asepticno polnjenje pijac v plastenke z blagovno znamko Fruc.

V letu 2001 postane vecinski lastnik Pivovarna Union d.d.. v proizvodnji pa se vzpostavi sistem HACCP:

Do leta 2003 je zakljucena investicija v linijo KHS in na trgu se pojavi novo oblikovana modra 200 ml steklenicka s sokovi in sadnimi pijacami.

2. UVOD

V diplomski nalogi bom poizkusil prikazati vidike upravicenosti uvedbe nove tehnologije ugotavljanja prisotnosti organofosfatnih pesticidov v sadju. Osnovana je na tako imenovanih bioanaliznih metodah, sam postopek pa temelji na inhibiciji encima acetilholinesteraze, ki jo povzrocajo organofosfatni pesticidi. Prednost nove oblike detekcije tovrstnih pesticidov je poleg nižjih stroškov in enostavnosti predvsem hitrost izvajanja postopka detekcije, kar prakticno omogoca 100% nadzor vhodnih vzorcev. Namen uvedbe novega nacina nadzora kakovosti vhodnih surovin je predvsem zmanjšanje možnosti, da bi v proizvodnji sokov prišlo do vecje ekonomske škode zaradi neodkrite prisotnosti organofosfatnih pesticidov v sadju kot surovini. Verjetnost take škode ni zanemarljiva, saj sedanji nacin nadzora kakovosti vhodnih surovin s standardnimi analiznimi metodami zaradi dolgotrajnosti postopkov, zahtevne instrumentacije in visokih stroškov, omogoca preverjanje le kakih 10% vzorcev. Z novo analizno metodo pa je možno opraviti analizo do 10 vzorcev na uro, kar pomeni, da je mogoce analizirati vse vhodne surovine, ki služijo za izdelavo sadnih sokov.

Glavni cilji diplomske naloge so predvsem primerjava tehnicnih znacilnosti standardnih analiznih metod in novega nacina detekcije organofosfatnih pesticidov v sadju, na primerjavi osnovana analiza stroškov za posamezno metodologijo detekcije in primerjava stroškov uvedbe nove metodologije nadzora kakovosti surovin z morebitnimi stroški neugotovljene kontaminacije vhodnih surovin.

3. PESTICIDI IN METODE ZA DETEKCIJO

3.1. Pesticidi

V kmetijstvu in kemicni industriji uporabljamo razlicne toksicne kemijske snovi, ki so stabilne v naravi in posledicno onesnažujejo velika podrocja našega okolja. Ena izmed pomembnejših skupin onesnaževalcev okolja so tudi pesticidi, ki jih uporabljamo na vec podrocjih v velikih kolicinah. Vecina pesticidov je mocno toksicnih in se poleg tega nekateri lahko kopicijo v organizmih, kar lahko pripelje do dolocenih obolenj.

V zadnjih 60 letih smo bili prica pomembnemu napredku v razvoju pesticidov. Kot posledica narašcanja števila prebivalstva se je povecala tudi potreba po vecjih kolicinah pridelane hrane in posledicno se je povecala tudi uporaba kemicnih snovi za zatiranje škodljivcev.

Pesticidi so snovi, ki jih v kmetijstvu uporabljamo za zatiranje škodljivcev, plevelov in rastlinskih bolezni. Uporabljamo jih tudi na podrocjih, kot so gozdarstvo, lesarstvo, ladjedelništvo itd. Po svojem nastanku so lahko naravne snovi, izolirane iz rastlin ali umetno pridobljene s sintezo. Predvsem te pa lahko ob neustrezni uporabi ogrožajo tako cloveka kot ekosfero (biosfero).

Pesticidi naj bi selektivno unicevali doloceno vrsto škodljivcev, vendar se v praksi dostikrat izkaže drugace. Po dolocenem casu lahko namrec dolocena vrsta škodljivcev pridobi naravno odpornost in tako je treba na novo sintetizirati še bolj toksicne pesticide. Stopnja toksicnosti razlicnih pesticidov je zaradi njihove kemicne sestave razlicna. Negativni vpliv pesticidov na cloveški organizem je odvisen predvsem od koncentracije pesticida, ki vstopa v okolje, nacina uporabe, stopnje razgradljivosti, obstojnosti v okolju, sposobnosti bioakumulacije in biokoncentracije, vkljucevanja v prehranjevalne verige, mutagenosti, genotoksicnosti in še mnogih drugih dejavnikov. Pesticid, ki ga uporabljamo za zatiranje škodljivcev, je v bistvu aktivna substanca, ki je v doloceni koncentraciji primešana inertnemu mediju. Inertna komponenta je nosilec oziroma stabilizator aktivne substance in je obenem pomembna pri nanašanju pesticida (Baird,1999). Oba skupaj sestavljata pripravek-fitofarmacevtsko sredstvo, ki se ponavadi prodaja pod komercialnim imenom. Tako

na primer pripravek, imenovan kot deherban A ali dikocid vsebuje 264g/L fenoksi herbicida 2,4 D. Imeni sta razlicni, ker ju proizvajata dva razlicna proizvajalca. Najpogostejši sta dve razvrstitvi pesticidov in sicer glede na ciljno skupino organizmov, ki jih posamezna skupina pesticidov unicuje (Tabela 1) in glede na kemicno sestavo (Tabela 2).

Tabela 1. Pesticidi za posamezne vrste škodljivcev

Ciljna skupina organizmov	**Skupina pesticidov**	**Komercialna imena**
glivice, bakterije	fungicidi	Kaptan, Benomil, Triadimefon, Folpet, Mankozeb
žuželke	insekticidi	DDT, Metidation, Metomil, Lindan, Heptaklor
pleveli	herbicidi	Atrazin, Alaklor, Simazin, 2,4-D
pršice	akaricidi	Dikofol, Propargit, Klorfentazin
glodalci	rodenticidi	Endrin, Varfarin, Cinkfosfid
polži	limacidi	Metaldehid, Metiokarb

Tabela 2. Razvrstitev pesticidov glede na kemicno sestavo.

Kemicna skupina	**Nekatere aktivne snovi**
ORGANOFOSFATNI - fosfatni estri - fosfotio estri	fosfamidon, dikrotofos, matamidofos klorpirifos, diazinon, malation
KARBAMATNI - tiokarbamati - ditokarbamati	karbaril, klorprofam, propoksur butilat, tiobenkarb tiram
ORGANOKLORNI - diklorodifeniletani - ciklodieni - klorirani benzeni in cikloheksani	DDT, dikofol, metoksiklor klordan, dieldrin, eldrin, toksafen heksaklorobenzen-HCB, heksaklorocikloheksan-HCHs
KLORFENOKSIKISLINE	2-metil-4-klorofenoksi-ocetna kislina (2,4-D), MCPA, silveks
DRUGI - acetanilidi - bipiridili - fenilureati - ftalimidi - triazini	alaklor, metolaklor paraquat, diquat diuron, linuron kaptan, folpet atrazin, simazin cianazin, desetilatrazin

3.2. Pesticidi in njihovi vplivi na okolje

Pesticide v glavnem uporabljamo za povecanje kmetijske proizvodnje, preprecevanje nekaterih bolezni, npr. malarije in za javno higieno. Zaradi vse vecje in velikokrat nepravilne uporabe fitofarmacevtskih pripravkov za zatiranje škodljivcev pa lahko najdemo pesticide in njihove metabolite (razgradne produkte) tudi v razlicnih živilih, vodi, okolju in celo v samemu cloveku. Zato so ostanki pesticidov v živilih in vodi dandanes zdravstveni problem v svetu.

Organoklorni pesticidi so topni v nepolarnih topilih in mašcobah ter so zelo obstojni v naravi. Zaradi njihove lipofilnosti lahko pridejo z mastmi, olji in voski preko hrane v toplokrvne organizme, kjer se delno metabolizirajo in izlocijo, delno pa se nabirajo v mašcobnem tkivu, jetrih, mlecni mašcobi in organih. Tako najdemo v živilih živalskega izvora pesticide predvsem v mašcobnem tkivu ter mesu in organih, ki vsebujejo mašcobo oziroma mašcobno tkivo, nadalje v mleku in mlecnih izdelkih, kot tudi v jajcih in ribah. Seveda pa lahko zaužijemo pesticide iz skupine kloriranih ogljikovodikov tudi s sadjem in zelenjavo, z žitaricami ter njihovimi izdelki. Glavni kontaminanti hrane iz skupine organoklornih pesticidov so: DDT s svojimi metaboliti, HCH in lindan, redkeje pa dieldrin, heptaklor, toksafen in njihovi metaboliti. Ugotovljeno je, da so pesticidi kontaminirali znatne površine zemlje, ceprav le-te niso neposredno obdelovali s pesticidi. S pesticidi kontaminiran prah se lahko namrec prenaša po zraku (atmosferi) in odloži na površine, ki so precej oddaljene od kraja uporabe le-teh. Prav tako se lahko organoklorni pesticidi prenesejo iz tal v dele rastlin, ki so namenjene za prehrano živine. Kontaminacija vod je lahko posledica predvsem izpiranja s površin, posledica aplikacije pesticidov v vodo in tudi nakljucne kontaminacije poljedelskih površin ali industrijskih odpadnih voda (Baird, 1999).

Potencialna nevarnost pesticidov za cloveka je dandanes ocenjena v glavnem iz rezultatov raziskav na živalih in ekstrapolacij na cloveka, izjemoma pa na primeru ljudi, ki so poklicno v stalnem stiku s pesticidi. Kolicine, ki jih clovek s hrano vnaša v organizem lahko povzrocajo znacilne biokemijske poškodbe, pretežno encimatske narave, s cemer lahko porušijo ravnovesje organizma. Zaradi obstojnosti, toksicnosti in kumulativne narave organoklornih pesticidov jih vse bolj zamenjujejo z

organofosfatnimi pesticidi. Organofosfatni pesticidi imajo namrec naslednje lastnosti: širok spekter uporabe in hitro delovanje na škodljivce, kratko casovno obstojnost in razpadanje v metabolite, vodotopnost ter sorazmerno majhno porabo preparata na enoto obdelovalne površine. Vendar pa imajo organofosfatni pesticidi tudi dolocene slabe lastnosti pri stalnem vnašanju v telo, hrano in vodo saj lahko povzrocijo zmanjšanje aktivnosti encima acetilholinesteraze, ki je potrebna za pravilen prenos živcnih impulzov v organizmu in nemoteno delovanja živcnega sistema (Baird, 1999).

3.3. Zakonodaja

Zakonodaja ureja podrocje vsebnosti pesticidov z naslednjimi akti:

- ? Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili (Uradni list RS, št. 52 – 6949/00)
- ? Pravilnik o higieni živil (Uradni list RS, št. 60 – 6293/02)
- ? Pravilnik o ostankih pesticidov v oziroma na živilih in kmetijskih pridelkih (Uradni list RS, št. 82 – 10210/04).

Poudariti je potrebno, da navedena zakonodaja predpisuje, da mora proizvajalec živila zagotoviti ustreznost proizvedenega živila predpisanim parametrom oziroma kriterijem, ne predpisuje pa nobenega nadzora. To pomeni, da mora vsak proizvajalec zase postaviti kriterije nadzora, da bo lahko zagotavljal proizvodnjo zdravstveno neoporecnih živil.

3.3.1. Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili

Ta zakon doloca pogoje, ki jih morajo izpolnjevati živila, dodatki za živila in izdelki ter snovi, ki prihajajo v stik z živili, da so zdravstveno ustrezni, ter ureja zdravstveni nadzor nad njihovo proizvodnjo in prometom z namenom, da se varuje zdravje ljudi, zašcitijo interesi potrošnika in omogoca nemoten promet na notranjem trgu in s tujino, spremljanje (monitoring) zdravstvene ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili ter medresorsko in mednarodno sodelovanje na podrocju zdravstvene problematike prehrane in prehranske politike. V 6. clenu zakon doloca,

da so živila zdravstveno ustrezna oziroma varna, ce ostanki pesticidov in zdravil za veterinarsko uporabo, ki so na osnovi dobre kmetijske in veterinarske prakse pricakovana posledica uporabe teh snovi v postopkih pridelave kmetijskih pridelkov oziroma surovin živalskega izvora, ne presegajo najvišje dovoljene koncentracije (Uradni list RS, št. 52 – 6949/00).

3.3.2. Pravilnik o higieni živil

Pravilnik o higieni živil doloca pogoje in nacela higiene živil, ki morajo biti izpolnjeni pri proizvodnji in prometu živil. Poleg pogojev iz tega pravilnika morajo biti glede higiene živil pri proizvodnji in prometu živil za javno prehrano in pri ravnanju z zamrznjenimi živili izpolnjeni tudi pogoji, ki jih dolocajo posebni predpisi. V okviru tega pravilnika se dva clena nanašata oziroma obsegata tudi podrocje vsebnosti pesticidov.

Clen 6. tega pravilnika pravi, da mora nosilec živilske dejavnosti zaradi varovanja zdravja ljudi in preprecevanja okužb z živili zagotavljati, da živila namenjena koncnemu potrošniku, ustrezajo obveznim ali lastnim mikrobiološkim in drugim zahtevam (Uradni list RS, št. 60 – 6293/02).

Clen 22. tega pravilnika pa pravi, da živilski obrat ne sme od dobaviteljev sprejemati surovin in sestavin za katere je znano ali za katere se sumi oziroma predvideva, da vsebujejo biološke, kemicne ali dejavnike tveganja in ki bi bile po standardnih postopkih dela (sortiranja in priprave, obdelave oziroma predelave), ki se v obratih izvajajo na higienski nacin, še vedno neprimerne za prehrano ljudi. Dobavitelj mora predložiti dokazila, s katerimi potrjuje, da so dobavljena živila oziroma surovine zdravstveno ustrezni (Uradni list RS, št. 60 – 6293/02).

3.3.3. Pravilnik o ostankih pesticidov v oziroma na živilih in kmetijskih pridelkih

Ta pravilnik doloca mejne vrednosti ostankov pesticidov v oziroma na živilih rastlinskega in živalskega izvora in kmetijskih pridelkih. Opredeljuje tudi živila in kmetijske pridelke za katere so dolocene mejne vrednosti ostankov pesticidov, ter postopke vzorcenja in analize vzorcev za ugotavljanje skladnosti z mejnimi vrednostmi ostankov pesticidov. V prilogi tega pravilnika najdemo seznam živil in kmetijskih pridelkov, za katere so dolocene mejne vrednosti ostankov pesticidov in seznam pesticidov za katere so dolocene mejne vrednosti (Uradni list RS, št. 82 – 10210/04).

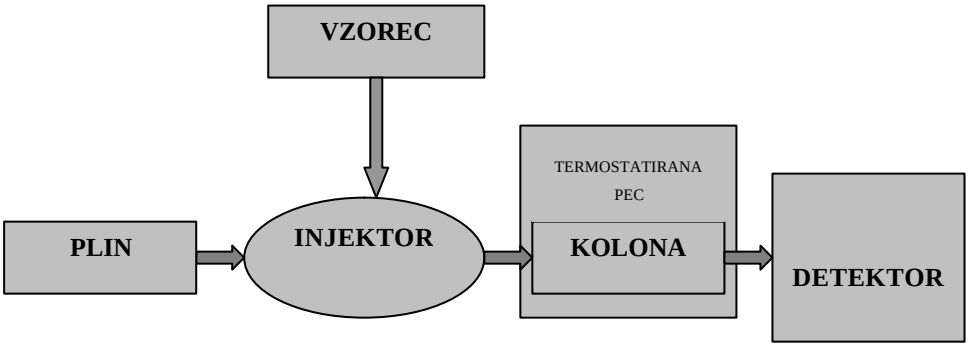
3.4. Kromatografske tehnike za odkrivanje organofosfornih pesticidov

Kromatografija je fizikalno-kemijska metoda separacije, kjer se komponente vzorca locujejo na osnovi razlicnih adsorpcijsko-desorpcijskih mehanizmov ali kemisorpcije, ki so doloceni z lastnostmi stacionarne in mobilne faze. Mobilna faza pronica skozi stacionarno fazo v doloceni smeri. Kromatografska separacija je posledica selektivnega zadrževanja komponent na stacionarni fazi (trdna površina ali nemobilna tekocina), ki se odraža v razlicni hitrosti potovanja posameznih komponent vzorca pod vplivom mobilne faze (plin, tekocina). Je rezultat ponavljajocega procesa sorpcije in desorpcije na stacionarni fazi (Žorž, 1991).

Postopki detekcije organofosfatnih pesticidov s pomocjo kromatografije temeljijo predvsem na dveh tehnikah in sicer tekocinski kromatografiji visoke locljivosti (HPLC) in pa plinski kromatografiji (GC). Ti dve metodi sta pogosto povezani v sklop z masnim spektrometrom (MS) kot detektorjem. Glavna razlika med tema dvema vrstama kromatografij je v tem, da metoda HPLC uporablja tekocino kot mobilno fazo, med tem ko metoda GC uporablja kot mobilno fazo plin.

3.4.1. Plinska kromatografija – GC

Plinska kromatografija je metoda z visoko obcutljivostjo detekcije in kot pri ostalih metodah, je tudi zanjo potrebna pravilna priprava vzorcev. Pri plinski kromatografiji se komponente topljenca separirajo tako, da se porazdelijo med mobilno fazo (plin) in stacionarno fazo (trden adsorbent ali tekoca faza na trdnem nosilcu). S plinsko kromatografijo lahko opravimo kvalitativno in kvantitativno analizo vecine kompleksnih zmesi. Shematsko je zgradba plinskega kromatografa prikazana na Sliki 1.



Slika 1. Shematski prikaz plinskega kromatografa.

Na voljo so razlicni plinski kromatografi, vsi pa so grajeni iz naslednjih kljucnih komponent:

? injektor

? kolona

? detektor

? oprema za procesiranje signala (rekorder, integrator, PC)

? nosilni plin

Ves sistem (injektor, kolona, detektor) je termostatiran. Hlapne substance v analiziranem vzorcu vstopajo v kolono, napolnjeno s stacionarno fazo na nosilcu.

Skozi kolono vodimo mobilno fazo. To je plin, ki se ne veže na stacionarno fazo in mora biti zelo cist. Z nosilnim plinom, ki ima manjšo molekulsko maso, dosežemo boljšo locljivost pri enaki koloni. Izbira plina je odvisna od vrste vzorca in detektorja, pretok plina pa je obicajno v mejah od 10 mL do 400 mL/min, odvisen pa je od uporabljene kolone, vrste vzorca in želene locljivosti. Najpogosteje kot nosilni plin uporabljamo He, N_2, H_2, ali Ar.

Jedro kromatografa je kolona. Locimo polnjene kolone, katerih zunanji premer je od 3 do 6 mm, dolžina pa je med 1.2 in 3.7 m, ter tubularne ali kapilarne kolone, ki so dolge od 30 pa tudi do 152 m, njihov premer pa je od 25 do 76 µm. Najpogosteje uporabljamo polnjene kolone s trdnim nosilcem, ki je impregniran s topilom – stacionarni fazo. Idealen nosilec mora biti inerten in mora imeti cim manjšo površino. Kot nosilec uporabljamo silikagel ali diatomejsko zemljo z razlicnimi komercialnimi imeni. Posamezne sestavine vzorca prepoznamo na osnovi retencijskega casa (casa od injiciranja vzorca do zaznavanja posamezne sestavine na detektorju), ki je pri stalnih pogojih (temperatura, pretok plina) za doloceno spojino stalen. Ucinkovitost locevanja je odvisna od vrste in kvalitete adsorbenta ter stacionarne faza, prav tako pa je tudi odvisna od oblike, dolžine in tehnologije priprave kolone.

Pomemben del kromatografa je detektor. Plinska kromatografija z masnim detektorjem, ki omogoca dodatno identifikacijo sestavin vzorca na osnovi molekulske mase, je med najpogosteje uporabljenimi analiznimi tehnikami v toksikološki analitiki (Skoog, Holler, Nieman, 1998).

3.4.2. Tekocinska kromatografija – HPLC

Tekocinska kromatografija (HPLC) je kromatografska tehnika, kjer kot mobilno fazo uporabljamo tekocino. Bistvena razlika med HPLC in plinsko kromatografijo je v temperaturi delovanja. Pri tekocinski kromatografiji delo poteka pri nižjih, vecinoma sobnih temperaturah. Zato je primernejša za dolocevanje manj hlapnih spojin, molekule substanc pa ostajajo v glavnem nespremenjene. Pri plinski kromatografiji zaradi visoke temperature lahko pride do razgradnje nekaterih molekul, kar otežuje njihovo detekcijo in identifikacijo.

Sistem HPLC je sestavljen iz šestih osnovnih komponent:

- ? rezervoar za mobilno fazo,
- ? crpalka,
- ? injektor,
- ? kromatografska kolona,
- ? detektor,
- ? instrument za zapis signala

Vzorec je potrebno injicirati v sistem pred kolono naenkrat, ne da bi vplival na stacionarno fazo. Obstajata dva nacina vnašanja vzorca.

Najboljši nacin injiciranja v pretoku mobilne faze predstavlja vrtljivi injektor z zanko s stalno prostornino (loop injection). Injektor je poseben vecpotni ventil, ki omogoca,da se tocno dolocena kolicina vzorca, npr. 10 ?µL injicira v mobilno fazo. Tako natancno kolicino dobimo tako, da zanko napolnimo z vzorcem, in nato tok preusmerimo skoznjo. Zanka je kapilara, ki ima konstanten notranji premer, in tocno doloceno dolžino. S tem je prostornina injiciranega vzorca tocno dolocena. Tovrstni injektorji dajejo odlicno ponovljivost pri visokih tlakih in omogocajo avtomatizacijo injiciranja vzorcev pri razlicnih volumnih.

Kolona je najpomembnejši del sistema HPLC. Njena kakovost je odvisna od vrste in kvalitete stacionarne faze ter od tehnologije polnjenja. Premer delcev stacionarne faze je obicajno 5 µm. Zaradi tako majhnih delcev je polnitev kolone zelo gosta, zato kolona predstavlja velik upor za mobilno fazo. Ta upor premagujemo s posebnimi crpalkami. Veliko število majhnih delcev in gosta polnitev zagotavljata veliko aktivno površino in zato veliko ucinkovitost, zato so take kolone obicajno dolge le 10 do 25 cm.

V HPLC uporabljamo pretocne detektorje s celicami, ki imajo majhne volumne. Tako se izognemo razširitvi ozkih kromatografskih vrhov, ki v kromatogramu omogocajo identifikacijo (retencijski cas) in kvantifikacijo (površina ali višina vrha) sestavin vzorca.

Glavne zahteve za detektorje so:

- ? visoka obcutljivost
- ? visoko dinamicno obmocje
- ? linearnost v širokem obmocju.

Poznamo dva tipa detektorjev za tekocinsko kromatografijo. Prvi tip so detektorji, ki merijo razlike nekaterih fizikalnih lastnosti topljenca v mobilni fazi in mobilne faze same. Primer tovrstnih detektorjev so refraktometer, detektor za merjenje prevodnosti in detektor za merjenje dielektricne konstante.

Drugi tip so detektorji, ki so obcutljivi na nekatere kemijske ali fizikalne lastnosti topljenca, ki pa so predvsem neodvisne od sestave mobilne faze. V to skupino spadajo UV – VIS in fluorescencni spektrofotometri, elektrokemijski detektorji in masni spektrometer. Obcutljivost teh detektorjev je odlicna, in tudi selektivnost je dobra. Gradientno izpiranje lahko uporabljamo brez vecjih problemov (Žorž, 1991).

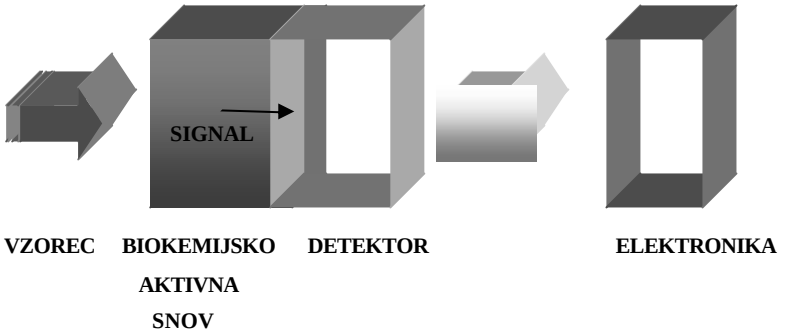
4. BIOSENZORJI

4.1. Kaj so biosenzorji

Biosenzorji se v zadnjem casu vse bolj uveljavljajo kot alternativa in pomoc klasicnim analitskim tehnikam tako v zdravstvu in industriji, kot tudi pri analizah vzorcev iz okolja. Predstavljajo kompromis med selektivnostjo in zanesljivostjo analiz na eni strani ter enostavnostjo uporabe, hitrostjo analiz in ceno na drugi strani. V nadaljevanju bom predstavil optotermicni biosenzor za detekcijo organofosfatnih in karbamatnih pesticidov, ki ponuja možnost relativno enostavne in poceni analize velikega števila vzorcev, v katerih je potrebno preveriti prisotnost polutantov (inhibitorjev holinesteraz). Vzorce, v katerih najdemo prisotnost le-teh, pošljemo na nadaljnjo analizo s klasicnimi analitskimi metodami (HPLC, GC-MS), pri cemer ugotovimo prisotnost specificnih pesticidov in njihove koncentracije.

V laboratorijih po vsem svetu v zadnjih letih poteka razvoj cele vrste razlicnih biosenzorjev. Razlog za velik napredek na tem podrocju gre iskati v mocnejšem povezovanju razlicnih strok (biologije, kemije, fizike, elektroinženirstva in znanosti o materialih). Biosenzorji namrec omogocajo zanesljivo in relativno poceni alternativo klasicnim analitskim metodam, pri cemer identificirajo razlicne snovi iz mešanice inertnih substanc.

Najpomembnejši del biosenzorja predstavlja biokemijsko aktivna snov (encim, receptor, imunološko protitelo, celicna kultura ali mikroorganizem), ki je v neposrednem stiku s kemijskim ali fizikalnim detektorjem (opticni, elektrokemijski, masni ali termicni). Signal se potem pretvori v elektricnega s pomocjo elektronike. Biosenzor tako dejansko pretvori neko biološko reakcijo v elektricni signal. Shema tipicnega biosenzorja je prikazana na Sliki 2. Pomembno je, da izberemo primerno biokemijsko aktivno snov (BAS), saj mora biti le-ta zelo specificna za detekcijo želenega analiziranca. BAS mora prepoznati v kompleksnem vzorcu svojo tarco in jo na nek nacin modificirati, pri tem pa proizvesti nek signal, ki ga z ustreznim detektorjem lahko zaznamo. Glede na signal izberemo ustrezen detektor. Detektor spremeni biokemijski signal v elektricnega in na ta nacin le spremeni ene vrste energijo v drugo, ki jo lažje merimo in vrednotimo.



Slika 2. Shematski prikaz sestave in delovanja biosenzorja.

Biosenzorji se vse bolj uveljavljajo na razlicnih podrocjih. Najvecji razmah so dosegli v medicini, pa tudi v industriji pri avtomatizaciji, regulaciji, kontroli kvalitete in pri ekonomicni rabi energije. V zadnjem casu pa se kaže njihova vecja uporaba tudi v farmaciji, živilstvu, okolju in za potrebe vojske (Pogacnik, 2003).

Najvecji trg za biosenzorje predstavlja podrocje biomedicine. Encimski biosenzorji za analize glukoze pri pacientih s sladkorno boleznijo so bili prvi, ki so jih uporabljali v komercialne namene. Trenutno pacienti že lahko uporabljajo implantirane biosenzorje, ki jim ves cas posredujejo informacije o koncentraciji glukoze v krvi, kar je zelo pomembno zaradi pravocasnega ukrepanja pri povišanih koncentracijah le-te. Potekajo pa tudi že raziskave za pripravo zaprtega sistema analize s pomocjo biosenzorja in dovajanja zdravil, kar bi omogocilo stalno kontrolo in regulacijo zdravil v telesu. S tem bi zmanjšali možnost prevelikega oziroma premajhnega odmerka zdravil.

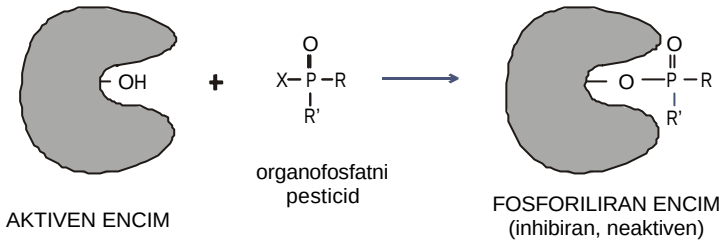
Precej zanimanja je tudi za biosenzorje, ki bi jih lahko uporabljali na podrocju živilstva. Biosenzorje naj bi uporabljali pri kontroli proizvodnje in kakovosti koncnih produktov. V literaturi je že opisan glukozni biosenzor, s katerim spremljamo fermentacijo, laktatni biosenzor za spremljanje kvalitete vin in jogurtov in etanolni biosenzor za ugotavljanje vsebnosti alkohola v alkoholnih pijacah.

In ne nazadnje je uporaba biosenzorjev pomembna tudi za analize vzorcev iz okolja. Relativno enostaven mikrobni biosenzor meri BOD (biološko potrebo po kisiku) . Vecinoma pa gre razvoj biosenzorjev v smeri detekcije polutantov, ki škodljivo vplivajo na okolje, živali in cloveka (Pogacnik, 2003).

4.2. Biosenzorji za detekcijo pesticidov

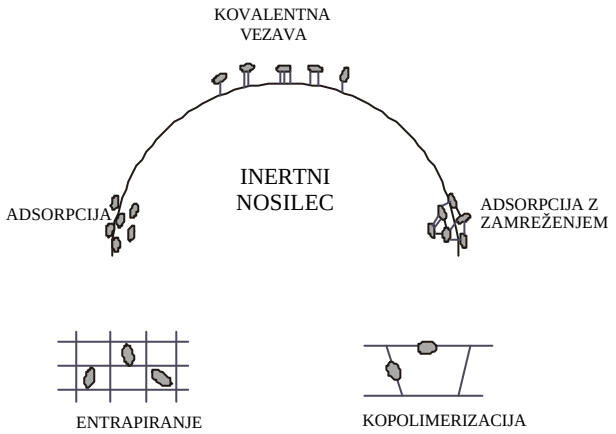
Veliko kemicnih snovi, ki jih rutinsko uporabljamo v kmetijstvu in kemicni industriji, tvori stabilne toksicne produkte v zraku, zemlji in vodi in tako onesnažuje velika zemljepisna podrocja. Pesticidi (herbicidi, fungicidi in insekticidi) predstavljajo eno izmed pomembnejših skupin onesnaževalcev okolja. Vsako leto se v kmetijstvu, medicini in industriji porabijo velike kolicine le-teh. Vecina izmed njih je mocno toksicnih in se akumulirajo v organizmih, kar lahko pripelje do resnih obolenj. Organofosfatni in karbamatni pesticidi, ki pocasi nadomešcajo organoklorne pesticide, niso obstojni v okolju, pac pa so mnogi izmed njih mocno akutno toksicni. Ti dve skupini pesticidov delujeta na skupino encimov (holinesteraze), ki so v živih organizmih odgovorni za normalni prenos živcnih impulzov. Prav zato so v Evropi dovoljene koncentracije teh pesticidov v pitni vodi zelo nizke (1µg/L), to pa zahteva zelo obcutljive detekcijske metode (Pogacnik, 2003).

Inhibicijski mehanizem med holinesterazami (ChE) in organofosfatnimi ter karbamatnimi pesticidi (Slika 3) je pripeljal do razvoja cele vrste bioanalitskih detekcijskih metod za identifikacijo in kvantifikacijo teh dveh skupin insekticidov. Vecina biosenzorjev za svoje delovanje uporablja ChE (acetilholinesteraze (AChE) in butirilholinesteraze (BuChE)) razlicnih izvorov (AChE izolirane iz jegulje, govejih ali cloveških eritrocitov, ter BuChE izolirane iz konjskega ali cloveškega seruma). Ti biosenzorji merijo encimsko inhibicijo *in vitro*, ki jo lahko ekstrapoliramo tudi v inhibicijo *in vivo*. Še posebej pa je treba poudariti, da z opisanimi biosenzorji lahko dolocamo le vsoto toksicnosti posameznih pesticidov, ki so prisotni v vzorcu, ne pa tudi koncentracij posameznih pesticidov, saj vsi organofosfatni in karbamatni pesticidi delujejo na encim po enakem mehanizmu, zato jih ne moremo razlikovati.



Slika 3. Inhibicijski mehanizem med encimom holinesterazo in organofosfatnim pesticidom

Pogoj za delovanje biosenzorja je poleg uporabe BAS tudi ta, da je senzor uporaben za vec analiz. To lahko dosežemo le s tem, da BAS vežemo (imobiliziramo) na nek trden inerten nosilec. Slika 4 prikazuje nekatere metode, s katerimi dosežemo, da postanejo encimi netopni, omogocajo nemoten dostop vseh reagentov, ohranjena pa je tudi encimska aktivnost. Na ta nacin dosežemo tudi vecjo stabilnost encimov, ki so tako manj obcutljivi za vplive iz okolja.



Slika 4. Možne oblike imobilizacije biokemijsko aktivnih snovi

Obetavni rezultati raziskav na opisanem podrocju so pripeljali do uporabe ChE v kombinaciji z razlicnimi detektorji, kot so: potenciometri, amperometri, konduktometri in opticni detektorji. Med opticnimi detektorji se zelo pogosto pojavljajo spektrofotometri in fluorimetri, ki merijo encimsko aktivnost pred inhibicijo in po njej. Za meritve encimske aktivnosti se pri tem uporabljajo encimski substrati, ki ob hidrolizi dajejo obarvane produkte, ponavadi ob dodatku kromoforov.

Raztopina produkta reakcije TNB^{2-} je rumeno obarvana in ima absorpcijski maksimum pri 410 nm, kar lahko zaznamo s pomocjo opticnih detektorjev. Na žalost pa spektrofotometrija ponavadi ni dovolj obcutljiva za detekcijo zelo nizkih encimskih aktivnosti, ki so mocno zaželene pri pripravi biosenzorja. Nižja encimska aktivnost namrec mocno zniža meje detekcije, saj enaka kolicina pesticida inhibira vecji delež encima, kar ima za posledico lažjo detekcijo sledov pesticidov, ki so prisotni v vzorcih iz okolja (npr. pitna voda, zelenjava, sadje in zemlja). Fluorimetrija je sicer zelo obcutljiva detekcijska metoda, vendar zahteva uporabo substratov, ki ob prisotnosti ChE dajejo fluorescentne produkte oziroma zahtevajo dodatno derivatizacijo s kromofori. Spektrometrija s termicnimi lecami (TLS) je bila uporabljena v kombinaciji z bioanalitskimi kolonami šele pred kratkim, ceprav v literaturi že prej najdemo podatke, da omogoca detekcijo zelo nizkih absorbanc. Uporaba TLS (Thermal Lens Spectrometry) nam je ponudila možnost izboljšanja meje detekcije brez uporabe kompleksnih substratov (Pogacnik, 2003).

4.3. Optotermicni biosenzor

TLS spada v skupino optotermicnih detekcijskih metod, med katere sodijo tudi spektrometrija z optotermicnim uklonom (PTG), spektrometrija z optotermicnim odklonom (PTDS) in optoakusticna spektrometrija (PAS). Pri vseh metodah pride do neradiacijske relaksacije vzbujenih molekul. Pri TLS je nastanek termicne lece posledica segrevanja, ki ga povzroci absorpcija svetlobe laserskega snopa v vzorcu. Med procesom neradiacijske relaksacije vzbujenih stanj se absorbirana svetlobna energija pretvori v toploto. Ce uporabljamo za vzbujanje laserski snop z Gaussovo porazdelitvijo intenzitete, pride zaradi absorpcije svetlobe do nehomogene radialne temperaturne porazdelitve v vzorcu z maksimumom na osi snopa. Zato se v primeru vecine tekocin, ki se s segrevanjem raztezajo, zniža gostota in s tem tudi lomni kolicnik. Kot posledica radialnega spreminjanja lomnega kolicnika nastane v vzorcu opticni element, ki ga imenujemo termicna leca. Nastala leca je zaradi manjšega lomnega kolicnika v osi snopa razpršilna in povzroca divergenco, ki jo lahko opazujemo kot znižanje intenzitete v osi tipalnega snopa. Signal TLS lahko poenostavljeno zapišemo z naslednjo enacbo:

$$\frac{?\boldsymbol{I}_{bc}}{\boldsymbol{I}_{bc}} ? \frac{2.303 ? \boldsymbol{P} ? (?? \boldsymbol{n} / ? \boldsymbol{T}) ? \boldsymbol{A}}{? ? \boldsymbol{k}} ,$$

kjer je

$\frac{?\boldsymbol{I}_{bc}}{\boldsymbol{I}_{bc}}$	relativna sprememba intenzitete v osi tipalnega žarka (signal TLS)
P	moc vzbujevalnega laserja
$\mathbf{d}n/\mathbf{d}T$	temperaturni koeficient lomnega kolicnika vzorca
A	absorbanca vzorca
$?$	valovna dolžina tipalnega snopa
k	toplotna prevodnost vzorca

Iz navedenega vidimo, da je signal TLS pri konstantnih pogojih (P, $\mathbf{d}\,n/\mathbf{d}T$, $?$, k) premo sorazmeren z absorbanco vzorca, kar je v opisani metodi zelo pomembno, saj je absorbanca premo sorazmerna tudi encimski aktivnosti in nam višina signala dejansko predstavlja že kar samo encimsko aktivnost.

Optimalno delovanje biosenzorja zagotavlja pretocna injekcijska analizna tehnika (FIA) in detektor TLS. Sistem FIA sestavljajo: crpalka HPLC, dva injektorja (eden za injiciranje substrata in reagenta DTNB, drugi za injiciranje vzorca), bioanalitska kolona, v kateri je imobiliziran encim, in detektor TLS. Skozi sistem stalno tece fosfatni pufer (0,5 mL/min). Injektorska zanka za injiciranje substrata ima volumen 20 mL, za injiciranje vzorca pa 1 mL.

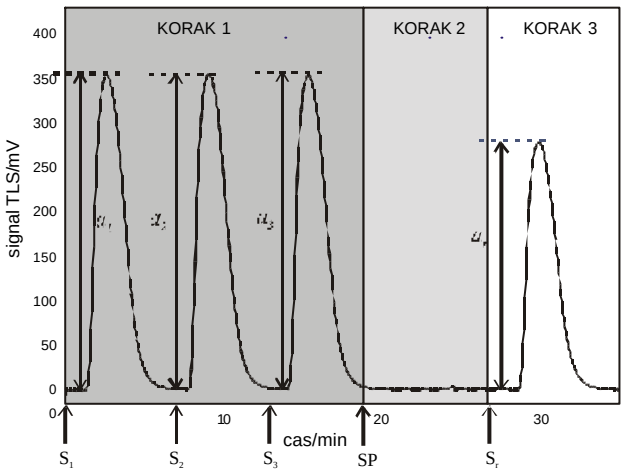
Ce želimo ugotoviti, ali vzorec vsebuje pesticide, moramo opraviti inhibicijski test. Le-ta vkljucuje tri korake (Slika 5):

1. dolocitev zacetne encimske aktivnosti (a_0), tako da trikrat zapored injiciramo substrat na bioanalitsko kolono, ki vsebuje aktiven encim (S_1, S_2, S_3)
2. injiciranje vzorca, ki vsebuje pesticid (SP)
3. dolocitev koncne encimske aktivnosti (a_k), tako da še enkrat injiciramo substrat (S_r) in izracunamo preostalo encimsko aktivnost (A) s pomocjo enacbe:

$$A ? \frac{a_k}{a_0}$$

Inhibicijo, ki ustreza navedeni preostali encimski aktivnosti, pa izracunamo s pomocjo enacbe:

$$I = 1 - A$$



Slika 5. Prikaz signalov, ki jih pri bioanalizni metodi z AChE zazna detektor med analizo vzorca, ki vsebuje pesticid

Ko pride do popolne inhibicije encima, moramo encim zamenjati s svežim, neaktiven encim pa lahko uspešno reaktiviramo z reagentom piridin-2-aldoksim metjodid (2-PAM). Reaktivacija je skoraj popolna, ce inhibicija ni presegla 80 % zacetne encimske aktivnosti.

4.3.1. Analiza razlicnih pesticidov z razlicnimi bioanalitskimi kolonami

Za pripravo biosenzorja je zanimiva študija primernosti razlicnih encimov (acetilholinesteraze izolirane iz jegulje, govejih ali cloveških eritrocitov in butirilholinesteraze izolirane iz konjskega seruma), ki so komercialno dostopni. Za analize so bili izbrani nekateri organofosfati (paraokson, oksidemeton-metil, diazinon in triazofos) in karbamati (karbofuran, propoksur), ki se pogosto uporabljajo v kmetijstvu. Njihove toksicnosti se mocno razlikujejo, saj ima paraokson, ki je izmed navedenih najbolj toksicen pesticid, vrednost letalne doze (LD_{50}) za podgane pri oralni izpostavitvi 5 mg kg^{-1}, diazinon, ki pa je najmanj toksicen, pa ima vrednost LD_{50} med 300 in 400 mg kg^{-1} (Pogacnik, 2003). Biosenzor je najbolj obcutljiv za paraokson, ki je najbolj toksicen, najmanj pa za oksidemeton-metil in diazinon, ki sta šibka inhibitorja ChE in zato najmanj toksicna. Med encimi je najvecjo obcutljivost pokazala imobilizirana AChE, izolirana iz jegulje, po drugi strani pa so bile dolocene najmanjše inhibicije ob uporabi BuChE iz konjskega seruma (Pogacnik, 2003).

4.3.2. Prednosti uporabe optoptermicnih biosenzorjev

Postavitev sistema FIA omogoca hitre analize brez dodatne, vcasih tudi pocasne inkubacije med encimom in pesticidom. Z uporabo detekcije TLS lahko dosežemo do petkrat nižje meje detekcije (0,2 ng/mL za paraokson) v primerjavi s spektrofotometricno detekcijo. Optotermicna bioanalizna metoda ima prednosti tudi pred elektrokemijskimi sistemi, saj le-ti zahtevajo imobilizacijo encimov direktno na elektrodo, kar je vcasih lahko precej dolgotrajen postopek. Poleg tega potrebujemo za pripravo elektrokemijskega biosenzorja vsaj dva encima (poleg ChE še holinoksidazo ali peroksidazo), kar poveca ceno sistema.

Opisani sistem omogoca analize razlicnih predstavnikov organofosfatnih pesticidov in karbamatnih pesticidov z bioanalitskimi kolonami, ki vsebujejo encime razlicnega izvora. Odziv biosenzorja je odvisen tako od preiskovanega pesticida kot od izvora encima. Meje detekcije za izbrane organofosfate in karbamate so odvisne od njihove toksicnosti in variirajo med 1 ng/mL za karbofuran in 10 mg/mL za oksidemeton-metil (paraokson 0,2 ng/mL).

Biosenzor lahko uporabimo za analize vzorcev sadnih sokov in vodovodne vode in brez dodatne zamudne priprave vzorcev. Matriks vzorcev sadnih sokov povzroci nižje inhibicije encimov kot pri analizi istih pesticidov v tamponskih raztopinah. Posledicno se zvišajo tudi meje detekcije za posamezne pesticide. Pri analizah paraoksona v vodovodni vodi dosežemo mejo detekcije 1,5 ng/mL, v pomarancnem soku 2,8 ng/mL in v jabolcnem soku 4 ng/mL (Pogacnik, 2003).

4.3.3. Analiza vzorcev sokov s pomocjo optotermicnega biosenzorja

Analize vzorcev filtriranega in nefiltriranega jabolcnega ter pomarancnega soka z dodatkom standardne raztopine paraoksona so pokazale na nekatere težave. Pri analizi slepega vzorca (brez dodatka pesticida) pride do rahlega povišanja signala (okrog 5%). Dodatek paraoksona povzroci nižje inhibicije encima kot enaka koncentracija pesticida v tamponski raztopini. Posledica tega so nižje izmerjene koncentracije pesticida v vzorcih z dodanim paraoksonom, kot pa so dejanske koncentracije dodanega pesticida, kadar je uporabljena umeritev v tamponski raztopini. Do najvecje razlike pride pri analizi jabolcnega soka, pri katerem je pH nastavljen s prvotne vrednosti na 7,4 (vrednost pH nosilne tekocine v sistemu FIA. V vzorcu, ki je vseboval 10 ng/mL paraoksona, ga je bilo dolocenega le 3,3 ng/mL Ocitno prihaja do interakcije med nekaterimi komponentami v matriksu vzorca in encimom, kar preprecuje inhibicijo le-tega. Matriks lahko na nek nacin zašciti encim pred inhibicijo oziroma ga aktivira. Ta zašcita ali aktivacija je najvecja pri vzorcu jabolcnega soka, ki ima pH nastavljen na 7,4 (z dodatkom NaOH pred analizo), kar pomeni, da pojava ne moremo pripisati vrednosti pH vzorca Deloma pojav reši priprava umeritvene krivulje v tamponski raztopini in dodatki nekaterih alkalijskih in zemeljsko alkalijskih kovin v koncentracijah, ki so tipicno prisotne v sadnih sokovih. Tem težavam pa se lahko izognemo tudi, ce pripravimo umeritvene krivulje s standardnimi raztopinami znanih koncentracij pesticida (obicajno paraokson) v cistem nekontaminiranem soku iz istega sadja kot preiskovani vzorci (Pogacnik, 2003).

5. OCENA UPRAVICENOSTI

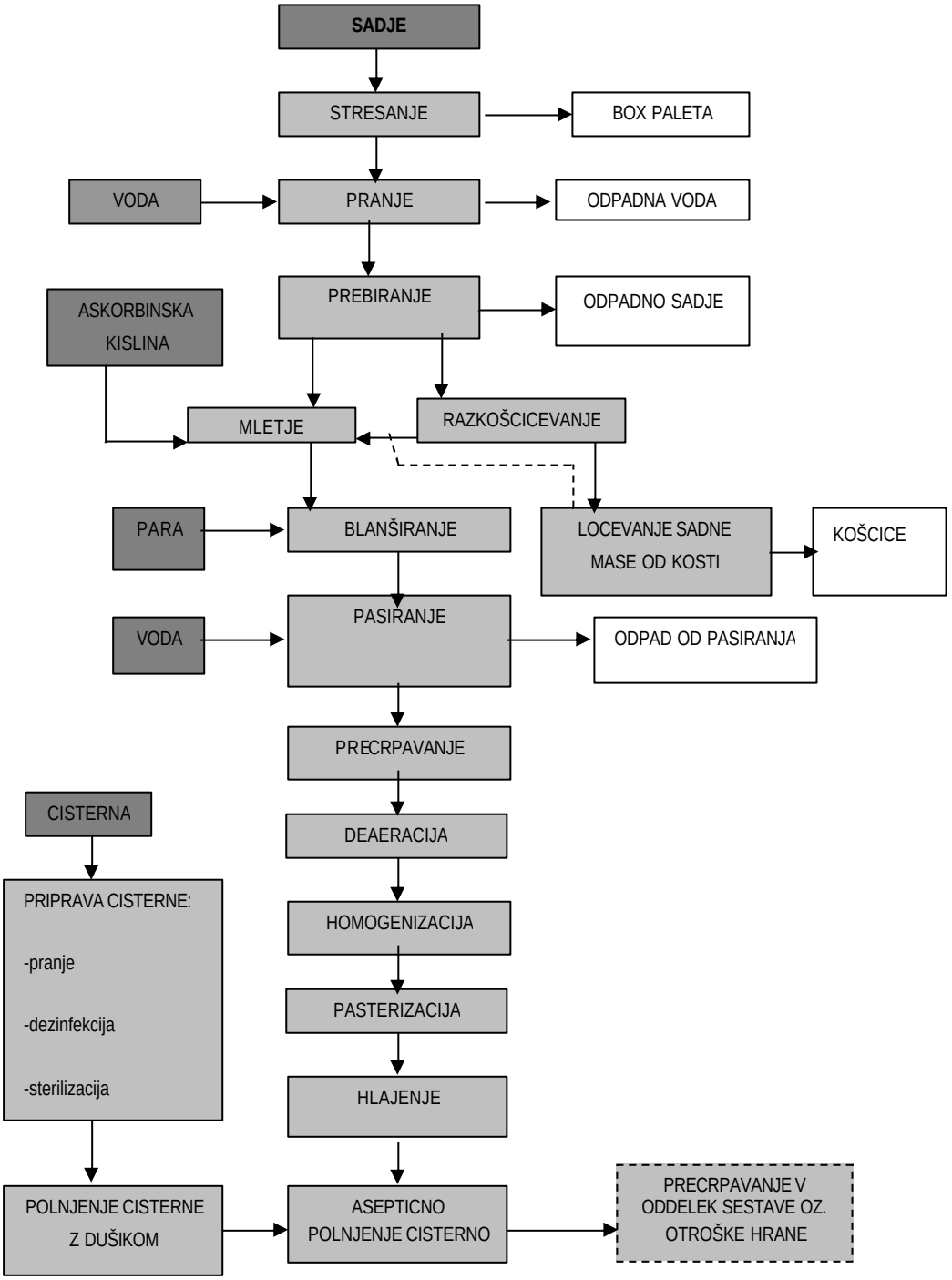
5.1. Opredelitev projekta uvedbe novega nacina testiranja prisotnosti pesticidov v sadju

V nadaljevanju diplomske naloge sem ovrednotil ustreznost investicije glede na možne scenarije dobave surovine kontaminirane s pesticidi.

V podjetju Fructal v skladu z zahtevami zakonodaje opravljajo testiranja prisotnosti pesticidov na koncnih proizvodih. To pomeni, da proizvod kontaminiran, s pesticidi naceloma ne more priti do potrošnika. V našem primeru pa bi z uvedbo nove tehnologije testiranja radi dosegli oziroma preprecili nastanek vecje ekonomske škode znotraj podjetja, ki bi nastala zaradi predelave oporecnega sadja oziroma kaš.

V industriji sadnih sokov se kot osnova uporabljajo sadne kaše, ki jih proizvajalec lahko pridobi sam s predelavo sadja ali pa kot polproizvod od dolocenega dobavitelja. Obe skupini surovin sta možna izvora nedovoljenih snovi v koncnem proizvodu. V podjetju Fructal se kot surovine uporabljajo tako kaše, ki so nabavljene kot polproizvod, kot tudi kaše, ki jih podjetje predela samo iz nabavljenega sadja. V primeru, ko podjetje pridobi polproizvod od dobavitelja, naj bi bila vsaka pošiljka opremljena z ustreznimi dokumenti, ki dokazujejo neoporecnost polproizvoda. Kljub temu pa obstaja še zmeraj možnost, da pride v podjetje kontaminirana pošiljka.

Podjetje Fructal uporablja kot osnovo za sadne sokove tudi polproizvode, ki jih iz sadja predela samo (Slika 6). V tem primeru uporablja kot surovino sadje (breskve, jabolka), ki ga odkupi od pridelovalcev. Pri tem nacinu pridobivanja polproizvoda obstaja bistveno vecja verjetnost vsebnosti pesticidov, ker s standardnimi metodami ni mogoce pregledati vseh vzorcev vhodnih surovin, dokumentov o neoporecnosti sadja pa pridelovalci nimajo.



Slika 6. Proces predelave sadja.

5.2. Okvirne analize lastnosti projekta

5.2.1. Tehnicno – tehnološke znacilnosti projekta

Za bioanalizne metode je znacilno, da je casovni potek analize bistveno krajši kot pri klasicnih analitskih metodah med katere sodita plinska in tekocinska kromatografija. Medtem ko znaša obicajni cas analize s plinsko kromatografijo najmanj 45 minut na vzorec, je pri analizi vzorca z bioanalizno metodo ta cas le 10 minut na vzorec. Glavna prednost je v trajanju priprave vzorca in pa tudi v sami zahtevnosti priprave. To pomeni, da s tovrstno analizo lahko pregledamo vse vzorce vhodnih surovin ne da bi s tem ovirali predelavo oziroma proizvodnjo. V našem primeru bi bilo po oceni odgovornih potrebno opraviti analizo na okrog 2000 vzorcih vhodnih surovin letno oziroma v sezoni predelave sadja tudi na okrog 40 vzorcih dnevno.

Poleg krajšega casa analize, pa tovrstna tehnologija analize prinaša tudi bistveno nižje stroške posamezne analize.

5.2.2. Delovna sila

Za opravljanje analiz z novo analitsko tehniko bi potrebovali laboratorijskega tehnika z ustreznim znanjem upravljanja z analitskimi metodami. V podjetju imajo že obstojeci kader na tem podrocju zato delovna sila tukaj ni problematicna. Potrebna bi bila le prerazporeditev delovne sile in ustrezno izpopolnjevanje. Pri vecjem obsegu del pa bi bilo potrebno zaposliti dodatno osebje, v tem primeru laboratorijskega tehnika.

Stroške delovne sile bi v tem primeru ovrednotili na osnovi stroškov zaposlenega za opravljeno doloceno število analiz. Kot sem že prej omenil, bi bilo letno potrebno opraviti nekje 2000 analiz vzorcev. Pri predpostavki da je povprecen cas trajanja analize z novo analizno tehniko 15 minut, bi zaposleni letno opravil okrog 500 delovnih ur. Povprecna bruto urna postavka za laboratorijskega tehnika znaša nekje 1200 SIT na uro. Kot je razvidno iz Tabele 3 bi tako stroški dela znašali okoli 600.000,00 SIT letno.

Tabela 3. Letni stroški dela.

ŠTEVILO UR	500
BRUTO URNA POSTAVKA	1200,00 SIT
STROŠKI DELA SKUPAJ	**600.000,00 SIT**

5.2.3. Predvidena vrednost investicije vpeljave nove analizne tehnike

V primeru vpeljave nove analizne tehnike bi bila potrebna investicija v doloceno laboratorijsko opremo. Za tovrstno analizno tehniko sta potrebna dva glavna sklopa, to pa sta crpalka in spektrofotometer. Po podatkih dobavitelja bi bila cena crpalke 1.840.000,00 SIT, cena spektrofotometra pa 4.000.000,00 SIT. Poleg tega pa investicija zajema tudi stroške uvajanja, ki obsegajo izobraževanje kadra, ki bo upravljal z analizno tehniko, preverjanje sistema in pa prenos iz razvojnega laboratorija Politehnike Nova Gorica v kontrolni laboratorij podjetja investitorja. Potrebne bi bile še nekatere manjše prilagoditve katerih stroški pa so zanemarljivi. Tako bi vrednost celotne investicije znašala 10.940.000,00 SIT (Tabela 4).

Tabela 4. Vrednost investicije vpeljave nove analizne tehnike.

CRPALKA	1.840.000,00 SIT
SPEKTROFOTOMETER	4.000.000,00 SIT
STROŠKI UVAJANJA	5.100.000,00 SIT
SKUPAJ	**10.940.000,00 SIT**

5.2.4. Variabilni stroški

Varabilne stroške v našem primeru predstavljajo predvsem kemijski pripravki in potrošni material, ki se uporablja v analitskih postopkih. Po oceni izvajalcev naj bi ti stroški znašali okrog 240.000,00 SIT letno.

5.2.5. Amortizacija crpalke in spektrofotometra kot osnovnih sredstev

V našem primeru bomo amortizacijo izracunali na podlagi enakomerne casovne stopnje in ob predpostavki, da je letna obrestna mera 8%.

$$Am_{STC} ? \frac{100\%}{\text{število let uporabe}}$$

Tovrstna analizna tehnika naj bi bila v uporabi 5 let in na osnovi tega naj bi bila amortizacijska stopnja 20%.

$$Am_{ST} ? \frac{100\%}{5} ? 20\%$$

Na podlagi amortizacijske stopnje lahko izracunamo amortizacijo (Tabela 5).

Tabela 5. Casovno amortiziranje – sorazmerno

Leta	Amortizacijska osnova (v SIT)	Amortizacijska stopnja (v SIT)	Amortizacija (v SIT)	Neodpisana vrednost (v SIT)
1	6.307.200,00	20%	1.261.440,00	5.045.760,00
2	6.307.200,00	20%	1.261.440,00	3.784.320,00
3	6.307.200,00	20%	1.261.440,00	2.522.880,00
4	6.307.200,00	20%	1.261.440,00	1.261.440,00
5	6.307.200,00	20%	1.261.440,00	0
Skupaj			6.307.200,00	

Tako lahko ugotovimo da bi letni stroški amortizacije znašali 1.261.440,00 SIT.

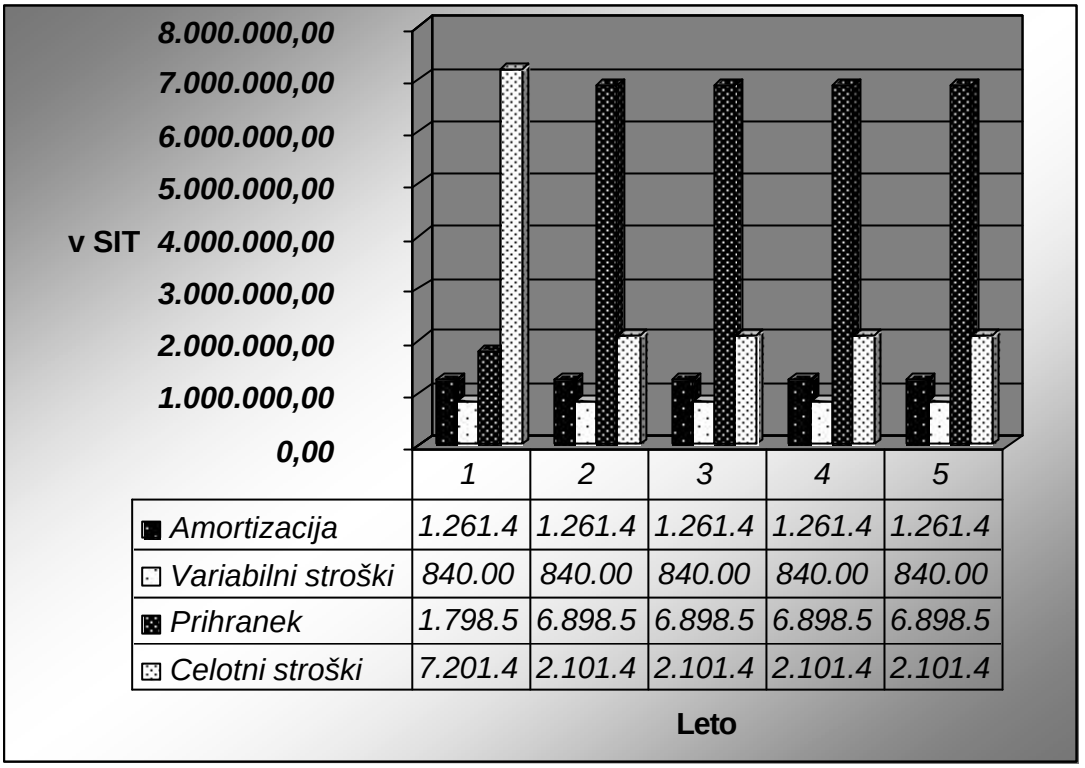
5.3. Primerjava stroškov analize med kromatografsko analizno metodo in bioanalizno metodo.

V podjetju sedaj opravljajo analize glede prisotnosti pesticidov na približno vsaki deseti pošiljki vhodne surovine. To pomeni, da ob približno 2000 pošiljkah letno opravijo približno 200 analiz. Te analize pa podjetje zaradi neustrezne analizne tehnike ne more opravljati znotraj svojih služb, temvec izbrane vzorce vhodnih surovin pošiljajo v analizo v ustrezne laboratorije v Italijo. Cena analize se giba okrog 45.000,00 SIT na vzorec. Ce upoštevamo 200 vzorcev vhodnih surovin, ki jih podjetje letno zajame, to pomeni 9.000.000,00 SIT stroškov. Ce k temu prištejemo še casovno omejenost hitro ugotovimo, da to ni prava rešitev.

Ce pa bi uvedli testiranje vhodnih surovin z bioanalizno metodo na vseh 2000 vzorcih, bi stroški analiz znašali nekje 2.101.440,00 SIT letno skupaj z amortizacijskimi stroški (Tabela 6). Stroški posamezne analize pa bi tako znašali okrog 1050 SIT. Ta izracun velja ob predpostavki, da bi amortizacijska doba znašala 5 let in bi bila na zacetku potrebna tudi investicija 5.100.000,00 SIT kot posledica stroškov uvajanja. Tako bi letno prihranili okrog 7.000.000,00 SIT (Slika 7).

Tabela 6. Prikaz letnih stroškov uporabe bioanalizne metode.

Variabilni stroški	240.000,00 SIT
Stroški zaposlenih	600.000,00 SIT
Amortizacija OS	1.261.440,00 SIT
Odhodki skupaj	2.101.440,00 SIT

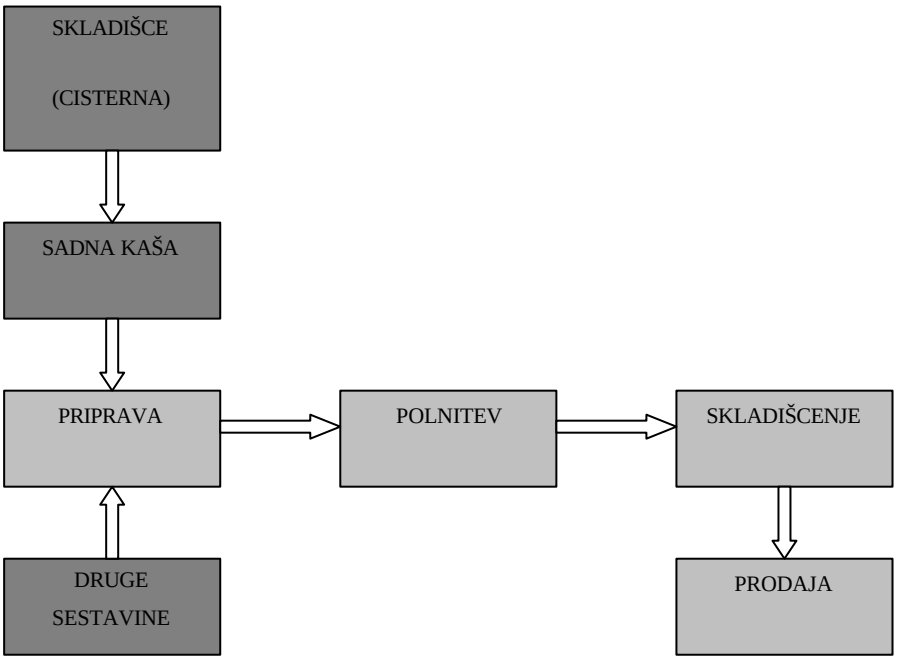


	1	2	3	4	5
Amortizacija	1.261.4	1.261.4	1.261.4	1.261.4	1.261.4
Variabilni stroški	840.00	840.00	840.00	840.00	840.00
Prihranek	1.798.5	6.898.5	6.898.5	6.898.5	6.898.5
Celotni stroški	7.201.4	2.101.4	2.101.4	2.101.4	2.101.4

Slika 7. Primerjava stroškov in prihrankov

5.4. Simulacija možne ekonomske škode

Upravicenost uvedbe nove analizne tehnike,ki temelji na osnovi bioanaliznih metod bom poizkušal prikazati tudi na primeru nastanka ekonomske škode v podjetju. Ta škoda bi nastala kot posledica uporabe surovine kontaminirane s pesticidi v proizvodnem procesu. V proizvodnji sadnih sokov nastopa kot surovina sadna kaša, ki jo podjetje pridobi od dobaviteljev ali pa proizvede samo s predelavo sadja V podjetju bi lahko ekonomska škoda lahko nastala v vec fazah proizvodnega procesa (Slika 8).



Slika 8. Proces izdelave sadnega soka.

Sam se bom osredotocil na dva možna primera. V prvem primeru bom prikazal možnost, ko bi prišlo do odkritja vsebnosti pesticidov v sadni kaši v skladišcni cisterni. Drugi primer pa bo temeljil na možnosti, da bi prišlo do odkritja prisotnosti pesticidov na koncnem izdelku oziroma vecji kolicini le tega.

5.4.1. Vsebnost pesticidov v sadni kaši v skladišcni cisterni

Sadne kaše v podjetju uporabljajo kot osnovo za sadne sokove. Skladišcijo jih v ustreznih cisternah, ki imajo kapaciteto 24.000 litrov. Ce v to cisterno shranimo kaše, ki jih pridobimo iz sadja vec proizvajalcev, obstaja možnost, da je ena od teh kontaminirana z ostanki pesticidov. To pomeni, da lahko v tem primeru postane celotna vsebina cisterne neuporabna in s tem nastane dolocena ekonomska škoda v podjetju. Na podlagi cene sadne kaše lahko ugotovimo da bi škoda znašala okrog 2.400.000,00 SIT.

5.4.2. Vsebnost pesticidov v koncnem proizvodu

Ta primer se nanaša na možnost, da bi pri analizi koncnega proizvoda odkrili prisotnost pesticidov.

Proizvodnja sadnih sokov je v osnovi sestavljena iz dveh osnovnih procesov. Prvi in v bistvu najpomembnejši proces je sestava sadnega soka. To pomeni, da iz sadne kaše in preostalih sestavin pripravimo želeno mešanico oziroma sok. Obicajno se za polnitev pripravljajo sarže po 14.000 litrov, v katerih je delež sadne kaše nekje 7.000 litrov oziroma 50%. Ko je sok pripravljen gre v proces polnitve, ki obicajno obsega polnitev vec sarž sestavljenega soka. To pa pomeni, da se pri tem uporabi vsaj ena cisterna sadne kaše (24.000 L), ki je potencialno kontaminirana s pesticidi. Iz tega lahko sklepamo, da bi lahko v takem primeru proizvedli vsaj 48.000 litrov soka kot koncnega proizvoda, ki pa bi bil zaradi prevelike vsebnosti pesticidov neuporaben.

Za izracun ekonomske škode v tem primeru bom uporabil ceno breskovega soka v diskontni prodajalni podjetja in znaša okoli 250 SIT za liter soka. Tako lahko izracunamo da znaša ta škoda okoli 12.000.000,00 SIT (Tabela 7).

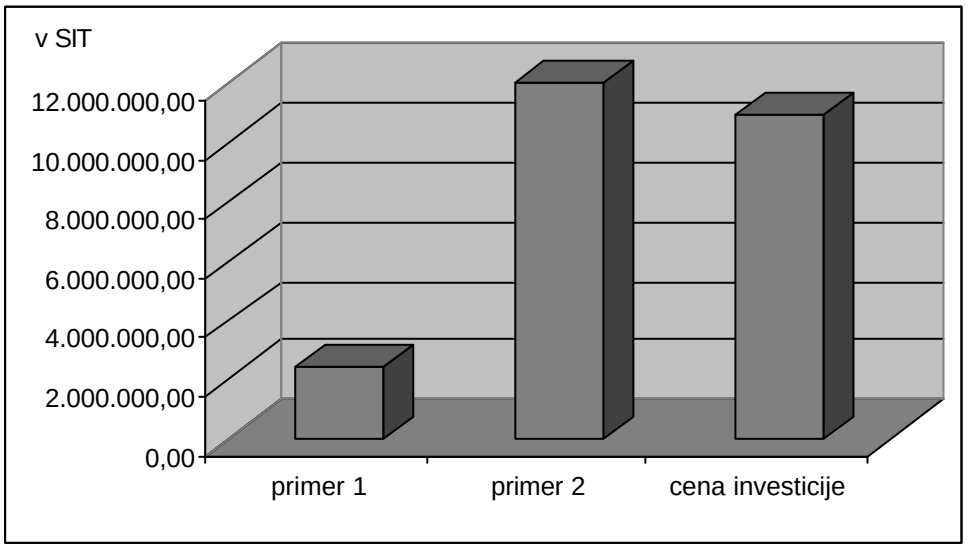
Ker cena za liter soka v prodaji ni povsem merodajna za dolocitev škode je ocena škode zgolj okvirna vendar pa dovolj stvarna.

Tabela 7. Primer nastale škode na koncnem proizvodu.

KOLICINA KONTAMINIRANEGA PROIZVODA	48.000 L
CENA (za liter)	250 SIT
NASTALA ŠKODA	**12.000.000,00 SIT**

5.4.3. Primerjava simulacij

Pri obravnavi obeh primerov nastanka možne ekonomske škode smo ugotovili, da ta vrednost ni tako majhna. V primeru odkritja prisotnosti pesticidov v cisterni z sadno kašo ta škoda še ni tako zaskrbljujoca, ko pa pride do odkritja kontaminacije na koncnem proizvodu oziroma na celotni seriji le tega, pa je višina potencialne škode zaskrbljujoce velika. Vrednost investicije v novo analizno tehniko je v tem primeru povsem primerljiva s možno škodo (Slika 9).



Slika 9. Primerjava možne ekonomske škode in vrednosti investicije.

5.5. Ugotavljanje verjetnosti odkritja pesticidov pri analizi vhodnih surovin

V podjetju v sezoni predelave prejmejo tudi do 40 pošiljk sadja na dan, kar predstavlja 2000 pošiljk letno. Z zdajšnjo frekvenco analiz opravijo analizo približno le na vsakem desetem vzorcu prejete pošiljke in tako obstaja verjetnost, da pride neustrezno sadje v nadaljnje faze predelave oziroma proizvodnjo koncnega izdelka. S pomocjo matematicne metode verjetnosti bom poizkušal ugotoviti, kolikšna je verjetnost, da bi ob sedanji metodi nadzora vhodni surovin prišlo do odkritja prisotnosti pesticidov v surovini. Postopek izracuna verjetnosti bom izvedel na dveh primerih. V prvem konzervativnem primeru bom uporabil statisticni podatek, ki pravi, da je v 10% prejetih pošiljk prisotnost pesticidov prekomerna. Za drugi primer (optimisticna ocena) pa bom uporabil podatek, da je le 0,1% pošiljk prekomerno kontaminiranih s pesticidi, kar pomeni, da so med 2000 vzorci le v dveh vzorcih prisotni pesticidi.

5.5.1. Definicija verjetnosti

Obicajno verjetnost slucajnega dogodka povezujemo s tem, kako pogosto proucevani dogodek nastopi, ce poskus velikokrat ponavljamo.

Klasicna definicija: naj bo v nekem poizkusu popolni sistem dogodkov sestavljen iz n elementarnih dogodkov in naj bo dogodek A vsota katerihkoli m od teh izidov (Cibej, 2001). Potem definiramo verjetnost dogodka A s predpisom

$$P(A) ? \frac{m}{n},$$

kjer je m = število ugodnih možnosti, n = število vseh možnosti.

Lastnosti za racunanje verjetnosti:

? Ce je dogodek A nacin dogodka B, verjetnost dogodka A ne presega verjetnosti dogodka B:

$$A ? B ? \quad P(A) ? P(B)$$

? Za poljuben dogodek A je vsota njegove verjetnosti in verjetnosti nasprotnega dogodka enaka 1:

$P(A)$? $P(A?)$? 1

? Verjetnost dogodka ne more biti vecja od 1:

$P(N)$? 1

? Verjetnost nemogocega dogodka je enaka 0:

$P(N)$? 0

? Pri poljubnih dogodkih A in B velja za verjetnost njune vsote obrazec:

$P(A ?\ B)$? $P(A)$? $P(B)$? $P(AB)$

5.5.2. Ugotavljanje možnosti odkritja pesticidov s pomocjo uporabe matematicnega postopka za ugotavljanje verjetnosti

Primer 1:

V podjetju prejmejo dnevno 40 razlicnih pošiljk sadja oziroma 2000 pošiljk letno. Od teh pa je 200 pošiljk spornih zaradi previsoke koncentracije pesticidov. Podjetje opravi analizo na 200 nakljucno izbranih vzorcih. Zanima nas kolikšna je verjetnost, da bodo odkriti vsi vzorci s prekomerno koncentracijo pesticidov.

$$n ? \binom{2000}{200} \qquad m ? \binom{200}{200}$$

$$\mathrm{P}\,(\mathrm{A}) ? \frac{\mathrm{m}}{n} = \frac{\binom{200}{200}}{\binom{2000}{200}} ? 0{,}000011$$

Iz izracuna lahko ugotovimo, da je možnost odkritja vseh 200 kontaminiranih vzorcev le 0,0011%. To pomeni, da je verjetnost, da bo v enem letu v predelavo prepuščena vsaj ena pošiljka s prekomerno koncentracijo pesticidov kar 99.9989 %.

Primer 2:

V podjetju prejmejo letno 2000 razlicnih pošiljk sadja, od teh pa sta dve pošiljki sporni. Podjetje opravi analizo na 200 nakljucno izbranih vzorcih. Zanima nas kolikšna je verjetnost, da bosta obe kontaminirani pošiljki odkriti.

$$n = \binom{2000}{2} \qquad m = \binom{200}{2}$$

$$P(A) = \frac{m}{n} = \frac{\binom{200}{2}}{\binom{2000}{2}} = 0{,}009955$$

V tem primeru pa je verjetnost odkritja obeh kontaminiranih vzorcev 0,9955%. Tudi v tem primeru je verjetnost, da bo v enem letu v predelavo prepuščena vsaj ena pošiljka s prekomerno koncentracijo pesticidov, še vedno vecja od 99% ali natancneje 99,0045%.

Pri vseh teh izracunih pa moramo omeniti kljucne dejavnike zaradi katerih je potrebno gornje rezultate obravnavati le kot grobo oceno verjetnosti.

Prvi dejavnik je stopnja kontaminacije v prispeli pošiljki. Ta stopnja lahko le malenkostno presega dovoljeno stopnjo, lahko pa je nekajkrat višja od dovoljene stopnje prisotnosti pesticidov.

Drugi dejavnik je kolicina pesticida, ki pri mletju oziroma predelavi ostane v tropinah oziroma kolicina, ki ostane v kaši. Razmerja med koncentracijo pesticidov v kaši in v tropinah trenutno ne poznamo in je dolocljivo lahko na osnovi obsežnejših raziskav.

Tretji pomemben dejavnik pa je faktor redcenja. V skladišcno cisterno lahko shranimo kašo, ki jo pridobimo iz vec razlicnih pošiljk sadja. V tem primeru je

možno, da ena kontaminirana pošiljka, še ne povzroci prekomerne prisotnosti pesticidov pri celotni vsebini kaše. Možno pa je, da je v eno cisterno uskladišcena vsebina iz vec pošiljk s prekomerno koncentracijo pesticidov. Tako je stopnja kontaminacije v skladišcni cisterni odvisna od števila tovorov sadja, ki ga predelanega v kašo uskladišcimo v eni cisterni ter od števila kontaminiranih pošiljk v tej cisterni in stopnje njihove kontaminacije.

5.6. Zakljucki in predlogi

V diplomski nalogi sem predstavil novo analizno metodo, ki temelji na bioanalizni tehniki. Tovrstna metoda omogoca hitrejše in cenejše analize. V našem primeru bi to tehnologijo uporabljali kot presejalni test vhodnih surovin. S tem bi preprecili možnost nastanka vecje ekonomske škode v podjetju, zaradi uporabe surovin (sadne kaše) kontaminirane z organofosfatnimi pesticidi.

V drugem delu naloge sem najprej predstavil oceno naložbe v novo analizno tehniko. Stroški investicije bi znašali 10.940.000 SIT in ob predpostavljeni dobi uporabe petih let, bi z upoštevano amortizacijo letni stroški znašali 2.101.440 SIT. Stroški uvajanja nove metode, ki znašajo 5.100.000 SIT so upoštevani v stroških investicije.

V nadaljevanju sem na dveh primerih simulacije potencialne ekonomske škode prišel do spoznanja, da stroški investicije le niso tako veliki kot to zgleda na prvi pogled. Že ob ugotovitvi presežene koncentracije pesticidov v skladišcni cisterni lahko nastane škoda v višini okrog 2,5 milijona SIT, ce pa bi prišlo do odkritja prisotnosti pesticidov šele v koncnem proizvodu, bi bila ta škoda povsem primerljiva z vrednostjo investicije v ustrezno analizno tehniko.

V prid uvedbi nove analizne tehnike govorijo tudi podatki iz izracuna verjetnosti odkritja kontaminiranih surovin s sedanjo frekvenco analiziranja. Ugotovimo lahko, da obstaja skoraj 100% možnost, da bo v obdobju enega leta en kontaminiran primerek surovine spregledan že ob deležu kontaminiranih pošiljk manjšem od 0.1%.

Ob vsem tem moram poudariti, da je pri podatkih glede izracuna verjetnosti treba kriticno upoštevati tudi nepoznane dejavnike kot so stopnja kontaminacije posameznih pošiljk surovine, faktor redcenja, ter porazdelitev pesticidov med

tropinami in sadno kašo, ki pa jih žal brez obsežnih raziskav ni možno dolociti. Vsi ti dejavniki zmanjšujejo verjetnost preseganja dovoljenih koncentracij pesticidov v koncnih proizvodih. Prav tako pa je potrebno upoštevati, da so tudi statisticni podatki glede prisotnosti pesticidov v analiziranih vzorcih le okvirni, zato sem tudi opravil izracun na dveh razlicnih primerih.

Kljub temu pa lahko zakljucim, da so opravljeni izracuni in ekonomska analiza pokazali, da bi z uvedbo nove metode analize vhodnih surovin, lahko iznicili možnost nastanka ekonomske škode, zaradi nenamerne uporabe sadnih kaš, kontaminiranih z organofosfatnimi pesticidi. Poleg tega pa že prihranek pri analizi vhodnih surovin z novo metodo v primerjavi z sedanjo metodologijo upravicuje uvedbo nove metode.

6. LITERATURA

1. Pogacnik, L., (2003). BIOSENZORJI – NOVI »MERILCI« ONESNAŽENOSTI OKOLJA. Ljubljana: Biotehniška fakulteta.

2. Pogacnik, L., Franko, M., Optimisation of FIA system for detection of organophosphorus and carbamate pesticides based on cholinesterase inhibition, Talanta, 54 (2001) 632 – 641.

3. Skoog, D. A., Holler, F. J., Nieman, T. A., (1998). PRINCIPLES OF INSTRUMENTAL ANALYSIS (FIFTH EDITION). Philadelphia: Hartcourt Brace college publishers

4. Žorž, M., (1991). HPLC.Ljubljana: samozaložba

5. Baird, C., (1999). ENVIRONMENTAL CHEMISTRY. New York: W. H. Freeman and Company

6. PESTICIDI. Pridobljeno 15.5.2005 s svetovnega spleta: www. zzv-ce.si/okolje_in_mi/pesticidi.php

7. Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. Uradni list RS, št. 52 – 6949/00

8. Pravilnik o higieni živil. Uradni list RS, št. 60 – 6293/02

9. Pravilnik o ostankih pesticidov v oziroma na živilih in kmetijskih pridelkih. Uradni list RS, št 82 – 10210/04.

10. Cibej, J., (2001). MATEMATIKA – KOMBINATORIKA, VERJETNOSTNI RACUN, STATISTIKA. Ljubljana: DZS

11. Melavc, D., (2003). GOSPODARJENJE. Koper: Fakulteta za management